



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRÉA MARTINI RIBEIRO

**ACÚMULO TECIDUAL DE CHUMBO E SEUS EFEITOS
SOBRE OS PROCESSOS OSMORREGULATÓRIOS DE**
Prochilodus Lineatus

ANDRÉA MARTINI RIBEIRO

**ACÚMULO TECIDUAL DE CHUMBO E SEUS EFEITOS
SOBRE OS PROCESSOS OSMORREGULATÓRIOS DE
*Prochilodus Lineatus***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientadora Dra.. Cláudia Bueno dos Reis
Martinez

Londrina
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R848a Ribeiro, Andréa Martini.

Acúmulo tecidual de chumbo e seus efeitos sobre os processos osmorregulatórios de *prochilodus lineatus* / Andréa Martini Ribeiro. – Londrina, 2010.
73 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Peixe – Efeito do chumbo – Teses. 2. Peixe – Efeito da poluição da água – Teses. 3. Peixe de água doce – Teses. 4. Chumbo – Metabolismo – Regulação – Teses. 5. Metais – Toxicologia – Teses. 6. *Prochilodus lineatus*. Teses. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 597.554.1

ANDRÉA MARTINI RIBEIRO

**ACÚMULO TECIDUAL DE CHUMBO E SEUS EFEITOS SOBRE OS
PROCESSOS OSMORREGULATÓRIOS DE *Prochilodus Lineatus***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Adalto Bianchini
Instituto de Ciências Biológicas
FURG – Rio Grande - RS

Profa. Dra. Silvia Helena Sofia
UEL – Londrina - PR

Londrina, 21 de junho de 2010.

Dedico este trabalho ao meu querido
filho João Guilherme, presente de Deus,
pela confiança, apoio e paciência

“A ciência serve para nos dar uma idéia do quanto extensa é a nossa ignorância.”- Félicité Robert de Lamennais

Toda nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.” - Albert Einstein

“Nem todos podem tirar um curso superior. Mas todos podem ter respeito, alta escala de valores e as qualidades de espírito que são a verdadeira riqueza de qualquer pessoa.” - Alfred Montapert

AGRADECIMENTOS

À Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez pelos ensinamentos, paciência, puxões de orelha, compreensão, reconhecimento e confiança durante todas as fases do curso, e ainda pela amizade, preocupação e apoio na vida extra-acadêmica.

Aos componentes da banca, Prof. Dr. Adalto Bianchini e Profa. Dra. Silvia Helena Sofia, pelo aceite do convite e sugestões convenientes para o enriquecimento deste trabalho.

À Dra. Marta Marques Souza por sua paciência e sinceridade, por seus conselhos preciosos e seu cuidado e carinho dispensados à minha pessoa.

Aos órgãos financiadores CAPES e CNPq pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

À Estação de Piscicultura da UEL pelo fornecimento dos peixes.

À Dra. Marisa Narciso Fernandes da UFSCar e ao seu aluno Marcelo Paulino pela disponibilização do laboratório e material de consumo, e pela ajuda na realização da técnica de imunohistoquímica.

À Msc. Enelise Amado da UFPR pela ajuda na técnica da anidrase carbônica.

Aos colegas de laboratório: Carol e Thiago pela ajuda na análise dos íons; Paçoca, Lú e Vagner pela ajuda na utilização do elefante atômico; Marina pela ajuda na análise do cortisol; Vanessa pela parceria nos experimentos iniciais; Jú pela troca de artigos e opiniões durante a redação da dissertação; Lindalva pela companhia durante os almoços e pelo ombro nos momentos difíceis; Dalita e Cássia pelas risadas que me fizeram dar; e aos demais *lefianos* Prof. Paulo Meletti, Kelly, Bruna, Nati, Rafa, Cyrene, Thaís, Fran, Carolzinha, Gabriel, Káthya e Rafa Palhano, e aqueles que estão chegando ou de passagem.

À Rosana, secretária do curso de pós-graduação do Dpto. Biologia Animal e Vegetal da UEL, por ter buscado com paciência atender minhas dúvidas e necessidades.

Ao meu pai e minha mãe, pelo apoio emocional e financeiro, e pelos questionamentos, externando sua preocupação e carinho com meu futuro. E às minhas irmãs por cuidar de meu filho enquanto eu estudava, pela companhia, colaboração e interesse.

À minha querida prima Débora que me fez companhia nos momentos de distração, me apoiou e me incentivou nos momentos difíceis e comemorou comigo nos momentos felizes.

À toda minha família pelo interesse, incentivo e pelos incontáveis palpites.

Aos meus amigos que moram longe, mas que se fizeram presentes nos momentos mais importantes, Rodrigo, Amanda e Karla. Obrigada pela amizade incondicional.

Aos amigos que moram perto, que me presentearam com a companhia nas diversas fases deste trabalho: Cibele, Rebeca, Mari Ebert, Jú Marcarenhas, Marcinho, Farol, Nath Volpi.

Ao amigo André e todos os outros companheiros da aventura por me proporcionarem momentos de descontração e relaxamento. E aos amigos que pedalaram, correram, rapelaram, escalaram, remaram comigo colaborando para a liberação da minha endorfina.

Aos colegas de turma e de curso pela companhia e apoio nos momentos de vitória e sufoco.

A Deus e aos meus anjos protetores, agradeço pela companhia em todos os momentos, nos quais me guiaram, protegeram, aconselharam, incentivaram, consolaram e me ensinaram a ter forças para superar os momentos de amargura e aprender rapidamente o que a vida pretendia me ensinar.

E finalmente, para a pessoa mais importante da minha vida, meu amado filho Gui, agradeço por sua curiosidade insaciável e pelas perguntas intermináveis, por me agüentar nervosa, estressada e impaciente. Por seu apoio, incentivo e companheirismo, que mesmo desconhecendo as razões me acompanhou tantas vezes até a UEL, onde me aguardou com paciência e quase comportado. Obrigada por me mostrar sua visão ingênua do mundo me ajudando a enxergar os detalhes mais sutis e encantadores das pequenas coisas da vida, pela compreensão por minha ausência, por seu amor incondicional, e seus abraços de ânimo e otimismo nos momentos que me faltaram fôlego. Amo você, Gui-Gatinho!

A todos que fizeram parte deste processo direta ou indiretamente, o meu muito obrigada!

RIBEIRO, Andréa Martini. **Acúmulo tecidual de chumbo e seus efeitos sobre os processos osmorregulatórios de *Prochilodus lineatus***. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Os metais presentes no ambiente aquático podem interferir nos processos de osmorregulação dos teleósteos de água doce, além de se acumularem em diferentes tecidos dos peixes. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de determinar o acúmulo tecidual de chumbo e seus efeitos sobre os processos osmorregulatórios de *Prochilodus lineatus*. Juvenis desta espécie de água doce, nativo da região neotropical, foram expostos ao chumbo (concentração nominal de 3 mg Pb.L⁻¹), em testes estáticos por 6, 24 e 96 h. O acúmulo tecidual de chumbo foi analisado nas brânquias, fígado, rim, músculo e sangue. Foi feita a análise dos seguintes parâmetros: hematológicos (conteúdo de hemoglobina, hematócrito e número de células vermelhas), metabólico (glicose sanguínea), endócrino (cortisol sanguíneo), osmo-iônicos (osmolaridade plasmática e concentrações de Na⁺, K⁺, Cl⁻ e Ca²⁺), enzimas nas brânquias (Na⁺/K⁺-ATPase e anidrase carbônica) e a densidade e localização de células cloreto (CC) (imunohistoquímica). O acúmulo de metal ocorreu em todos os tecidos analisados em diferentes níveis, sendo o rim o órgão que mais acumulou chumbo, seguido pela brânquia e fígado, e o sangue e músculo os tecidos que apresentaram a menor concentração de chumbo. A presença de chumbo na água provocou um aumento de glicemia em decorrência de uma provável liberação de cortisol anterior ao primeiro tempo amostral, o que também colabora para a proliferação das CC branquiais. A enzima Na⁺/K⁺-ATPase branquial mostrou-se inibida após 24 h de exposição ao metal, mas teve sua atividade restabelecida em 96 h, possivelmente devido ao aumento do número de CC observado nas lamelas branquiais. A concentração plasmática de sódio reduziu nos tempos de 6 e 96 h, ao passo que o potássio plasmático apresentou-se aumentado em todos os tempos experimentais. Os peixes expostos ao Pb apresentaram redução na concentração de cálcio plasmático em todos os tempos experimentais, sugerindo a interferência do chumbo sobre a tomada deste íon. Os parâmetros hematológicos não sofreram alterações em nenhum dos tempos experimentais. Em suma, este estudo sugere que o contato de *P. lineatus* com o chumbo presente na água promove diversos desajustes ligados à osmorregulação, provavelmente devido à sua interação com proteínas transmembrânicas responsáveis pela captura ativa de íons. Os hormônios que regulam este processo entram em ação e promovem o aumento do número de CC branquiais na tentativa de restabelecer as concentrações de íons plasmáticos adequadas. No interior do organismo, o metal se acumula preferencialmente em órgãos de contato, como as brânquias, ou que possuem alta atividade metabólica e atuam na direção de eliminar as substâncias tóxicas, como o rim e o fígado.

Palavras-chave Bioacumulação. Células cloreto. Glicemia. Hematologia. Íons plasmáticos. Na⁺/K⁺-ATPase.

RIBEIRO, Andréa Martini. **Tissue accumulation of lead and its effects on the osmoregulatory processes of *Prochilodus lineatus***. 2010. 73 f. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Waterborne metals can interfere on osmoregulatory processes of freshwater teleosts and can be accumulated in different tissues of the fish. Thus, the present work aimed to determine tissue accumulation of lead and its effects on some osmoregulatory processes of *Prochilodus lineatus*. Juveniles of this freshwater teleost, native from Neotropical region, was exposed to lead (0.5 mg of dissolved lead.L⁻¹) for 6, 24 and 96 h, in static toxicity tests. Tissue accumulation of lead was analyzed in the gills, liver, kidney, blood and muscle. The following parameters were analyzed: hematologic (hemoglobin content, hematocrit and number of red blood cells), metabolic (blood glucose), endocrine (blood cortisol), osmo-ionic (plasma osmolarity and concentrations of Na⁺, K⁺, Cl⁻ and Ca⁺²), gill enzymes (Na⁺/K⁺-ATPase and carbonic anhydrase) and the density and localization of chloride cells (immunohistochemistry). Lead accumulated in all the tissues analyzed, kidney was the organ that most accumulated, followed by the gills and liver. Blood and muscle were the tissues that showed the smaller lead concentrations. Lead in water promoted an increase on blood glucose. This hyperglycemia was probably due to an increased cortisol liberation, which might also have corroborated for the proliferation of chloride cells (CC) in the gills. Gill Na⁺/K⁺-ATPase was inhibited after 24 h exposure to the metal, but its activity was restored at 96 h, probably due to the increase in CC that was observed in gills lamellae. Sodium concentrations in plasma were reduced after 6 and 96 h, while potassium levels were increased at all experimental times. Fish exposed to Pb showed a reduction on plasma Ca⁺² at all experimental periods, suggesting that lead somehow interferes on calcium uptake. Hematologic parameters did not show any alterations after lead exposure. Overall, this study demonstrated that lead interferes on some osmoregulatory processes of *P. lineatus*, probably due to its interaction with membrane proteins related to the active ion uptake. The hormones that regulate these processes are released promoting the increase in the number of CC in the gills in order to reestablish adequate ions concentrations. In *P. lineatus* lead accumulates preferentially on organs that make direct contact to water, such as the gills, and in organs with high metabolic activity that act on xenobiotic elimination, such as the kidney and the liver.

Keywords: Bioaccumulation. Chloride cells. Blood glucose. Hematology. Plasma ions. Na⁺/K⁺-ATPase.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Concentração de chumbo (média \pm EP) nos órgãos e células de *P. lineatus* expostos ao chumbo por 6, 24 e 96 h. Todos os tempos experimentais diferem significativamente dos controles..... 34
- Figura 2** – Concentração de glicose (A) e cortisol plasmáticos (B) de *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo (Pb) ou apenas à água (CTR) por 6, 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o DP 35
- Figura 3** – Concentração de hemoglobina (A), hematócrito (B) e número de células vermelhas (C) de *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo ou somente à água por 6, 24 e 96 h. As barras indicam as médias e as linhas verticais o DP. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos 36
- Figura 4** – Osmolaridade (A) e concentrações plasmáticas de sódio (B), potássio (C), cloreto (D) e cálcio (E) em *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo (Pb) ou apenas à água (CTR) por 6, 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o DP. * indica diferença significativa em relação ao grupo CTR para cada tempo..... 37
- Figura 5** – Atividade da Na^+/K^+ -ATPase (A) e anidrase carbônica (B) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo (Pb) em relação aos expostos apenas à água (CTR) por 6, 24 e 96 h. * indica diferença significativa em relação ao grupo CTR para cada tempo experimental ($P < 0,05$) 38
- Figura 6** – Fotomicrografia da localização das células cloreto através da técnica de imunohistoquímica para a enzima Na^+/K^+ -ATPase em *Prochilodus lineatus* expostos à água (A) ou ao Pb (B) por 24 h. 40 X de aumento, as barras correspondem a 20 μm 38
- Figura 7** – Número total e distribuição de células cloreto (CC) nas lamelas e filamentos branquiais de *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo (EXP) ou apenas à água (CTR) por 6, 24 e 96 h. As barras indicam a média de células segundo sua localização, e as linhas verticais, o EP. * indica diferença estatística significativa das CC nas lamelas e # indica diferença das CC totais dos respectivos CTR ($P < 0,05$)..... 39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	22
3	ARTIGO	23
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO GERAL

Grande parte dos teleósteos, assim como diversos outros grupos de organismos, são peixes que estão restritos ao ambiente aquático. Deste modo, alterações causadas neste ambiente tendem a afetar, em diferentes níveis, as diversas espécies ali viventes (Vinodhini e Narayanan, 2008). No cenário atual, existe uma infinita gama de produtos da ação antrópica potencialmente tóxicos para os organismos aquáticos. Estes vão desde produtos da percolação de aterros sanitários (Lopes et al., 2007) e despejos de esgoto sem tratamento, a agroquímicos usados em lavouras, petróleo e seus derivados, e rejeitos industriais (Heath, 1995; WHO, 1995). Existem também compostos com potencial poluidor que são incorporados aos sistemas aquáticos de maneira natural. Mas no sentido original da palavra, poluição se refere a produtos da ação antrópica que causam distúrbios quando em contato com o ambiente natural (Mellanby, 1982), e trata-se por *xenobiótico* qualquer substância química estranha, presente em um sistema biológico (Mídio, 1992).

Em geral, a poluição gerada pelo homem é formada por diferentes compostos que juntos tendem a ter seu potencial tóxico aumentado. Mas, é essencial que se conheça com detalhes a ação de cada um deles isoladamente sobre a biota, para que decisões de combate à poluição possam ser tomadas (Martinez e Cólus, 2002; Cicik et al., 2004). Neste contexto insere-se a importância dos testes toxicológicos, que visam entender a ação tóxica da substância nociva para um determinado organismo utilizando para isso os biomarcadores. Estes são parâmetros biológicos do organismo teste que estão sujeitos a alterações estruturais e funcionais em virtude da presença de agentes contaminantes (Heath, 1995). Existem biomarcadores que podem responder a uma ampla gama de poluentes, outros a um poluente específico (Hodson et al., 1980). Estes últimos são ideais para utilização em análises ambientais com o objetivo de identificar compostos tóxicos específicos presentes no ambiente (Almeida et al., 2005).

Em cursos de água poluídos, diversos agentes nocivos podem ser encontrados. Alguns podem sofrer alterações químicas com o tempo, pela ação de fatores externos e dar origem a novos compostos, como a foto-degradação que ocorre com derivados de petróleo, dando origem a compostos mais nocivos e capazes de provocar alterações de ordem fisiológica, genética, histológica e bioquímica, geralmente mais severas do que as causadas pelo composto íntegro (Simonato et al., 2006, 2008). Outras substâncias não são passíveis de degradação, mas podem interagir com elementos presentes na água, ou alterar sua

toxicidade de acordo com as características ambientais, tornando-se mais ou menos nocivas para a biota aquática. É o caso do alumínio que torna-se consideravelmente mais tóxico quando em ambiente de baixo pH, provocando severas alterações para os peixes a ele expostos (Camargo et al., 2009). Da mesma forma, outros metais também apresentam características próprias de interação com os componentes químicos e físicos da água. A dureza em particular, é um fator determinante para a disponibilidade de metais, e, em linhas gerais, a concentração de metal dissolvido será sempre inversamente proporcional à dureza (Hodson et al., 1979; Paquim et al., 2000, 2002; Rathore e Khangarot, 2003). Uma vez que o cálcio e o magnésio são os elementos que mais influenciam na dureza da água, a presença destes dois íons muitas vezes exerce um efeito protetor para os animais de água doce, pois competem com certos contaminantes pelas mesmas vias de entrada (Rogers e Wood, 2004). Assim, um ambiente aquático que apresente uma alta dureza, necessita de uma concentração desses elementos tóxicos muito maior para causar nos peixes os mesmos efeitos de um ambiente com água mole (Davies et al., 1976). Isso é demonstrado em estudos que averiguaram a disponibilidade do chumbo em sua forma total e dissolvida, já que apenas a porção do metal que se encontra diluída na água estará biologicamente disponível para ser absorvida pela biota (Hodson et al., 1980; Heath, 1995). A toxicidade do chumbo também é reduzida em pHs muito altos (Hodson et al., 1979), e sua máxima toxicidade para peixes da região temperada foi encontrada em torno de pH 6,0 (MacDonald et al., 2002). Grande parte do chumbo presente no ambiente liga-se fortemente ao sedimento, e apenas uma pequena fração encontra-se biodisponível (WHO, 1995; Almeida et al., 2005). Assim, espécies que estão mais intimamente relacionadas ao sedimento apresentam um maior risco de contaminação por este metal (Roach et al., 2008).

O chumbo é um metal muito maleável, com alto peso molecular e bastante resistente à corrosão (Liu et al., 2008), propriedades essas que conferem aos seus produtos as características necessárias ao seu bom desempenho. Quase a totalidade do chumbo produzido no Brasil corresponde ao chumbo secundário, proveniente da reciclagem de sucata, especialmente baterias automotivas. No entanto, ainda faz-se necessária a importação de grandes quantidades desse minério a fim de suprir a demanda da indústria nacional (BRASIL, 2007). O chumbo foi utilizado como aditivo na gasolina ao longo de várias décadas, permitindo que grandes quantidades deste metal atingissem a atmosfera e possibilitando que ele alcançasse até mesmo regiões desabitadas pelo homem (Köck e Hofer, 1998). Mas atualmente, a contaminação por chumbo advém principalmente da mineração e de fábricas de baterias automotivas (Martinez e Cólus, 2002).

Além do ambiente, outro fator importante que vai determinar a toxicidade da espécie metálica está na capacidade da biota em absorvê-la. Diversas pesquisas já demonstraram que diferentes espécies de teleósteos dulcícolas apresentam diferentes sensibilidades para a exposição a uma mesma concentração de chumbo, sob as mesmas condições (Roach et al., 2008; Terra et al., 2008). É evidente que peixes de regiões diferentes, que são fisiologicamente adaptados a condições ambientais distintas, irão responder de forma singular à presença de contaminantes (Atli e Canli, 2008). Porém, isto também é verdadeiro para espécies simpátricas que podem apresentar adaptações fisiológicas ou fatores comportamentais que conferem maior resistência ou um menor risco de exposição do organismo, diminuindo a tomada do xenobiótico ou facilitando sua eliminação (Hodson et al., 1980). Mas ainda dentro de uma mesma espécie, alguns fatores podem exercer influência sobre a sensibilidade do animal à presença do contaminante. Peixes expostos a um xenobiótico desde o período pré-eclosão apresentam um tempo de resposta menor para a manifestação dos sintomas do que aqueles que foram expostos a partir da fase de alevinos (Hodson et al., 1979). Da mesma forma, fêmeas em fase de reprodução estão mais susceptíveis ao aparecimento dos sintomas causados pela presença do agente poluidor uma vez que grande parte de seu investimento energético está voltado para a desova (Al-Yousuf et al., 2000). Além da fase do desenvolvimento e do estágio de maturação gonadal, fatores como idade e tamanho também podem ser determinantes para a toxicidade da substância poluidora sobre a espécie de interesse (Canli e Atli, 2003). Além do ambiente, outro fator importante que vai determinar a toxicidade da espécie metálica está na capacidade da biota em absorvê-la. Diversas pesquisas já demonstraram que diferentes espécies de teleósteos dulcícolas apresentam diferentes sensibilidades para a exposição a uma mesma concentração de chumbo, sob as mesmas condições (Roach et al., 2008; Terra et al., 2008). É evidente que peixes de regiões diferentes, que são fisiologicamente adaptados a condições ambientais distintas, irão responder de forma singular à presença de contaminantes (Atli e Canli, 2008). Porém, isto também é verdadeiro para espécies simpátricas que podem apresentar adaptações fisiológicas ou fatores comportamentais que conferem maior resistência ou um menor risco de exposição do organismo, diminuindo a tomada do xenobiótico ou facilitando sua eliminação (Hodson et al., 1980). Mas ainda dentro de uma mesma espécie, alguns fatores podem exercer influência sobre a sensibilidade do animal à presença do contaminante. Peixes expostos a um xenobiótico desde o período pré-eclosão apresentam um tempo de resposta menor para a manifestação dos sintomas do que aqueles que foram expostos a partir da fase de alevinos (Hodson et al., 1979). Da mesma forma, fêmeas em fase de reprodução estão mais

susceptíveis ao aparecimento dos sintomas causados pela presença do agente poluidor uma vez que grande parte de seu investimento energético está voltado para a desova (Al-Yousuf et al., 2000). Além da fase do desenvolvimento e do estágio de maturação gonadal, fatores como idade e tamanho também podem ser determinantes para a toxicidade da substância poluidora sobre a espécie de interesse (Canli e Atli, 2003).

O fato do chumbo ser um elemento não essencial à sobrevivência dos organismos e não biodegradável (Liu et al., 2008), para o qual não existem vias eficientes de metabolização e eliminação, acaba por causar uma bioacumulação em diferentes órgãos e tecidos das espécies peixes a ele expostas (Peakal e Burger, 2003). A entrada das substâncias tóxicas em peixes teleósteos se dá via brânquias, pele ou alimentação, e o acúmulo ocorre de forma não homogênea nos diferentes órgãos e tecidos (Alves e Wood, 2006). O acúmulo do elemento tóxico no corpo tende a ser maior conforme aumenta o nível trófico, ou seja, peixes carnívoros retêm uma maior concentração do xenobiótico do que aqueles que se alimentam apenas de vegetais ou matéria orgânica (Peakall e Burger, 2003; Metcheva et al., 2010). Diversos estudos demonstraram um acúmulo marcante de uma variedade de espécies metálicas em diferentes tecidos de peixes (Huang et al., 2007; Terra et al., 2008; Vinodhini e Narayanan, 2008; Cardoso et al., 2009), tartarugas (Jerez et al., 2010) e aves (Kreager et al., 2008; Rattner et al., 2008) que ocupam os níveis mais altos da cadeia alimentar. Mas independente da posição trófica em que o organismo se encontra, o simples contato com o contaminante somado à ineficiência de sua eliminação, já contribui para que haja o acúmulo em tecidos e órgãos (Roach et al., 2008).

Uma espécie pode reter uma maior concentração de determinado metal em um órgão específico, enquanto para outra espécie, o acúmulo do mesmo metal neste órgão pode não ser tão representativo (Peakall e Burger, 2003; Terra et al., 2008). Da mesma forma, diferentes metais podem apresentar padrões de acúmulo distintos nos órgãos de uma dada espécie, o que representa certa „preferência“ de cada metal por determinado tecido de um mesmo animal (Cicik et al., 2004; Vinodhini e Narayanan, 2008).

Assim, a concentração de metal acumulada em cada tecido varia principalmente em função da espécie exposta (Roach et al., 2008; Terra et al., 2008), da espécie metálica (Vinodhini e Narayanan, 2008) e do tempo de exposição (Grosell et al., 2006). Exposições agudas tendem a representar um maior acúmulo de metais em tecidos moles, ao passo que na exposição crônica, o animal passa a reter o metal em tecidos duros como ossos e dentes (Alves e Wood, 2006; Grosell et al., 2006; ATSDR, 2007). As maiores concentrações de metais após exposição aguda são encontradas nos órgãos que estão

envolvidos com a tomada e eliminação dos contaminantes, por serem dotados de uma alta taxa metabólica (Cicik et al., 2004). Por sua vez, o músculo é um dos tecidos que menos acumula metais, em vista do grande volume que ocupa (Alves e Wood, 2006; Palaniappan et al., 2009). No entanto, o monitoramento dos níveis de metais retidos neste tecido é de grande importância uma vez que é o tecido mais comumente consumido na alimentação humana (Nussey et al., 2000).

O chumbo se acumula em alguns órgãos mais facilmente do que o restante dos metais (Vinodhini e Narayanan, 2008), e, para muitas espécies, o maior acúmulo do metal ocorre nas brânquias, devido seu íntimo contato com o ambiente (Ahern e Morris, 1998; Ay et al., 1999; Rogers et al., 2003; Suiçmez et al., 2006; Has-Schön et al., 2008; Vinodhini e Narayanan, 2008). Além das funções de respiração, eliminação de excretas e equilíbrio ácido-base, as brânquias dos peixes de água doce devem captar ativamente íons da água, a fim de manter um ambiente interno favorável para a homeostase, mas o acúmulo de chumbo neste órgão pode acarretar em ineficiência de sua função (Ahern e Morris, 1999; Rogers et al., 2003). Fígado e rim também costumam ser alvos de retenção de grande quantidade de metais, devido a alta atividade metabólica e à produção das metalotioneínas, que capturam o íon metálico visando a proteção do organismo (Cicik et al., 2004).

Uma vez dentro do animal, o metal pode interferir na fisiologia normal do organismo causando prejuízos diversos. As brânquias são responsáveis pela tomada ativa de íons que proporciona uma concentração iônica interna ideal para a realização das atividades metabólicas, para isto apresentam células especializadas dotadas de inúmeras proteínas de membrana, que formam transportadores, canais e enzimas encarregados deste trabalho (Evans, 1987). A osmorregulação encontra-se particularmente prejudicada na presença de metais (Skidmore, 1970; Ay et al., 1999; Martinez e Cólus, 2002; Martinez et al., 2004) em detrimento da inibição das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (NKA) (Siegel e Fogt, 1977; Ahern e Morris, 1998; Ay et al., 1999; Machado, 1999; Rogers et al., 2003; Rogers et al., 2005; Atli e Canli, 2008), Ca^+ -ATPase (Rogers e Wood, 2004) e anidrase carbônica (Evans, 1987; Morgan et al., 1997; Skaggs e Henry, 2002).

A NKA é um enzima formada por uma unidade catalítica grande transmembrana multipasso chamada de subunidade alfa, associada a uma glicoproteína unipasso, a subunidade beta (Hwang e Lee, 2008). É na subunidade alfa que localizam-se os sítios ligantes dos íons e do ATP, a fonte de energia para o transporte. A enzima sofre mudanças conformacionais que expõem seus sítios de ligação ora para o interior da célula, ora

para o meio extra-celular. A NKA atua retirando da célula três íons sódio em troca de dois íons potássio do plasma, mas este trabalho ocorre contra um gradiente de concentração, e para que isso seja possível é necessário que grande suprimento de energia esteja disponível (Perry, 1997). Deste modo, as células dotadas de grande quantidade de NKA, também são providas de muitas mitocôndrias responsáveis pela produção da energia necessária em forma de ATP. Para que a molécula de ATP se ligue ao seu respectivo sítio de ligação na porção intracelular da subunidade alfa da enzima, é necessária a presença de um íon magnésio, que irá atuar como co-fator da enzima. A ausência, a substituição ou a interferência na ligação deste íon implica em inatividade da enzima (Fischer e Giroux, 1987). Mas outros fatores, como as concentrações dos íons Na^+ , K^+ , o pH e a disponibilidade de ATP também são reguladores da atividade da NKA (Atli e Canli, 2008).

Para que a bomba de sódio e potássio funcione normalmente é necessário que todos estes fatores estejam funcionando de forma sincronizada, mas a presença de alguns xenobióticos de origem metálica pode interferir no bom funcionamento do transporte. O cobre (Sampaio et al., 2008), a prata (Morgan et al., 1997), o alumínio (Camargo et al., 2009) e o chumbo (Ahern e Morris, 1999; Rogers et al., 2003, 2005) estão entre os causadores de redução da atividade desta enzima, resultando em alterações das concentrações de íons internos. A redução da atividade da bomba é uma consequência comum para os metais, mas os mecanismos pelos quais ocorre esta redução não estão claros para todos esses metais. Ao que parece, o cobre interage com os sítios de ligação destinados ao Mg^{2+} (Sampaio et al., 2008), resultando em dificuldade para o acoplamento da molécula de ATP ao sítio catalítico. Deste modo, não ocorre a fosforilação da enzima que deixa de sofrer as alterações conformacionais necessárias ao transporte. De forma semelhante, o decréscimo na atividade de transporte na presença de chumbo é atribuído à interferência do metal na formação do intermediário da enzima fosforilada (complexo E-P) (Ahern e Morris, 1999).

A NKA tem uma atuação eletrogênica, já que durante sua atividade são colocados mais íons positivos para fora da célula do que para dentro (Alberts et al., 2010), tornando o interior celular negativamente carregado em relação ao exterior, e desta forma gerando um potencial de membrana que serve como força motriz para a entrada de outros íons, que se deslocam pela membrana apical da água para o peixe (Rose e Valdes, 1994; Heath, 1995; Hwang; Lee, 2007). A inibição da NKA, associada à interferência sobre outras enzimas, faz com que peixes expostos ao chumbo tipicamente apresentem alterações das concentrações de íons no plasma. Os mais comumente afetados são o sódio e o cloreto, que

têm suas concentrações plasmáticas diminuídas pela redução do influxo iônico (Rogers et al., 2003; Martinez et al., 2004; Rogers et al., 2005).

Além de estar susceptível a alterações pela redução de atividade da NKA, a concentração plasmática de cloreto também pode ser afetada em função do funcionamento inadequado da anidrase carbônica (AC). Esta enzima é encontrada aderida à membrana plasmática ou a organelas celulares, e também está presente no citosol das células branquiais (Gilmour e Perry, 2009). Ela atua no equilíbrio ácido-base (Evans et al., 2005), agindo sobre o gás carbônico proveniente da respiração celular, que chega nas brânquias para ser eliminado. O CO₂ sofre uma reação de hidratação pela ação da AC, formando o ácido carbônico que é extremamente instável, e se dissocia rapidamente formando o íon bicarbonato e o íon hidrogênio. A importância desta enzima para a osmorregulação está no fato de que os dois produtos por ela formados atuam como contra-íons para a captura de sódio e cloreto presente no meio (Goss et al., 1998). Alguns metais são capazes de interferir no bom funcionamento da AC (Morgan et al., 1997; Vitale et al., 1999; Skagg e Henry, 2002; Rogers et al., 2005), e, portanto, prejudicar indiretamente a captação de Na⁺ e Cl⁻ (Evans, 1987). Assim, o decréscimo dos níveis plasmáticos de cloreto comumente encontrado em presença de chumbo (Rogers et al., 2003), pode estar associado à interferência deste metal sobre a atividade da AC e ao prejuízo de produção dos íons de troca.

Os níveis calcêmicos também podem sofrer alterações em presença de chumbo, assim como ocorre com outros metais como cobalto, zinco e cádmio (Bury e Wood, 1999; MacDonald et al., 2002; Rogers e Wood, 2004), os quais são descritos como antagonistas do cálcio e utilizam sua via de absorção para adentrar o animal. O cálcio que entra no organismo através das brânquias é absorvido ativamente tanto pelas células cloreto (CC), quanto pelas demais células epiteliais. A porção apical dessas células possui canais pelos quais ocorre a absorção de cálcio, e a entrada deste íon só acontece graças ao gradiente gerado pelos transportadores inseridos na região basolateral da membrana plasmática: trocador Na⁺/Ca²⁺ e Ca²⁺-ATPase (Hwang e Lee, 2008). Todos os eventos envolvidos na tomada branquial de cálcio são também descritos como possíveis vias de absorção do chumbo, e assim como acontece com a NKA, o metal pode bloquear o canal apical e também reduzir a atividade dos trocadores localizados na membrana basolateral (MacDonald et al., 2002; Rogers et al., 2003; Atli e Canli, 2007). Em consequência disto, os níveis de cálcio no interior do organismo são tipicamente reduzidos na presença de chumbo (Ahern e Morris, 1999; Rogers et al., 2003; Rogers e Wood, 2004; Mosher, 2008).

Mas além de interferir negativamente nos processos de tomada iônica, o chumbo pode ainda alterar a concentração de íons plasmáticos em peixes de água doce pelo aumento do efluxo de íons, provocado por distúrbios na permeabilidade iônica das membranas. No epitélio branquial dos teleósteos dulcícolas encontram-se junções celulares que conferem ao tecido a impermeabilidade necessária para evitar a passagem de íons pela via paracelular (Foskett et al., 1983; Evans, 2005). A formação destas junções oclusivas depende indiretamente da atividade da NKA, que atua na mobilização dos elementos formadores do complexo protéico (Rajasekaran e Rajasekaran, 2003). Além disso, algumas proteínas que compõem esta junção celular dependem do íon cálcio para poderem se ligar umas às outras (Schneerberger e Lynch, 1984; Rajasekaran et al., 2001; Brown e Davis, 2002). Uma vez que o chumbo é capaz de interferir na atividade da NKA e nas concentrações de cálcio no plasma, é possível que além das alterações de íons plasmáticos decorrentes da ineficiência nos processos osmorregulatórios, o metal também permita a perda iônica por entre as células do epitélio branquial.

Uma vez que a presença de chumbo interfere na concentração de diferentes íons plasmáticos, o organismo se movimenta no intuito de contornar os desajustes. Uma das formas de recuperar a concentração normal de íons é pelo aumento da tomada dos mesmos, sendo que a produção de uma nova população de células que trabalham nesta direção é uma das estratégias adotadas para aumentar a taxa de influxo iônico (Perry, 1997). Em ocasiões de baixa osmolaridade do ambiente ou baixa concentração de Na^+ no plasma, o teleósteo de água doce produz um hormônio chamado prolactina (Kaneko e Hirano, 1993), sintetizado na região anterior da adenohipófise e que está diretamente relacionado à hiperregulação iônica (Mancera e McCormick, 2007). Simultaneamente, circunstâncias que expõem o animal a uma situação de estresse estimulam a produção de cortisol pelo tecido inter-renal (Mancera e McCormick, 2007). As principais funções deste hormônio são a regulação da captação de íons e do balanço energético (Wendelaar-Bonga e Lock, 2008; Ramesh et al., 2009), situações comumente encontradas em presença um fator estressante. À liberação destes dois hormônios, o organismo responde com a proliferação de CC nas brânquias com o intuito de otimizar os processos osmorregulatórios e retomar os níveis normais de íons plasmáticos (Mancera e McCormick, 2007; Ramesh et al., 2009).

As CC são células especializadas encontradas nas brânquias e responsáveis pela captura ativa de íons da água. Para atuar nesta direção estas células são dotadas de um grande número de mitocôndria que visam a produção de energia na forma de ATP e uma

extensa rede de invaginações da membrana basolateral para a inserção dos transportadores que irão atuar na função de absorção de íons (Perry, 1997). A exposição de teleósteos dulcícolas a águas contaminadas com metais resulta tipicamente em aumento do número de CC branquiais (Dang et al., 2000a). Em geral as CC encontram-se inseridas nos filamentos, sendo menos frequente sua ocorrência nas lamelas. Mas sob certas condições ambientais as CC passam a ser mais comumente encontradas no epitélio lamelar (Goss et al., 1998). A migração de células do filamento para as lamelas pode decorrer da necessidade de aumentar a tomada de íons nos peixes de água doce (Hwang e Lee, 2007).

Também em resposta à liberação de cortisol, ocorre um processo chamado glicogenólise, que consiste na quebra do glicogênio armazenado no fígado e formação de moléculas de glicose para suprir a demanda energética para lidar com os danos causados pelo agente estressor (Thomas, 2008). A liberação deste hormônio pode ocorrer desde os primeiros minutos de exposição, até algumas horas depois (Barton, 2002; Thomas, 2008), e sua presença no corpo do animal não dura mais que poucas horas (Iwama et al., 2006). Contudo, como resultado de sua atuação, a glicemia do animal pode permanecer em níveis elevados por períodos mais prolongados (Barton, 2002), resultando em um efeito duradouro. Desta forma, é possível afirmar com alguma cautela que a hiperglicemia encontrada em peixes expostos a contaminantes aquáticos decorre da liberação prévia do hormônio ligado ao estresse, o cortisol (Iwama et al., 2006).

Como uma medida de prevenção da absorção dos compostos tóxicos, o organismo acaba lançando mão de alterações histológicas no tecido branquial com o intuito de criar uma barreira para minimizar a entrada desses contaminantes (Mallatt, 1985). No entanto, tais alterações revelaram-se “má adaptações”, uma vez que a distância de difusão para os gases também é aumentada, dificultando a tomada de oxigênio. Desta forma, para aumentar a eficiência na captura deste gás, os parâmetros hematológicos também podem variar. Para isso, ocorre a liberação de catecolaminas que promovem contração esplênica e consequente liberação de novas células sanguíneas para a circulação, aumentando assim os diversos parâmetros hematológicos (Wendelaar - Bonga, 1997). Contudo, nem todas as espécies respondem da mesma maneira aos contaminantes, pois, respostas e efeitos opostos podem ser obtidos em função do agente poluidor e de sua concentração (Di Giulio e Newman, 2008). A exposição de teleósteos dulcícolas ao chumbo pode interferir de forma negativa nos parâmetros sanguíneos, de modo a provocar uma diminuição dos eritrócitos após exposição crônica. A atividade da ácido delta-aminolevulínico desidratase (ALAD) é prejudicada na presença deste contaminante. Esta enzima é responsável pela síntese de hemoglobina, sem a

qual fica inviável a produção de células sanguíneas saudáveis (Kutlu e Sümer, 2008). O efeito de inibição da ALAD parece ser exclusivo da presença do chumbo, já que metais como Cd, Cu e Hg não causaram alteração na atividade da enzima, e o Zn ocasionou um discreto aumento de sua atividade na exposição de peixes da região temperada (Hodson et al., 1980). Deste modo, a análise da atividade da ALAD em teleósteos de água doce mostra-se ideal para o monitoramento da presença de chumbo no ambiente aquático, uma vez que a redução dos parâmetros hematológicos podem ser reflexo da ação do metal sobre a enzima.

Diversos estudos já foram realizados para o estabelecimento de modelos dos efeitos do chumbo sobre parâmetros fisiológicos da ictiofauna da região temperada, contudo, há uma carência de informações para os peixes residentes da região neotropical (Martinez e Cólus, 2002). Muitos padrões de efeitos e respostas não podem ser extrapolados entre diferentes espécies em função das diferenças fisiológicas e das condições ambientais a que cada uma está adaptada (Atli e Canli, 2008). Assim, recentes pesquisas relacionadas à ictiofauna da região neotropical vem ganhando destaque no cenário atual. Algumas espécies residentes desta região revelaram-se bioindicadores em potencial, por terem alguns de seus parâmetros sensivelmente alterados em presença de contaminantes aquáticos, revelando-se bons biomarcadores (Winkaler et al., 2001; Martinez e Cólus, 2002; Torre et al., 2007; Sampaio et al., 2008). O *Prochilodus lineatus* é um peixe dulcícola de médio porte cuja biologia e fisiologia são bastante conhecidas. Sua ocorrência se restringe as bacias Parnaíba do Sul, Paraná e Paraguai, na região neotropical. Possui hábito alimentar detritívoro e sua presença está atrelada a ambientes íntegros.

Neste contexto, insere-se a importância de estudos que objetivam desvendar o modo de atuação de determinada espécie metálica sobre a fisiologia de teleósteos dulcícolas, com ênfase nos processos de captação de íons pelas brânquias. Extensas pesquisas já foram desenvolvidas para desvendar o modo de atuação do chumbo na captação de íons como o cálcio, sódio, cloreto e magnésio nos peixes da região temperada (Rogers et al., 2003, 2005; Rogers e Wood, 2004). Estas pesquisas visam entender a interação direta ou indireta do chumbo com tais íons e seus canais e transportadores. Do mesmo modo, faz-se necessário mais estudos dos mesmos parâmetros para as espécies presentes na região neotropical.

2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

Objetivos Gerais

- Analisar o acúmulo de chumbo em diferentes tecidos do peixe *Prochilodus lineatus*;
- Caracterizar os efeitos do chumbo sobre os processos de osmorregulação em peixes de água doce da região neotropical, usando como modelo o *Prochilodus lineatus*;

Objetivos Específicos

- Realizar testes de toxicidade aguda com peixes expostos às concentrações de chumbo já verificadas em córregos e riachos da região de Londrina;
- Analisar, por espectrofotometria de absorção atômica, o teor de chumbo em diferentes tecidos (brânquias, fígado, rim, eritrócitos e músculo) dos peixes expostos aos testes de toxicidade;
- Avaliar os parâmetros hematológicos (hematócrito, conteúdo de hemoglobina e número de eritrócitos) dos peixes expostos aos testes de toxicidade;
- Determinar as concentrações plasmáticas de cortisol e glicose dos peixes expostos aos testes de toxicidade;
- Medir as concentrações plasmáticas de sódio, potássio, cloreto e cálcio, e a osmolaridade dos peixes expostos aos testes de toxicidade;
- Quantificar e localizar as células de cloreto, nas brânquias dos peixes expostos aos testes de toxicidade, por meio de ensaio imunohistoquímico;
- Determinar a atividade da Na^+/K^+ -ATPase em brânquias dos peixes expostos aos testes de toxicidade;
- Analisar a atividade da anidrase carbônica em brânquias dos peixes expostos aos testes de toxicidade.

3 ARTIGO

**ACÚMULO TECIDUAL DE CHUMBO E SEUS EFEITOS SOBRE A FISIOLÓGIA
BRANQUIAL DE *Prochilodus lineatus***

Andrea Martini Ribeiro; Cláudia B. R. Martinez

ACÚMULO TECIDUAL DE CHUMBO E SEUS EFEITOS SOBRE A FISIOLÓGIA BRANQUIAL DE *Prochilodus lineatus*

Andrea Martini Ribeiro¹, Cláudia B. R. Martinez¹

Resumo

Com o objetivo de verificar o acúmulo de chumbo em diferentes órgãos e células, e entender sua ação sobre a fisiologia branquial de um peixe neotropical de água doce, juvenis de *Prochilodus lineatus* foram submetidos à exposição ao chumbo (concentração nominal de 3 mg Pb.L⁻¹) ou somente à água por até 96 h. Os resultados mostraram que o chumbo se acumula em diferentes proporções nos órgãos (rim > brânquias > fígado > eritrócitos > músculo), variando, também, em função do tempo. Os parâmetros hematológicos e do cortisol plasmático não sofreram alterações na presença do metal, mas a glicemia apresentou-se aumentada. A concentração plasmática de cálcio sofreu interferência, assim como a de sódio. A elevação do potássio plasmático resultou da inibição da Na⁺/K⁺-ATPase. O número de células cloreto nas lamelas branquiais aumentou nos peixes expostos ao chumbo. A concentração de cloreto no plasma e a atividade da anidrase carbônica não sofreram alterações durante a exposição ao chumbo. Os resultados indicam que o contato da espécie estudada com o chumbo, causa acúmulo de metal no corpo da espécie *P. lineatus*, alterações osmorregulatórias e proliferação das células cloreto branquiais.

Palavras-chave: Bioacumulação. Hematologia. Íons plasmáticos. Células cloreto. Na⁺/K⁺-ATPase. Anidrase carbônica.

Introdução

O chumbo pode ocorrer em concentrações muito baixas no ambiente aquático por processos naturais, mas por se tratar de um metal bastante utilizado nas indústrias de tintas, vidros e baterias automotivas, sua entrada no ecossistema aquático é facilitada pela ação antrópica (Paoliello e Chasin, 2001; Skerfving e Bergdahl, 2007). A legislação brasileira (CONAMA, 2005) determina que o chumbo total presente na água para consumo humano não ultrapasse valores de 0,01 mg.L⁻¹. Contudo, concentrações bem acima deste limite já foram identificadas em corpos d'água em diversas regiões do país (Yabe e Oliveira, 1998; Lima et al., 2001; Mozeto et al., 2007). Dados sobre os efeitos do chumbo nos

¹ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina. C.P. 6001. CEP: 86051-990. Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55 43 3371.4650 – Fax: +55 43 3371. 4467. e-mail: cbueno@uel.br.

organismos aquáticos estão disponíveis para organismos da região temperada, enquanto a região neotropical sofre com um déficit de informações. Os conhecimentos existentes para organismos da região temperada não devem ser extrapolados para aqueles residentes na região tropical (Martinez e Cólus, 2002), uma vez que as diferenças das condições ambientais e da fisiologia das espécies são muito grandes entre estas duas regiões (Atli e Canli, 2008).

Os teleósteos de água doce precisam “lançar mão” de processos que atuam na captação de íons a fim de manter a osmolaridade de seus fluidos corpóreos mais concentrada do que a do ambiente em seu entorno, a este mecanismo da-se o nome de osmorregulação (Evans, 1987). A presença de metais na água é capaz de interferir neste processo perturbando o estado homeostático e possibilitando o surgimento de danos. Particularmente, o chumbo particularmente pode causar uma série de desajustes na fisiologia dos teleósteos dulcícolas, no que diz respeito à tomada de íons (Eisler, 1988).

A captura de íons ocorre principalmente através das brânquias, onde existem células especializadas para esta função, as quais estão tipicamente localizadas na região interlamelar (Evans et al., 2005). Estas são as chamadas células cloreto (CC), as quais possuem inúmeras enzimas, canais e transportadores que atuam na captação ativa dos sais necessários ao funcionamento adequado do organismo, tais como sódio (Na^+), cloreto (Cl^-) e cálcio (Ca^{2+}) (Perry, 1997). Além disso, para evitar a perda desses íons e de outras moléculas importantes pela via paracelular, estão presentes estruturas juncionais que conferem impermeabilidade ao tecido branquial (Evans e Claiborne, 2009). O chumbo é capaz de interferir tanto nos processos de captação quanto na permeabilidade das brânquias, resultando em hemodiluição graças à perda de íons (Rogers et al., 2003). Sua alta afinidade por enzimas transportadoras como a Na^+/K^+ -ATPase (NKA) (Ahern e Moris, 1998; Spokas et al., 2006) e a Ca^{2+} -ATPase (Rogers e Wood, 2004; Atli e Canli, 2007), acaba por impedir suas funções, bloqueando o transporte ativo e a tomada desses íons (MacDonald et al., 2002; Rogers et al., 2005). Na tentativa de reverter os danos causados pela presença do metal, ocorre a liberação de hormônios que atuam na mobilização de reservas energéticas e diferenciação celular nas brânquias (Mancera e McCormick, 2007; Ramesh et al., 2009). Essas novas células surgem com o intuito de compensar a perda iônica sofrida devido à ação do metal sobre os processos osmorregulatórios (McCormick, 2001) e passam a aparecer em maior número nas lamelas branquiais (Dang et al., 2000b).

Ao se ligar às enzimas localizadas nas CC, o chumbo acaba retido nas brânquias, causando a chamada bioacumulação (Tao et al., 1999; Spokas et al., 2006; Schmitt

et al., 2007a). Da mesma forma, tecidos que apresentam um alto metabolismo ou que estão envolvidos nos processos de tomada, transporte e eliminação de xenobióticos, como o fígado, rim e sangue, também são alvos de acúmulo de espécies metálicas (Cicik et al., 2004; Klavins et al., 2009; Palaniappan et al., 2009), acarretando um mau funcionamento do órgão (Rogers et al., 2005; Alves e Wood, 2006; Patel et al., 2006). O chumbo acumulado no sangue também é capaz de interferir de forma negativa na homeostase, pois grande parte do metal que entra nas células sanguíneas se liga a proteínas responsáveis pela síntese da hemoglobina (Hodson et al., 1980; Bergdahl et al., 1998; Skerfving e Bergdahl, 2007), podendo causar desajustes dos parâmetros hematológicos (Ates et al., 2008).

Testes de toxicidade são utilizados para a avaliação dos possíveis danos causados por contaminantes sobre os organismos aquáticos (Martinez e Cólus, 2002, Costa et al., 2008). Nestes testes devem ser utilizados peixes cujos parâmetros que pretende-se analisar sejam bem conhecidos. É desejável que a espécie também tenha uma alta representatividade, importância comercial e ecológica (Costa et al., 2008). O *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecida como curimba ou curimatá, vem sendo bastante utilizada em testes de toxicidade (Camargo et al., 2009; Cazenave et al., 2009; Lombardi et al., 2010). Por se tratar de um animal da região neotropical encontrado apenas em ambientes preservados, pode ser considerada uma espécie sensível à presença de poluentes aquáticos (Martinez e Cólus, 2002; Martinez et al., 2004).

Neste contexto, o presente estudo foi desenvolvido a fim de identificar os padrões de acúmulo de chumbo nos órgãos e eritrócitos e a ação do metal sobre a fisiologia branquial em *P. lineatus* exposto a uma concentração nominal de chumbo de 3 mg.L^{-1} , próximas das já verificadas no ambiente natural. Este trabalho foi realizado no intuito de identificar e quantificar os possíveis prejuízos que a presença de chumbo no ambiente de água doce pode trazer a espécies de teleosteos neotropicais.

Material e Métodos

Testes de toxicidade

Foram utilizados juvenis de *P. lineatus* pesando $7,6 \pm 2 \text{ g}$ e medindo $8,8 \pm 0,8 \text{ cm}$ (média \pm DP, n=116) obtidos na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina. Os peixes foram aclimatados por um período de no mínimo 5 dias com fotoperíodo de claro e escuro de 12/12 h e as condições da água (temperatura, pH, OD e condutividade)

foram monitoradas diariamente. A alimentação foi feita com ração comercial a cada dois dias. Os testes de toxicidade estáticos e agudos foram realizados em aquários de vidro contendo 80 L de água desclorada (controle – CTR) ou 80 L de água com concentração nominal de 3 mg Pb.L⁻¹ sob a forma de Pb(NO₃)₂ (Vetec) (experimental – Pb). Em cada aquário foram colocados de 8 a 10 peixes, que foram amostrados após os períodos de 6, 24 e 96 h.

Amostragem: água

Com intuito de analisar as concentrações de chumbo total e dissolvido a que os peixes foram expostos, foi coletada a água de ambos os aquários (CTR e Pb), nos tempos de 6, 24, 48, 72 e 96 h. Para a análise do chumbo total, a água foi coletada com seringa de vidro e armazenada em tubos plásticos com a adição de 0,5% de ácido nítrico (FMaia). Já para a análise do chumbo dissolvido, as amostras de água foram filtradas (0,45 µm), acidificadas (0,5% HNO₃ -FMaia) e armazenadas. As amostras foram mantidas a 4°C até as análises de chumbo em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA-AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA).

Amostragem: sangue e órgãos.

Os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,12 g.L⁻¹) para a retirada de sangue através da veia caudal com seringa lavada com heparina. O sangue foi guardado em tubos plásticos para as análises hematológicas e as células foram separadas por centrifugação (1870 g, 15 min) para medição de acúmulo de chumbo. Os peixes foram mortos por secção medular para a retirada das brânquias, fígado, rim e músculo. Os arcos branquiais foram lavados com solução salina (NaCl 154 mM e sacarose 25 mM) para a retirada do chumbo adsorvido e para as análises enzimáticas, imunohistoquímicas e análise de acúmulo de chumbo. Para a determinação da Na⁺/K⁺-ATPase, os filamentos foram separados dos arcos e armazenados em tampão SEI (composição em mM: 300 de sacarose, 0,1 de EDTA e 30 de Imidazol) em ultrafreezer a -80°C. Para a verificação da atividade da AC e a análise de acúmulo de chumbo os filamentos e lamelas foram separados dos arcos branquiais e armazenados a seco em tubos plásticos pré-pesados em ultrafreezer. Um arco branquial foi fixado em solução de Bouin (70% ácido pícrico, 25% formol 40% e 5% ácido acético glacial) para a montagem de lâminas histológicas para a análise das células cloreto. O músculo foi

retirado da região entre a cabeça e a nadadeira dorsal a fim de padronizar, e assim como o fígado e o rim, foi guardado a seco em tubos plásticos pré-pesados em freezer -80°C . Os tubos foram novamente pesados antes do congelamento para o conhecimento do peso de cada órgão.

Determinação de chumbo nos tecidos

Os órgãos foram descongelados e transferidos para tubos plásticos previamente lavados com solução de ácido nítrico 0,5% por 24 h, para descontaminação. Os órgãos e células sanguíneas foram submetidos à digestão ácida com ácido nítrico suprapuro (Merck) 1N (5 vezes o peso) em estufa, a uma temperatura constante de 60°C , por 48 h. Após a digestão, foi adicionado 1 mL de ácido nítrico suprapuro 5% (Merck) e o material digerido centrifugado (3.600 g, 20 min). O sobrenadante foi guardado a 4°C por um período máximo de 36 h, para a realização da determinação de chumbo.

Para a análise do Pb nos tecidos utilizou-se uma curva padrão construída a partir de diluições de uma solução padrão de Pb (Specsol) com concentrações de chumbo dissolvido de 0 a $100\ \mu\text{g.L}^{-1}$ diluídos em solução de ácido nítrico 0,5%. As amostras foram analisadas em duplicata em forno de grafite acoplado ao EAA (AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA).

Análises hematológicas: Hematócrito, Hemoglobina e RBC.

O sangue de cada animal foi colocado em um tubo capilar e centrifugado (1.200 g, 5 min) em centrífuga de micro-capilar, para a separação das células e do plasma para a estimativa de porcentagem de células sanguíneas (hematócrito). Um volume de sangue foi adicionado ao tampão formol citrato (citrato de sódio diluído em 0,4% de formol em solução) para a contagem do número de eritrócitos (RBC) em câmara de Neubauer ao microscópio óptico. O conteúdo de hemoglobina foi estimado pelo método colorimétrico com cianeto da meta-hemoglobina (HiCN) utilizando-se kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro (540 nm, Libra S32, Biochrom, Reino Unido). Após as análises hematológicas, o sangue foi centrifugado (1870 g, 15 min) e o plasma separado e congelado a -20°C . O resultado de hematócrito foi expresso em porcentagem, a hemoglobina em gramas por decilitro (g.dL^{-1}), e o RBC em número de células por milímetro cúbico ($\text{n}^{\circ}\ \text{céls.mm}^{-3}$).

Análises metabólicas e endócrinas: Glicose e Cortisol.

A glicose plasmática foi determinada pelo método da glicose oxidase com kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro de microplacas (505 nm, Victor 3, Perkin Elmer, USA). O cortisol foi medido por imunoenensaio com a utilização de kit comercial (Diagnostic Systems Laboratories Inc., USA) em leitora de microplacas (450 nm, ELX 800, BioTek, USA). O resultado de glicose foi expresso em mg.dL^{-1} e o de cortisol em $\mu\text{g.dL}^{-1}$.

Análises da osmolaridade e concentrações iônicas (Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+}).

A osmolaridade foi medida por congelamento usando um osmômetro (Osmomat 030, Gonotec, Alemanha). As análises de sódio e potássio plasmáticos foram realizadas com amostras de plasma diluídas em água deionizada, em fotômetro de chama (900, Analyser, Brasil), e expressas em relação a curvas padrões de NaCl (de 0,35 a 2,8 mM) e KCl (de 0,0125 a 0,1 mM), respectivamente. O íon cloreto foi determinado pelo método do tiocianato de mercúrio com auxílio de kit comercial (Labtest, Brasil) em espectrofotômetro de microplacas (470 nm, Victor 3, Perkin Elmer, USA). O íon cálcio foi analisado em amostras de plasma diluídas, utilizando-se o óxido de lantânio como modificador, em EAA (AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA). A concentração de cálcio no plasma foi expressa baseada em uma curva padrão de cálcio (Specsol – de 0,5 a 25,0 mg.L^{-1}). O resultado de osmolaridade foi expresso em mOsm.L^{-1} , e os íons em mM.

Análises enzimáticas: Na^+/K^+ -ATPase e Anidrase Carbônica.

Os filamentos branquiais separados dos arcos foram homogeneizados em solução SEI (1:10 pv) e centrifugados (7500 g, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi usado para medir a atividade da NKA, segundo o protocolo estabelecido por Quabius et al. (1997). Neste método, mede-se a atividade da enzima de modo indireto, através da produção de fosfato inorgânico proveniente da quebra de ATP, em amostras incubadas com KCl (que estimula a atividade da NKA) e com ouabaína (inibidor da NKA). E como padrão foi utilizada uma

solução de fósforo 650 μM (Sigma). Os ensaios foram realizados em leitora de microplacas (620 nm, ELx 800, BioTek, USA), como adaptado por Nolan (2000).

Para a determinação da atividade da enzima anidrase carbônica (AC), os filamentos branquiais foram homogeneizados com solução tampão (composição em mM: 225 de manitol, 75 de sacarose, 10 de TRIS e 10 de NaH_2PO_4 , pH 7,4) e centrifugados (7500 g, 15 min, 4°C). Uma quantidade do sobrenadante foi adicionada ao mesmo tampão e a uma solução de água saturada de CO_2 . A redução do pH foi monitorado por um tempo de 20 s. O método foi estabelecido por Vitale et al. (1999) e baseia-se na catálise de uma solução saturada de CO_2 com correspondente liberação de H^+ , e conseqüente redução do pH.

A concentração de proteínas no homogeneizado branquial foi quantificada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão. A NKA foi expressa em $\mu\text{MPi} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e a AC em $\text{AC} \cdot \text{g ptn}^{-1}$.

Análises imunohistoquímicas: Células Cloreto

As brânquias foram fixadas em Boiun por um período de 6 a 8 h e armazenadas em álcool 70% até o início do processamento histológico. Procedeu-se a desidratação alcoólica com uma série crescente de etanol, diafanização em xilol e posterior impregnação com parafina. Os blocos contendo um arco branquial foram cortados sagitalmente (8 μm de espessura) e foram colocados de 6 a 12 cortes por lâmina. Em seguida foi aplicada a técnica imunohistoquímica para a marcação das CC usando anticorpos contra a NKA, como descrita por Dang et al. (2000a). As lâminas foram incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo para NKA (IgG α 5, Development Studies Hydrion Bank, University of Iowa, USA) e com o segundo anticorpo Goat Anti-mouse Ig Peroxidase conjugated (GAMPO, Sigma). Em seguida, utilizou-se tampão tris-salino (0,5 M tris-base, pH 7,4) contendo diaminobenzidine (DAB-Ni) e peróxido de hidrogênio para conferir a coloração das CC, dando seqüência à desidratação e montagem das lâminas.

A análise das lâminas para contagem das CC foi feita em microscópio óptico (DM2500, Leica, Alemanha) com auxílio de um *software* para análise de imagens (Leica Qwin, Alemanha). Para cada peixe foram medidos 5 filamentos aleatórios dos quais foram contadas todas as CC, diferenciando-as por sua localização (filamento/lamela). O resultado foi expresso em número de CC por mm de filamento ($\text{n}^\circ \text{cél} \cdot \text{mm}^{-1}$).

Análise estatística

Os resultados estão expressos na forma de média \pm EP. Os valores médios obtidos de cada parâmetro para cada tratamento (CTR e Pb), foram comparados entre si para cada um dos tempos experimentais (6, 24 e 96 h) usando teste *t* ou Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). As concentrações de chumbo nos tecidos também foram comparadas entre os tempos experimentais usando análise de variância fator único (ANOVA) ou teste de Kruskal- Wallis, de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Foram considerados estatisticamente diferentes, valores de $P < 0,05$.

Resultados

Dos 116 peixes utilizados durante todo o experimento, 6 peixes morreram. Sendo 1 animal no grupo controle de 6 h, 1 do grupo exposto ao chumbo por 24 h e 4 peixes experimentais morreram entre 72 e 96 h. Os valores de oxigênio dissolvido, temperatura, pH e condutividade da água, estão apresentados na Tabela 1. Os valores de dureza se mantiveram em $41,3 \pm 5,5 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. A concentração média de chumbo encontrada nos aquários foi de $2,24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de chumbo total e de $1,18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de chumbo dissolvido, mas esta concentração mostrou uma ampla variação com o decorrer do experimento. O chumbo total que se inicia com valores de $3,351 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ passa a apresentar 42% deste valor com o passar de 96 h. Da mesma forma, o chumbo dissolvido que inicialmente era de $1,689 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ em 96 h, mantém apenas 41% da concentração inicial (Tabela 2). A concentração média de chumbo dissolvido apresentou em torno de 53% da concentração de chumbo total. Nos aquários controle, a concentração de chumbo total não passou de $0,13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ou não foi detectada.

Tabela 1 – Características físicas e químicas da água durante os testes com *Prochilodus lineatus*. O período de aclimação é representado pela letra A.

Tempo (horas)	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)	Temperatura (° C)	pH	Condutividade (µS.cm ⁻¹)
A	7,4 ± 0,3	23,6 ± 0,5	7,4 ± 0,1	336,4 ± 6,8
6	7,1 ± 0,3	23,0 ± 0,4	7,4 ± 0,1	63,5 ± 1,2
24	7,0 ± 0,1	21,5 ± 0,2	7,3 ± 0,1	56,8 ± 0,4
96	6,2 ± 0,2	26,5 ± 0,2	7,5 ± 0,1	70,2 ± 0,9

Valores indicam a média ± EP.

Tabela 2 – Concentrações de chumbo total e dissolvido (mg.L⁻¹) nos aquários controle (CTR) e experimental (Pb) medidas a partir da 6^a hora e a cada 24 h.

Tempo (h)	CTR		Pb	
	Total	Dissolvido	Total	Dissolvido
6	0,13 ± 0,01	N/D	3,35 ± 0,04	1,69 ± 0,02
24	0,08 ± 0,02	0,03 ± 0,02	2,51 ± 0,02	1,77 ± 0,05
48	-	-	2,52 ± 0,03	0,97 ± 0,03
72	-	-	1,43 ± 0,01	0,80 ± 0,01
96	N/D	N/D	1,43 ± 0,03	0,70 ± 0,01

Valores indicam média ± EP. N/D: valores não detectados.

Acúmulo tecidual de chumbo

Os resultados deixam clara a ocorrência de acúmulo significativo de chumbo em todos os órgãos analisados dos peixes experimentais. Porém, este acúmulo ocorre de forma distinta nos diferentes tecidos e células. O padrão de acúmulo de chumbo nos órgãos e células de juvenis de *P. lineatus* após exposição aguda independe do tempo de exposição e segue a seguinte ordem decrescente:

Rim > Brânquias > Fígado > Eritrócitos > Músculo

O músculo foi o tecido que apresentou a menor concentração de metal e manteve os níveis entre 0,15 e 0,22 µg Pb.g tec⁻¹ desde as primeiras horas de exposição, enquanto a média dos peixes controle manteve-se em de 0,05 ± 0,008 µg Pb.g tec⁻¹ (Figura

1A). Os eritrócitos e o fígado apresentaram um acúmulo gradual de metal com o decorrer do tempo. Os valores médios de chumbo nos eritrócitos iniciaram-se em $0,64 \pm 0,1 \mu\text{g Pb.g tec}^{-1}$ e atingiram cerca de 4 vezes este valor em 96 h (Figura 1B), ao passo que no fígado, o acúmulo do metal diferiu significativamente em todos os tempos, variando de $1,98 \pm 0,5 \mu\text{g Pb.g tec}^{-1}$ em 6 h, a quase 5 vezes este valor após exposição por 96 h (Figura 1C). Para os peixes dos experimentos controles, a média de chumbo foi de $0,05 \pm 0,008 \mu\text{g Pb.g tec}$ para os eritrócitos e $0,12 \pm 0,02 \mu\text{g Pb.g tec}$ para o fígado. Em oposição ao aumento encontrado para o fígado, a concentração de chumbo branquial aumentou apenas até a 24ª hora, quando atingiu $27,5 \pm 3,9 \mu\text{g Pb.g tec}^{-1}$, 5 vezes mais do que o apresentado em 6 h (Figura 1D). Já os valores para os peixes controle apresentaram uma média de $1,73 \pm 0,5 \mu\text{g Pb.g tec}^{-1}$. Mas o maior nível de chumbo ($110 \pm 18,2 \mu\text{g Pb.g tec}^{-1}$) retido foi encontrado no rim após 96 h de exposição ao metal, sendo quatro vezes maior do que o encontrado em 24 h, e oito vezes o encontrado em 6 h (Figura 1E). Por sua vez, a concentração de chumbo no tecido renal dos peixes expostos apenas à água (CTR) apresentou valor médio de $0,67 \pm 0,1 \mu\text{g Pb.g tec}^{-1}$.

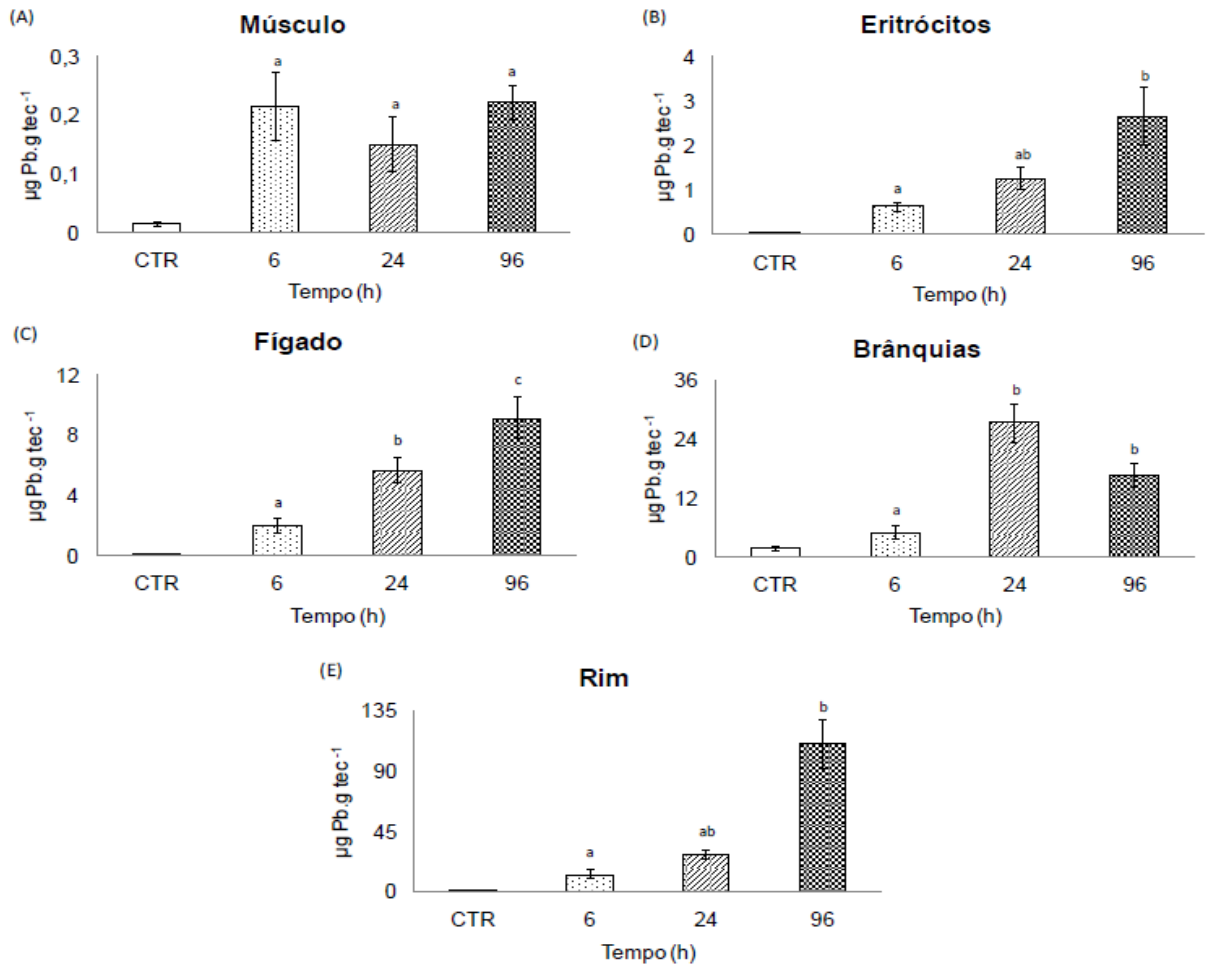


Figura 1 – Concentração de chumbo (média ± EP) nos órgãos e células de *P. lineatus* expostos ao chumbo por 6, 24 e 96 h. Todos os tempos experimentais diferem significativamente dos controles.

Parâmetros hematológicos

Todos os três parâmetros analisados quanto aos índices hematológicos mantiveram-se inalterados no decorrer dos experimentos (Figura 2). O conteúdo de hemoglobina do sangue, o número de células vermelhas (RBC) e o hematócrito dos peixes expostos ao chumbo não apresentaram alterações significativas durante todo o período experimental. A concentração de hemoglobina apresentou valor médio de $6,7 \pm 0,26$ g.dL nos peixes controle e $7,2 \pm 0,44$ g.dL, nos peixes expostos ao chumbo. A média de células vermelhas no sangue dos peixes experimentais foi de $2,1 \cdot 10^6 \pm 0,12$ por mm^3 , enquanto nos controles foi de $2,1 \cdot 10^6 \pm 0,13$ por mm^3 . Considerando todos os valores experimentais, o hematócrito variou de 24 a 33%, com valor médio de $29,9 \pm 0,8\%$.

Parâmetros metabólicos e endócrinos

A glicemia dos peixes expostos ao chumbo foi significativamente maior do que daqueles expostos somente a água nos tempos de 6 (aumento de 78%) e 24 h (aumento de 80%), com posterior retorno aos níveis iniciais no tempo de 96 h (Figura 3A). No entanto, os níveis de cortisol plasmático não acompanharam o aumento de glicose (Figura 3B) e não sofreram alterações significativas em qualquer tempo experimental.

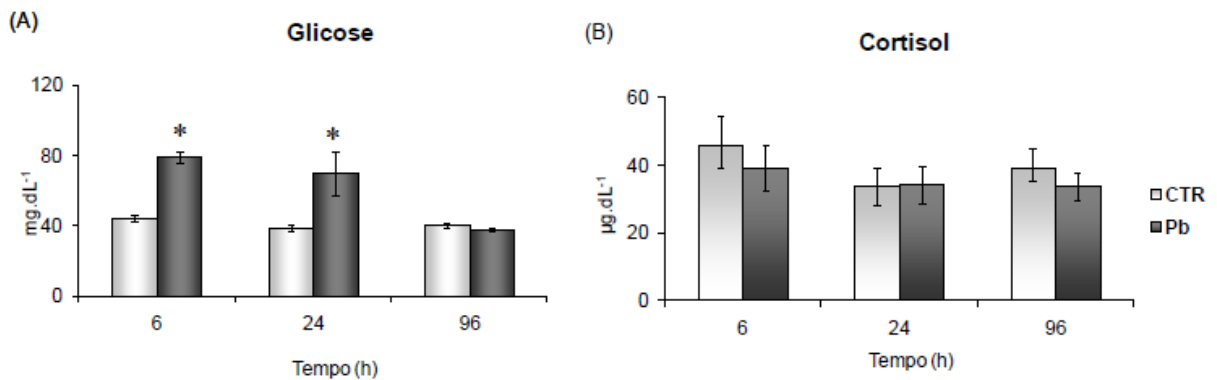


Figura 2 – Concentração de glicose (A) e cortisol plasmáticos (B) de *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo (Pb) ou apenas à água (CTR) por 6, 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o DP.

* indica diferença significativa em relação ao grupo CTR para cada tempo experimental ($P < 0,05$).

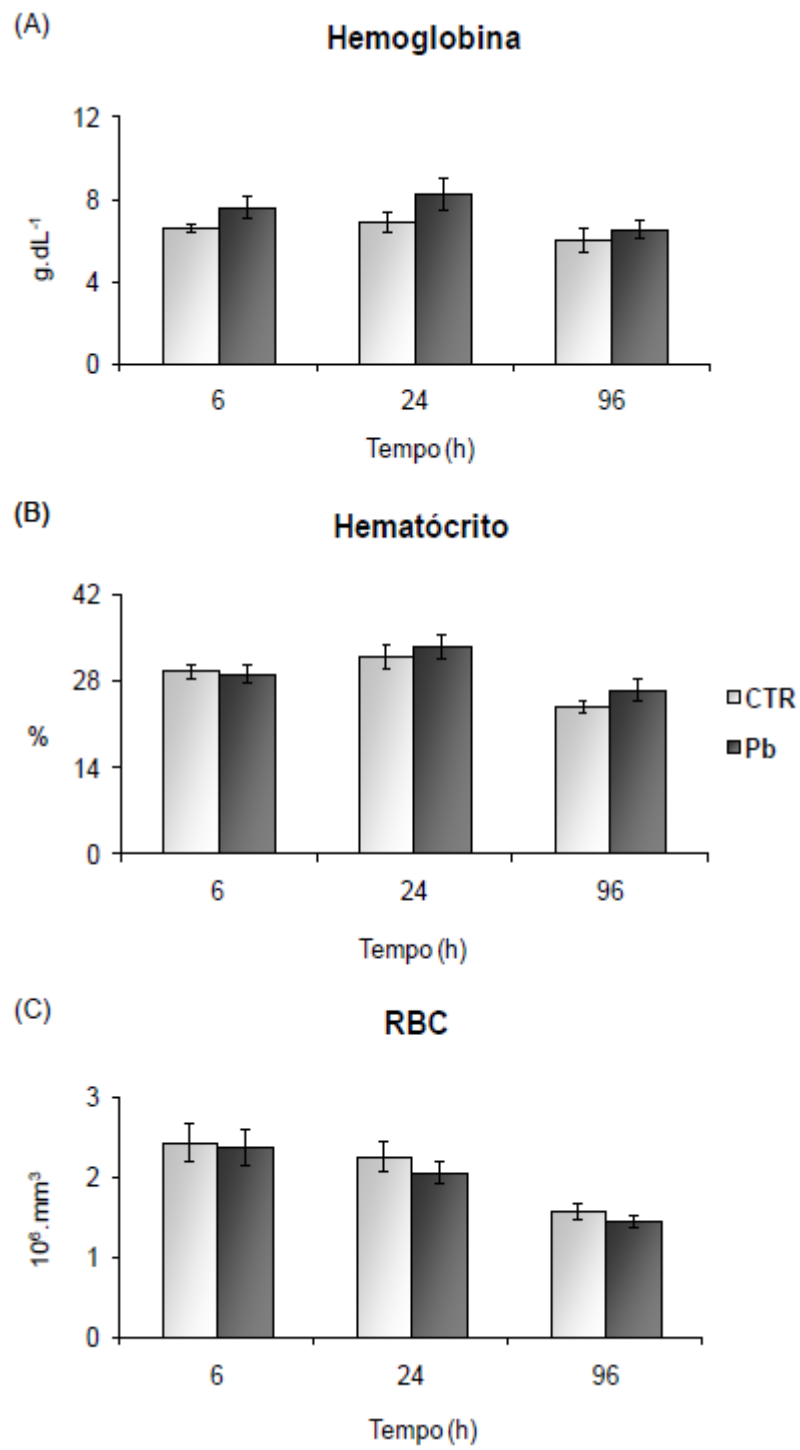


Figura 3 – Concentração de hemoglobina (A), hematócrito (B) e número de células vermelhas (C) de *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo ou somente à água por 6, 24 e 96 h. As barras indicam as médias e as linhas verticais o DP. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Parâmetros osmo-iônicos

A análise da osmolaridade e da concentração de íons plasmáticos mostraram que o chumbo promoveu alterações significativas da osmolaridade após 6 h (decréscimo de 10%) de exposição (Figura 4A). Também foram observadas diminuições significativas da concentração de sódio plasmático em 6 e 96 h (22 e 8%, respectivamente) (Figura 4B) e de cloreto em 24 h (15% menor que o controle) (Figura 4D). Em contrapartida, os níveis de potássio apresentaram-se significativamente aumentados em todos os tempos de exposição ao metal (690, 125 e 42%, após 6, 24 e 96 h, respectivamente) (Figura 4C). Por sua vez, a concentração de cálcio plasmático dos peixes expostos ao chumbo sofreu redução em todos os tempos experimentais quando comparada àquela dos peixes controle (Figura 4E).

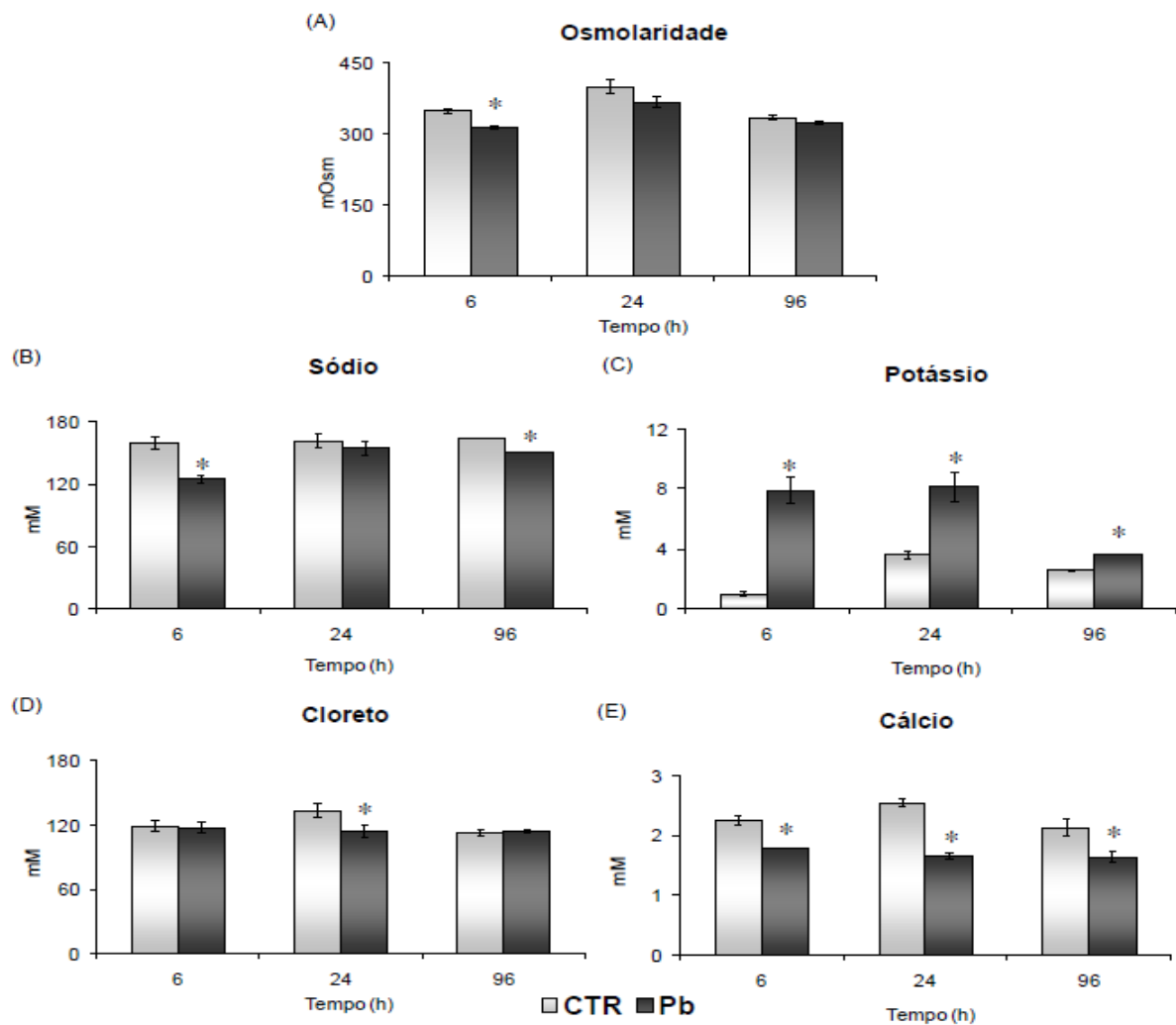


Figura 4 – Osmolaridade (A) e concentrações plasmáticas de sódio (B), potássio (C), cloreto (D) e cálcio (E) em *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo (Pb) ou apenas à água (CTR) por 6, 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o DP. * indica diferença significativa em relação ao grupo CTR para cada tempo.

Parâmetros enzimáticos

A atividade da NKA começa a apresentar uma tendência a diminuição após 6 h de exposição ao chumbo, mas este declínio apenas se torna significativo após a 24ª hora de experimento com decréscimo de 55% da atividade (Figura 5A). Após 96 h, no entanto, a enzima mostra uma recuperação de 102% de sua atividade nos peixes expostos ao Pb. Em contrapartida, a anidrase carbônica não teve sua atividade significativamente afetada pela presença de chumbo na água em nenhum dos tempos de exposição analisados, apesar de sua atividade mostrar uma tendência de redução em todos os tempos experimentais (Figura 5B).

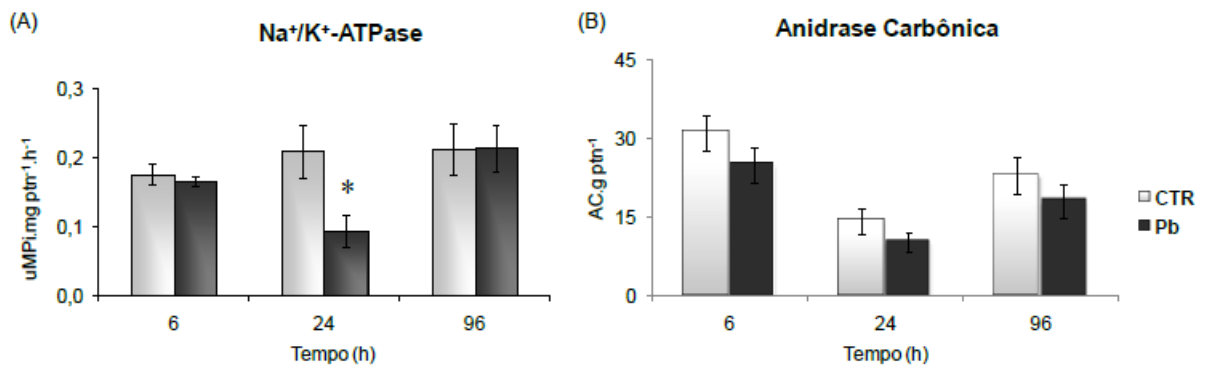


Figura 5 – Atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (A) e anidrase carbônica (B) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo (Pb) em relação aos expostos apenas à água (CTR) por 6, 24 e 96 h. * indica diferença significativa em relação ao grupo CTR para cada tempo experimental ($P < 0,05$).



Figura 6 – Fotomicrografia da localização das células cloreto através da técnica de imunohistoquímica para a enzima Na⁺/K⁺-ATPase em *Prochilodus lineatus* expostos à água (A) ou ao Pb (B) por 24 h. 40 X de aumento, as barras correspondem a 20 μ m.

Parâmetros celulares

As CC nas brânquias de *P. lineatus* apresentam-se tipicamente na região interlamelar dos filamentos, com eventuais ocorrências nas lamelas (Figura 6A). Os peixes expostos ao chumbo apresentaram um maior número de CC nas lamelas branquiais (Figura 6B), em todos os tempos experimentais, quando comparados aos seus respectivos controles. Entretanto, apenas no tempo experimental de 6 h este aumento foi grande o suficiente para determinar um número total de CC superior (Figura 7).

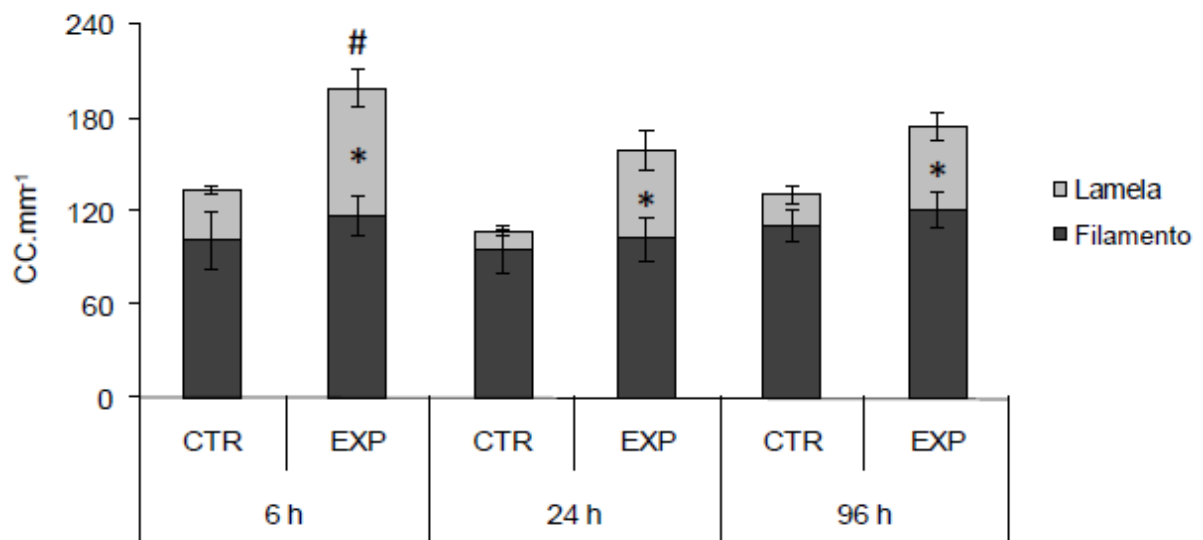


Figura 7 – Número total e distribuição de células cloreto (CC) nas lamelas e filamentos branquiais de *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo (EXP) ou apenas à água (CTR) por 6, 24 e 96 h. As barras indicam a média de células segundo sua localização, e as linhas verticais, o EP. * indica diferença estatística significativa das CC nas lamelas e # indica diferença das CC totais dos respectivos CTR ($P < 0,05$).

Discussão

A concentração de chumbo utilizada neste trabalho reflete condições encontradas no ambiente natural segundo relatado por Yabe e Oliveira (1998) em seu estudo realizado na bacia do ribeirão Cambé (Londrina-PR-Brasil) ou por Almeida e colaboradores (2005), que analisaram as concentrações metálicas em sedimentos no mesmo local. Este teor de chumbo representa apenas 3,5% da CL50 96h relatada por Martinez et al. (2004) para *P. lineatus*, mas que já é suficiente para interferir nos processos osmorregulatórios desta espécie, com conseqüente desbalanço iônico (Ribeiro e Martinez, dados não publicados). Para as

características da água utilizada nos testes de toxicidade, a fração do chumbo que se apresenta dissolvida corresponde a cerca de 50% da concentração de chumbo total (Tabela 2). A concentração de chumbo dissolvido encontrada reflete a interação da quantidade total de metal presente na água com as características físicas e químicas da mesma. E dentre os parâmetros mais importantes para a determinação da solubilidade de um metal está a dureza da água, sendo que a concentração de metal dissolvido será sempre inversamente proporcional à dureza (Paquim et al., 2000; Rathore e Khangarot, 2003).

A redução das concentrações de chumbo na água ao longo do tempo é um fato esperado, uma vez que precipitação, adsorção e absorção são fenômenos comuns a espécies metálicas (Paquim et al., 2000, 2002; Martinez et al., 2004). A absorção de metais pela biota em especial, e a consequente bioacumulação, vem sendo exaustivamente estudada (Tao et al., 1999; Storelli et al., 2005; Spokas et al., 2006; Schmitt et al., 2007a), pois uma vez no interior do animal, o chumbo pode desencadear inúmeros desajustes fisiológicos com consequente comprometimento da homeostase (Ay et al., 1999; Rogers et al., 2003; Grosell et al., 2006; Alves e Wood, 2006).

Diversos órgãos e tecidos podem acumular os metais em diferentes níveis que variam de acordo com a espécie metálica, sua concentração e tempo de exposição (Rogers et al., 2003; Rogers e Wood, 2004; Huang et al., 2007), com o metabolismo da espécie animal exposta ao metal (Huang et al., 2007), com a interação com outros metais (Cicik et al., 2004) e com as condições físicas e químicas da água (Carvalho et al., 2004; Huang et al., 2007). Em geral, após exposição aguda, órgãos com uma maior atividade metabólica tendem a acumular mais metais em decorrência da presença de proteínas envolvidas em sua eliminação, as metalotioneínas (MT) (Cicik et al., 2004; Klavins et al., 2009; Palaniappan et al., 2009). Este é o caso do fígado, brânquias e rim, por sua vez, os tecidos duros, como ossos e dentes, são detentores de uma maior concentração de metais na ocorrência de exposição crônica (Alves e Wood, 2006).

A distribuição de chumbo encontrada no primeiro tempo experimental (rim > brânquia > fígado > eritrócitos > músculo) se manteve em todos os demais (Figuras 1A-E). Da mesma forma, estudos realizados com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresentaram semelhanças após exposição ao chumbo por 7 e 15 dias, com igual padrão de acúmulo de chumbo para os mesmos órgãos testados no presente trabalho (Cicik et al., 2004). Por outro lado, no mesmo estudo, o cádmio diferiu em termos de acúmulo, fazendo-se mais presente no fígado do que nas brânquias, mas na associação dos dois metais, o chumbo manteve seu padrão de acúmulo. Ay e colaboradores (1999) também descrevem a mesma

distribuição de metal para brânquias, fígado e músculo, enquanto para o cobre o fígado é sensivelmente mais atingido do que as brânquias. Contudo outras espécies de teleósteos também submetidas à exposição aguda ao chumbo podem diferir quanto ao nível do metal acumulado em cada órgão, a exemplo da espécie asiática *Catla catla*, que apresentou a seguinte distribuição: rim > fígado > brânquia > músculo (Palaniappan et al., 2009); ou da carpa comum (*Cyprinus carpio*) com o padrão: brânquia > rim > fígado > músculo (Huang et al., 2007). Estes estudos comprovam que além da espécie metálica presente na água, também a espécie animal mostra-se como fator determinante na acumulação do metal para cada órgão.

Desde as primeiras horas de exposição ao chumbo, o rim apresentou-se como o órgão que mais acumulou o metal (Figura 1E), sendo que seu acúmulo em 6 h de exposição foi 2,5 vezes maior do que o acumulado durante o mesmo período nas brânquias, o segundo órgão mais importante em termos de acúmulo. Em 96 h este aumento foi quase 500 vezes maior do que o acumulado no músculo, o tecido que menos acumulou chumbo. O rim tem importante papel relacionado com a excreção de substâncias tóxicas (Streit, 1998) e por esta razão é comumente afetado pela presença das mesmas por meio da circulação sanguínea. Muito do chumbo que entra no corpo é eliminado através da urina (Alves e Wood, 2006), após passar por filtração glomerular (Palaniappan et al., 2009). O rim apresenta um papel essencial no balanço de eletrólitos e água e na manutenção de um ambiente interno estável (Palaniappan et al., 2009). Portanto, o acúmulo de metal neste órgão pode ocasionar seu mau funcionamento. Por sua função de reabsorção de íons e outros elementos, inúmeros canais, transportadores e enzimas podem ser encontrados nas células renais (Hwang e Lee, 2008), muitos dos quais possuem uma alta afinidade por metais como o chumbo (Patel et al., 2006). Análises de acúmulo de chumbo nas porções distintas do rim mostraram que o rim posterior retém mais metal do que o anterior, em decorrência de seu maior envolvimento na reabsorção de íons (Alves e Wood, 2006). Devido às suas funções, o rim é um órgão de alta atividade metabólica e capaz de produzir as MT, que atuam como protetoras da ação dos metais (Cicik et al., 2004). Estudos histopatológicos já indicaram que a presença de chumbo também pode induzir a formação de corpos de inclusão nas células dos túbulos renais de ratos (Moore e Goyer, 1974) e aves (Locke et al., 1966). Estes corpos são também formações protéicas que visam impedir que o chumbo continue em circulação, e foi uma das razões descritas por Patel et al. (2006) para a ocorrência de uma grande quantidade de chumbo no rim de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) após exposição aguda ao chumbo. Em decorrência destes dois processos, muito do chumbo circulante pode ser retido no rim para evitar prejuízo a outros

órgãos, o que explicaria os altos níveis renais do metal encontrados neste estudo, bem como o expressivo aumento no decorrer do tempo.

O acúmulo de chumbo no fígado foi marcado por sucessivos aumentos em todos os tempos experimentais (Figura 1C), podendo ser um indicativo de que o equilíbrio ainda não foi alcançado. O fígado acumula metal graças a seu papel de órgão de estoque e detoxificação (Nussey et al., 2000; Klavins et al., 2009; Palaniappan et al., 2009), e invariavelmente acumulará chumbo, caso este esteja presente no corpo do animal. Schmitt e colaboradores (2007a) detectaram que 99,5% dos peixes coletados em áreas contaminadas apresentaram chumbo armazenado neste órgão. Assim como o rim, o fígado apresenta uma alta atividade metabólica, e por este motivo torna-se um órgão- alvo com alta afinidade para o acúmulo de contaminantes em geral. Além disso, a produção de MT é descrita como um dos possíveis motivos de acumulação de metais pelo fígado (Cicik et al., 2004). Este fato foi demonstrado pela exposição de *P. scrofa* (= *lineatus*) ao cobre, que apresentou uma alta produção dessas proteínas pelo fígado (Carvalho et al., 2004). A análise do tecido hepático como biomarcador de chumbo mostra-se eficiente e desejável, pois além de parte deste metal necessariamente ficar retido neste órgão, ele é ainda capaz de refletir a concentração ambiental do metal. O acompanhamento de peixes residente de áreas contaminadas ao longo de duas décadas apontaram para a redução de chumbo acumulado no fígado em resposta à menor concentração do metal na água (Klavins et al., 2009). Deste modo é possível que além de reter o chumbo visando a proteção do organismo, o fígado ainda seja capaz de reduzir a concentração de metal acumulado, com o declínio de oferta do mesmo. Esta eliminação do metal se dá como um processo de “auto-depuração”, e possivelmente esteja ocorrendo através das fezes (Alves e Wood, 2006).

Grande parte dos estudos realizados com acúmulo de metais em teleósteos de água doce traz o músculo como o tecido com menor poder de acumulação dos mesmos (Cicik et al., 2004; Alves e Wood, 2006; Klavins et al., 2009). O valor da concentração de chumbo atingida no músculo no período inicial manteve-se inalterada ao longo de todos os demais tempos experimentais (Figura 1A), podendo ser um indicativo de que a capacidade de retenção de metal deste tecido já é alcançada desde as primeiras horas de exposição ou que outros mecanismos de regulação entram em ação. Para *Pimephales promelas* exposto cronicamente ao chumbo, a estabilização é alcançada a partir do 10º dia (Grosell et al., 2006). Deve-se ressaltar, no entanto, que o volume total de tecido muscular é muito maior do que o restante dos órgãos analisados, o que estaria favorecendo a dissipação do metal por todo o corpo do animal (Palaniappan et al., 436 2009). Em estudos realizados para verificar a

quantidade total de chumbo acumulado pelo peixe, o tecido muscular se mostrou responsável por 12% do metal acumulado (Alves e Wood, 2006). Além disso, a importância do monitoramento deste tecido baseia-se no fato de o músculo, juntamente com a pele, serem os tecidos mais comumente utilizados na alimentação humana (Nussey et al., 2000). Contudo, a análise isolada deste tecido não deve ser encarada como única ferramenta de biomonitoramento, uma vez que as concentrações de chumbo, ainda que presentes na água e em outros tecidos, podem permanecer abaixo dos limites de detecção no músculo, como já verificado para *P. lineatus* e *Pterodoras granulosus* (Villar et al., 2001).

As brânquias apresentaram um rápido acúmulo de chumbo durante os tempos iniciais (6 e 24 h) que se manteve inalterado após 96 h (Figura 1D). Grosell e colaboradores (2006) também observaram o aumento rápido de chumbo nas brânquias, mas que, ao contrário da estabilização verificada neste trabalho, manteve-se aumentado a uma taxa mais baixa durante a exposição crônica. Foi demonstrado que o chumbo acumulado nas brânquias da truta arco-íris decai com o passar do tempo como possível resultado do processo de depuração (Alves e Wood, 2006). É possível que também a espécie *P. lineatus*, utilizada neste estudo, apresente estratégias adaptativas para tentar eliminar o metal acumulado em determinados tipos celulares, da mesma forma que demonstrado para o alumínio (Camargo et al., 2009). O acúmulo de chumbo nas brânquias se deve ao seu íntimo contato com o ambiente e a sua função de captação iônica (Nussey et al., 2000; Rogers et al., 2003; Klavins et al., 2009; Palaniappan et al., 2009), uma vez que os agentes responsáveis pelo transporte de íons possuem, da mesma forma que nos rins, uma alta afinidade por este metal. A entrada do chumbo nas células branquiais também pode ocorrer em decorrência do micro-ambiente formado ao redor do epitélio, que favorece a dissociação do metal aderido a outras partículas, devido ao baixo pH gerado pela regulação ácido-base (Tao et al., 1999). O chumbo é então transferido para o muco que é produzido em abundância frente à situação de estresse (Cicik et al., 2004), e dali entra nas células através de canais ou por processos fagocitóticos (Tao et al., 1999).

Após atravessar o epitélio branquial, o chumbo alcança o sangue e adentra os eritrócitos. Quase 99% do chumbo presente no sangue total encontra-se no interior dos eritrócitos (Alves e Wood, 2006). Dentro da célula sanguínea, diversas proteínas são alvos para o chumbo. Entretanto, existe uma marcada preferência desse metal (entre 35 e 80%) em se ligar à enzima α -aminolevulínico desidratase (ALAD) (Bergdahl et al., 1998). A quantidade de chumbo que pode se associar à ALAD é limitada, não permitindo aumento indefinido de chumbo no sangue (Skerfving e Bergdahl, 2007). Contudo, é possível que a

“capacidade suporte” dos eritrócitos dos peixes expostos ao chumbo neste estudo ainda não tenha sido atingida, uma vez que os resultados obtidos para o metal acumulado nos eritrócitos revelam que os níveis do metal quadruplicam entre 6 e 96 h de exposição (Figura 1B). Bergdahl e colaboradores (1998) descrevem que em cada molécula de ALAD podem se ligar até seis átomos de chumbo, mas que dois átomos já são suficientes para reduzir sua atividade pela metade.

A ALAD é uma enzima presente nas células sanguíneas que está envolvida na produção de hemoglobina, cuja atividade é bastante sensível à presença de chumbo (Hodson et al., 1980; Costa et al., 2007; Schmitt et al., 2007b; Kutlu e Sümer, 2008). A inibição desta enzima pode acarretar em redução da produção da hemoglobina seguida da redução dos outros índices hematológicos, como o hematócrito e o número de células vermelhas circulantes (Ates et al., 2008). No entanto, as análises hematológicas realizadas para a espécie estudada não demonstraram que o sangue tenha sofrido interferência da presença de chumbo (Figuras 2A-C). Da mesma maneira, a exposição aguda de *P. lineatus* a concentrações superiores do mesmo metal não causou alterações no hematócrito (Martinez et al., 2004). Assim, a exposição aguda de teleósteos de água doce ao chumbo não parece ser suficiente para causar interferências sobre os parâmetros hematológicos, uma vez que a exposição da truta arco-íris por 96 h (Rogers et al., 2003) ou a ingestão de chumbo pela dieta (Alves et al., 2006) também não causaram alteração significativa de nenhum dos parâmetros hematológicos. As alterações decorrentes da inibição da atividade da ALAD são mais perceptíveis após exposição crônica ao chumbo (Hodson et al., 1980). Em decorrência da exposição ao chumbo, pode ocorrer também a morte prematura das células sanguíneas (Bloom e Brandit, 2008), acarretando em extravazamento de íons potássio com consequente alteração de suas concentrações no plasma. Alterações desta natureza, foram verificadas no presente estudo. No entanto, estas possivelmente não estão associadas à morte de células sanguíneas uma vez que todos os parâmetros hemtaologicos mantiveram-se inalterados.

Deste modo, alterações verificadas nas concentrações plasmáticas de potássio, assim como dos íons sódio, cloreto e cálcio, devem ter outra origem que não a morte celular, uma vez que a presença do chumbo abrange uma série de outros desajustes da homeostase em peixes de água doce (Evans, 1987; Martinez e Cólus, 2002; Mishra e Jain, 2009), incluindo a interferência sobre o processo de captação de sais que mantém o balanço iônico (MacDonald et al., 2002; Rogers et al., 2005). Alterações nas concentrações de íons plasmáticos foram verificadas em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) após exposição aguda ao chumbo, às quais foram atribuídas à interferência do metal, entre outras coisas,

sobre os processos de captação iônica (Rogers et al., 2003, 2005). Da mesma forma, outros estudos demonstraram que a exposição de teleósteos de água doce ao chumbo pode resultar em inibição da atividade da NKA (Ay et al., 1999; Rogers et al., 2003, 2005; Atli e Canli, 2007; Torre et al., 2007).

A NKA, presente em grande quantidade na região basolateral das CC nas brânquias, é a principal responsável por gerar o gradiente eletroquímico que favorece a entrada de íons para o sangue nos teleósteos de água doce. Três íons sódio são retirados pela NKA da CC para o plasma, em troca de apenas dois íons potássio, o movimento de um maior número de cargas positivas para fora da célula do que para dentro, acaba por gerar um gradiente elétrico, que favorece a entrada de cátions. Além disso, um gradiente químico também é gerado permitindo a entrada de novos átomos de sódio. O trabalho de captação de íons do meio é realizado por transportadores e/ou canais localizados na região apical das CC contra um gradiente de concentração, uma vez que esses átomos são retirados de um ambiente de baixa concentração e movidos para um ambiente com uma grande quantidade das mesmas. Assim, é necessária a introdução de uma fonte energética, proveniente da quebra de uma molécula de ATP (Evans, 2008). Para a fosforilação do ATP faz-se necessária a presença dos íons magnésio (Mg^{2+}) e sódio (Na^{2+}) no meio intracelular, o Mg^{2+} atuará como cofator para o acoplamento da molécula de ATP em seu respectivo sítio de ligação (Rose e Valdes, 1994; Bijvelds et al., 1998).

A redução de mais de 50% da atividade da NKA causada pelo chumbo nas primeiras 24 h de experimento, e a posterior recuperação aos níveis normais após 96 h de exposição (Figura 4A) sugerem que o organismo esteja respondendo à ação do metal sobre os processos de osmorregulação. Pesquisas sugerem que aja uma interferência do cobre sobre os sítios de ligação destinados ao Mg^{2+} impedindo que ocorra a fosforilação, e, desta forma, o transporte iônico (Sampaio et al., 2008) e há suspeitas de que o chumbo atue de maneira similar (Ong e Lee, 1980). Uma vez que a atividade da NKA esteja prejudicada, a captação de sais passa a ser deficiente e a concentração de íons no plasma é alterada. Na tentativa de reverter os prejuízos causados pelo chumbo sobre a hiperregulação, alguns hormônios entram em ação. A prolactina é o principal hormônio regulador da osmorregulação em teleósteos de água doce (Evans, 2008) e sua produção está relacionada com a redução da osmolaridade ambiental e ao declínio dos níveis de sódio no plasma (Kaneko e Hirano, 1993). Em conjunto com a prolactina também age o cortisol, hormônio relacionado ao estresse, responsável pela mobilização de reservas energéticas e capaz de estimular a diferenciação de CC nas brânquias

(Foskett et al., 1983; Mommsen et al., 1999; Dang et al., 2000a; McCormick, 2001; Mancera e McCormick, 2007; Ramesh et al., 2009).

Apesar de alterações nos níveis do cortisol plasmático não terem sido detectadas nos peixes expostos ao chumbo em nenhum dos tempos experimentais (Figura 3B), há uma suspeita de que o mesmo tenha sido liberado durante as primeiras horas de exposição, sendo o aumento da glicemia em 6 e 24 h nos peixes expostos ao chumbo (Figura 3A), um indicativo para isto (Iwama et al., 2006). Estudos realizados com *P. lineatus* expostos a diversos outros tipos de xenobióticos por períodos de até 96 h, também não demonstraram a liberação do cortisol (Pereira-Maduenho e Martinez, 2008; Simonato et al., 2008; Camargo et al., 2009). Isto provavelmente se deve ao fato de que, para a maioria das espécies de teleósteos, este hormônio é liberado entre 30 min e 2 h após o contato com o agente estressor (Barton, 2002), e retorna aos níveis pré- tratamento em no máximo algumas horas após sua liberação (Iwama et al., 2006). Almeida e colaboradores (2005) também detectaram elevados níveis de glicose no plasma de peixes que tiveram contato por 24 h com sedimentos contaminados com metais. O aumento da glicose no plasma é um indicador clássico de estresse (Rogers et al., 2003), e assim como outros índices plasmáticos, é um parâmetro interessante para ser utilizado como ferramenta de diagnóstico na toxicologia por sua facilidade de avaliação, especificidade, sensibilidade e baixo custo (Cazenave et al., 2009).

Sabe-se que a redução plasmática de sódio (Figura 4B) pode atuar como sinalizador para a liberação da prolactina (Kaneko e Hirano, 1993), e que, em conjunto com o cortisol, a prolactina age sobre células tronco nas brânquias, estimulando sua diferenciação em CC (Figura 7). Embora não tenham sido medidos os níveis plasmáticos de prolactina, o aumento do número de CC pode indicar sua liberação nos peixes expostos. Esta proliferação de CC nas brânquias ocorre no intuito de aperfeiçoar os processos de captação de íons. As CC são tipicamente encontradas na região interlamelar dos filamentos branquiais, sendo as lamelas desprovidas das mesmas (Wood, 2001). Entretanto, situações que promovem a perda de íons exibem respostas estereotipadas de aumento do número de CC nas brânquias (Perry, 1997; Pereira e Caetano, 2009), em especial nas lamelas (Evans, 1987). A exemplo de *P. lineatus*, que exposto ao pH ácido apresentou um aumento significativo do número de CC totais (Camargo et al., 2009), ou da tilápia do Nilo (*Oreochromis mossambicus*), que após exposição ao cobre passou a apresentar uma população atípica de ionócitos espalhados pelas lamelas branquiais (Dang et al., 2000b), os peixes expostos ao chumbo tiveram desde as primeiras horas de exposição um aumento significativo do número de CC nas lamelas (Figura 7). Contudo, apenas no tempo inicial de 6 h, este aumento de células na região das lamelas foi

grande suficiente para alterar o número total de CC branquiais, o que indica que parte das novas células não é mantida nos demais tempos. O contato de peixes com contaminantes expõe determinados órgãos a situações onde é possível a ocorrência de adsorção de certas substâncias em porções específicas. As CC branquiais são alvo fácil de acúmulo de metais por sua função de captação iônica (Bury e Wood, 1999), e a morte destas células por processos necróticos e/ou apoptóticos é uma estratégia de defesa para eliminar o contaminante acumulado ou para reposição de células danificadas (Bury et al., 1998; Li et al., 1998; Dang et al., 2000b; Camargo et al., 2009). Desta forma, o aumento menos evidente das CC nos peixes expostos ao chumbo por 24 e 96 h, comparado ao aumento ocorrido em 6 h, demonstra que, apesar da tentativa de compensar a perda iônica por meio da diferenciação celular, faz-se necessário a exclusão de parte destas células no intuito de eliminar o metal acumulado e contornar o dano por ele causado. Os resultados encontrados para o acúmulo de chumbo nas brânquias vêm ao encontro desta hipótese (Figura 1D).

Este aumento da densidade de células ricas em mitocôndrias tem como objetivo uma maior população da NKA acarretando em maior atuação na captação de íons (McCormick, 2001). Contudo, a análise da atividade da enzima mostra que no tempo experimental de 24 h ocorre uma inibição de mais de 50% (Figura 5A), evidenciando a interferência do Pb sobre o transporte iônico. A ocorrência deste fato apenas no tempo amostral intermediário pode indicar que o metal leva algum tempo para iniciar sua atuação, e ainda que o animal lançou mão de ajustes para corrigir este problema mais tardiamente. Tais ajustes estão relacionados com o aumento do número de células que pôde ser visualizado desde as primeiras horas de exposição. No entanto, não foi possível evitar a redução da atividade da NKA mesmo com esta nova população de CC, uma vez que as células recém-diferenciadas surgem imaturas e com capacidade de absorção iônica limitada (Dang et al., 2000b; Camargo et al., 2009). A recuperação da atividade da enzima só foi visualizada após 96 h de exposição ao chumbo, quando teve 102% de sua atividade restabelecida (Figura 5A), com o provável amadurecimento das células (Dang et al., 2000a). Em oposição a isto, a truta arco-íris exposta ao chumbo apresentou redução de 40% da atividade da NKA após 48 h de experimento que se estendeu por mais 72 h (Rogers et al., 2003). Por outro lado, a exposição da tilápia do Nilo a diferentes concentrações de chumbo mostrou que a resposta da enzima foi concentração-dependente, podendo apresentar-se inibida ou ativada (Atli e Canli, 2007).

Alterações na atividade da NKA, anidrase carbônica (AC), e outras enzimas dependentes de ATP, que estão associadas aos processos de captação iônica, frequentemente vêm acompanhadas de interferência nas concentrações de íons plasmáticos e na osmolaridade

(Evans, 1987; Bury e Wood, 1999; Rogers et al., 2005). Portanto, a marcada redução do sódio plasmático e a elevação do potássio no tempo inicial de exposição (Figuras 4B e C) podem estar associadas ao início da interferência do chumbo sobre a atividade da NKA nas primeiras horas, e refletida pelo decréscimo da osmolaridade do plasma em 6 h de exposição (Figura 4A). As variações nas concentrações de potássio plasmático nos peixes em todos os tempos experimentais podem ser atribuídas à dificuldade de evitar hemólise durante a amostragem. Contudo, apesar de os valores não se manterem constantes, é evidente que ocorreram alterações das concentrações plasmáticas de potássio nos peixes expostos ao chumbo em relação aos seus respectivos controles. A disrupção na captação de potássio extracelular e na eliminação do sódio intracelular, resulta em acúmulo de íons potássio e redução dos níveis de sódio no plasma, culminando com a redução da capacidade de captação de sódio do meio externo. As mesmas alterações para as concentrações plasmáticas de sódio e potássio são relatados para *Prochilodus scrofa* (= *P. lineatus*) quando exposto ao cobre, a que os autores relacionaram com a interferência do metal sobre a atividade da NKA (Mazon et al., 2002). Contudo, com a recuperação da atividade da bomba de sódio e potássio em 96 h de exposição, era esperado que as concentrações de íons plasmáticos retornassem aos níveis normais. Porém, tanto o sódio quanto o potássio plasmáticos apresentaram uma recuperação sutil, mantendo ainda as alterações significativas. Também para a truta arco-íris exposta ao chumbo, foi verificada a redução do sódio plasmático em até 18% entre 72 e 120 h de exposição (Rogers et al., 2003), sendo esta atribuída à interferência do chumbo nos processos de tomada iônica já nas primeiras horas de tratamento, seguida de aumento do efluxo a partir da 24ª hora (Rogers et al., 2005). Assim, além da interferência do chumbo sobre os processos de captação iônica, este metal também exerce influência sobre a permeabilidade branquial, permitindo que os íons capturados sejam perdidos por entre as células do epitélio branquial. Assim sendo, ainda que a recuperação da atividade da NKA tenha sido estabelecida após exposição ao chumbo por 96 h, as baixas concentrações de sódio nos peixes experimentais podem ser também decorrentes de extravazamento iônico por vias paracelulares, e não apenas de dificuldade de sua absorção ativa.

O epitélio que recobre as brânquias dos teleósteos dulcícolas é considerado impermeável a íons e outras moléculas graças às junções oclusivas. Tais especializações de membrana são formadas por componentes que visam manter a polaridade da membrana plasmática e impedir que moléculas dos diferentes lados do tecido permeiem por entre as células, conferindo ao mesmo a resistência transepitelial necessária para a manutenção da impermeabilidade (Foskett et al., 1983; Evans, 2005). Na formação das junções oclusivas do

tecido branquial encontram-se proteínas cujas ligações célula- célula são mantidas por pontes de cálcio, o que implica dizer que a ausência de cálcio é capaz de promover um desajuste na estrutura e função dessas junções (Schneerberger e Lynch, 1984; Rajasekaran et al., 2001; Brown e Davis, 2002). Desta forma, o cálcio é considerado um íon essencial no estabelecimento da permeabilidade epitelial (Flik e Verbost, 1995).

Diversos metais como cobalto, zinco, cádmio e também o chumbo, já se mostraram antagonistas do cálcio, utilizando sua via de absorção para adentrar o animal (Bury e Wood, 1999; Macdonald et al., 2002; Rogers e Wood, 2004). Isto pode dificultar a absorção deste íon, com possíveis interferências em sua concentração plasmática. Uma vez que os níveis de cálcio no plasma se encontrem abaixo dos níveis normais, muitas funções relacionadas à sua presença podem ser prejudicadas. Assim sendo, íons metálicos que prejudicam a hiperregulação do cálcio podem agir direta ou indiretamente nas junções oclusivas e alterar a permeabilidade das brânquias de teleósteos dulcícolas, permitindo o efluxo dos demais íons (Evans, 1987). É sabido que nestes animais a hiperregulação do cálcio ocorre pela via transepitelial, através de canais de cálcio localizados tanto nas CC quanto nas células pavimentosas. Para que os íons cálcio entrem através da membrana apical, trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATPases inseridos na porção basolateral da célula retiram íons do meio intracelular, gerando um gradiente osmótico necessário (Hwang e Lee, 2007).

Os canais de cálcio das células branquiais são descritos como a principal via de entrada do chumbo em teleósteos de água doce, e existem evidências de que o chumbo é capaz de bloquear estes canais. Para deixar a célula em direção ao sangue do animal, este metal utiliza os trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ou as bombas de cálcio dependentes de ATP, podendo, da mesma forma, inibir a atividade desses transportadores (MacDonald et al., 2002; Rogers et al., 2003; Atli e Canli, 2007). Desta forma, as reduções significativas dos níveis plasmáticos de cálcio encontradas nos peixes expostos ao chumbo durante os três tempos experimentais (Figura 4E), corroboram com a idéia de que este metal inibe a hiper-regulação do íon cálcio. Da mesma maneira, uma série de outros estudos já relataram resultados semelhantes para organismos dulcícolas como moluscos (Mosher, 2008), crustáceos (Ahern e Morris, 1999) e outras espécies de teleósteos (Rogers et al., 2003; Rogers e Wood, 2004).

Além de disfunções na atividade das enzimas envolvidas no processo de captação iônica e do afrouxamento das junções oclusivas no epitélio branquial permitindo o efluxo de íons, as alterações de concentrações plasmáticas nos íons dos peixes expostos ao chumbo também podem resultar de uma inabilidade de reabsorção de alguns íons nos túbulos

renais, com conseqüente produção de uma urina menos diluída do que o necessário. Patel e Wood (2006) exploraram este campo medindo a concentração de diversos íons na urina de trutas arco-íris expostas ao chumbo e constataram que cálcio, magnésio e glicose não têm uma reabsorção tubular eficiente, o que permitiria sua perda. Esta espécie de peixe apresenta menos de 3% do chumbo total acumulado em seu rim (Alves e Wood, 2006), ou seja, em torno de $25 \mu\text{g.g tec}^{-1}$ após 96 h de exposição (Patel e Wood, 2006), o que representa, a título de comparação, apenas 20% do chumbo acumulado no rim de *P. lineatus* após o mesmo tempo de exposição. Porém, a concentração de chumbo total a que estas duas espécies foram submetidas difere em diversas ordens de magnitude. Ainda assim, a quantidade de chumbo acumulada no rim da espécie estudada neste trabalho pode ser responsável por alterações funcionais deste órgão, impedindo a reabsorção adequada dos íons e outras substâncias. (sobretudo os íons divalentes como Ca e Mg)

No decorrer do experimento foi possível observar apenas uma pequena alteração significativa do cloreto plasmático em 24 h de exposição, a qual foi reestabelecida logo no tempo experimental seguinte (Figura 4D). Alterações nas concentrações de cloreto plasmático podem estar associadas à distúrbios na atividade da anidrase carbônica, a qual está envolvida na hiperregulação iônica, uma vez que a captação de Na^+ e Cl^- são, de certa forma, dependentes dos produtos de sua atividade (Evans, 1987; Souza-Bastos e Freire, 2009). A AC é responsável por tornar mais rápida a reação de hidratação do gás carbônico, produto da respiração, que chega nas brânquias para ser eliminado. Ocorre a formação do ácido carbônico, que dissocia-se rapidamente, dando origem a HCO_3^- , que finalmente servirão como contra-íons para a obtenção dos íons desejáveis à osmorregulação (Clairborne et al., 2002; Gilmour e Perry, 2009). Desta forma, interferências na atividade da AC devem prejudicar a formação dos íons de troca e reduzir a captação de Na^+ e Cl^- (Evans, 1987). Já foi relatado que a atividade desta enzima é sensivelmente inibida na presença de diversas espécies metálicas (Morgan et al., 1997; Skaggs e Henry, 2002), incluindo o chumbo (Rogers et al., 2005). A atividade da AC citosólica dos peixes expostos ao chumbo apresentou uma tendência de redução (cerca de 25%) em todos os tempos experimentais. No entanto, não foram observadas alterações significativa (Figura 5B). Assim sendo, a variação encontrada para o íon cloreto pode ser vista como uma variação transitória, em decorrência de tentativas de ajustes em outros parâmetros.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresentou evidências de que o chumbo promove um desajuste nas concentrações de íons plasmáticos de *P. lineatus*, reduzindo as concentrações de sódio e cálcio e aumentando os níveis de potássio no plasma. A NKA também se mostrou alterada após exposição ao metal, ao contrário da AC, que teve sua atividade inalterada. O número de CC nas lamelas dos peixes expostos ao chumbo aumentou significativamente, assim como a glicose plasmática nos tempos experimentais iniciais. Não houve alterações significativas nos parâmetros hematológicos. Esses resultados sugerem que após adentrar o peixe, o chumbo pode se ligar a trocadores inseridos na membrana basolateral, impedindo o funcionamento normal deste e provocando uma ineficiência na captação iônica, com consequente disrupção das concentrações normais de íons plasmáticos. A estes desajustes, o organismo responde promovendo a diferenciação das células responsáveis pela captação iônica, na tentativa de contornar o desbalanço e retomar o equilíbrio homeostático. Concomitantemente, os íons metálicos que adentraram o corpo do peixe pela absorção transepitelial nas brânquias, atingem diversos outros tecidos através da circulação sanguínea, acumulando-se em órgãos que tem a função de retirar a substância tóxica de circulação, proporcionando proteção ao organismo. Mais estudos são necessários a fim de que se possa afirmar de fato os mecanismos de tomada do chumbo através das brânquias, suas vias de entrada e sua atuação sobre as proteínas ligadas a osmorregulação e a permeabilidade branquial, assim como os hormônios envolvidos na proliferação das CC branquiais.

REFERÊNCIAS

- Ahern, M.D.; Morris, S. 1998. Accumulation of lead and its effects on Na balance in the freshwater crayfish *Cherax destructor*. J. Exp. Zool. 281, 270-279.
- Almeida, J.S., Meletti, P.C., Martinez, C.B.R. 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol. 140C, 356-363.
- Alves, L.C., Glover, C.N., Wood, C.M. 2006. Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 615-625.
- 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.
- Ates, B., Orun, I., Talas, Z.S., Durmaz, G., Yilmaz, I. 2008. Effects of sodium selenite on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb and Cu. Fish. Physiol. Biochem. 34, 53-59.
- Atli, G., Canli, M. 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comp. Biochem. Physiol. 145C, 282-287.
- Atli, G., Canli, M. 2008. Characterization of branchial Na,K-ATPase from three freshwater fish species (*Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio*, and *Oncorhynchus mykiss*). Turk. J. Zool. 32, 299-304.
- Ay, Ö., Kalay, M., Tamer, L., Canli, M. 1999. Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na,K-ATPase activity. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 62, 160-168.
- Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integr. Comp. Biol. 42, 517-525.
- Bergdahl, I.A., Shaveleva, M., Schütz, A., Artamonova, V.G., Skerfving, S. 1998. Plasma and blood lead in humans: capacity-limited binding to d-aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components. Toxicol. Sci. 46, 247-253.
- Bijvelds, M.J.C., Van der Velden, J.A., Kolar, Z.I., Flik, G. 1998. Magnesium transport in freshwater teleosts. J. Exp. Biol. 201, 1981-1990.

- Bloom, J.C., Brandt, J.T. 2008. Toxic responses of the blood. In: Casarett, L.J., Klaassen, C.D., Doull^{cs}, J. *Toxicology: the basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill. 7^a ed. c.11, pp.455-484.
- Brown, R.C., Davis, T.P. 2002. Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *J. Am. Heart. Assoc.* 33, 1706-1711.
- Bury, N.R., Jie, L., Flik, G., Lock, R.A.C., Wendelaar-Bonga, S.,E. 1998. Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro. *Aquat. Toxicol.* 40, 193-202.
- Bury, N.R., Wood, C.M. 1999. Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na⁺ channel. *Am. J. Physiol. – Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277, 1385-1391.
- 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.
- Carvalho, C.S., Araujo, H.S.S., Fernandes, M.N. 2004. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. *Comp. Biochem. Physiol.* 137B, 225-234.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M.J., Scarabotti, P.A., Wunderlin, D.A. 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environ. Pollut.* 157, 3025-3033.
- Cicik, B., Ay, Ö., Karayakar, F. 2004. Effects of lead and cadmium interactions on the metal accumulation in tissue and organs of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 141-148.
- Claiborne, J.B.; Edwards, S.L.; Morrison-Shetlar, A.I. 2002. Acid–base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J. Exp. Zool.* 293, 302-319.
- CONAMA 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente, *Resolução n° 357*, de 17 de março de 2005, Brasil, 23 p.
- Costa, C.R., Olivi, P., Botta, C.M.R., Espindola, E.L.G. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova.* 31(7), 1820 - 1830.

- Costa, J.R.M.A., Mela, M., Assis, H.C.S., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Ribeiro, C.A.O. 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 82-88.
- Dang, Z., Balm, P.H.M., Flik, G., Wendelaar-Bonga, S.E., Lock, R.A.C. 2000a. Cortisol increases Na^+/K^+ -ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia *Oreochromis mossambicus*. *J. Exp. Biol.* 203, 2349-2355.
- Dang, Z., Lock, R.A.C., Flik, G., Wendelaar-Bonga, S.E. 2000b. Na^+/K^+ -ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *J. Exp. Biol.* 203, 379-387.
- Eisler, R. 1988. Lead hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *Biol. Rev.* v.85, n.14, 94p.
- Evans, D.H. 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environ. Health. Perspect.* 71, 47-58.
- _____. 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *Am. J. Physiol. – Reg. Integr. Comp. Physiol.* 295, R704–R713.
- Evans, D.H., Claiborne, J.B. 2009. Osmotic and ionic regulation in fishes. In: Evans, D.H. (Ed.) *Osmotic and ionic regulation: cell and animals*. Boca Raton: CRC Press, c.8, pp.295-366.
- 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.
- Flik, G., Verbost, P.M. 1995. Cellular mechanisms in calcium transport and homeostasis in fish. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.) *Biochem. Mol. Biol. Fish.* New York: Elsevier Science Publishers, v.5, c.13, pp.251-263.
- Foskett, J.K., Bern, H.A., Machen, T.E., Conner, M. 1983. Chloride cells and the hormonal control of teleost fish osmoregulation. *J. Exp. Biol.* 106, 255-281.
- Gilmour, K.M., Perry, S.F. 2009. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. *J. Exp. Biol.* 212, 1647-1661.

- Grosell, M., Gerdes, R., Brix, K.V. 2006. Influence of Ca, humic acid and pH on lead accumulation and toxicity in the fathead minnow during prolonged water-borne lead exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 143C, 473-483.
- Hodson, P.V., Blunt, B.R., Whittle, D.M. 1980. Biochemical monitoring of fish blood as an indicator of biologically available lead. *Thalass. Jugosl.* 16(2/3), 389-396.
- Huang, Z.W., Zhang, O., Chen, J., Zhuang, Z.X., Wang, X.R. 2007. Bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) co-exposed to cadmium, mercury and lead. *Appl. Organomet. Chem.* 21, 101-107.
- Hwang, P.P.; Lee, T.H. 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion- rich cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 148(A), 479-497.
- Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M. 2006. Stress in fish. In: Evans, D.H., Claiborne, J.B. (Eds.) *The physiology of Fishes*. CRC Taylor & Francis, 3rded., c.9, pp.319-342.
- Kaneko, T., Hirano, T. 1993. Role of prolactin and somatolactin in calcium regulation in fish. *J. Exp. Biol.* 184, 31-45.
- Klavins, M., Potapovics, O., Rodinov, V. 2009. Heavy metals in fish from lakes in Latvia: concentrations and trends of changes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 96-100.
- Kutlu, M., Sümer, S. 2008. Some biochemical properties of β -aminolevulinic acid dehydratase in *Gammarus pulex*. *Food. Chem. Toxicol.* 46, 115-118.
- Li, J., Quabius, E.S., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., Lock, R.A.C. 1998. Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na^+/K^+ -ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquat. Toxicol.* 43, 1-11.
- Lima, M.C., Giacomelli, M.B.O., Stüpp, V., Roberge, F.D. 2001. Especificação de cobre e chumbo em sedimento do Rio Tubarão (SC) pelo método tessier. *Quim. Nova.* 24(6), 734-742.
- Locke, L.N., Bagley, G.E., Irby, H.D. 1966. Acid-fast intranuclear inclusion bodies in the kidneys of mallards fed lead shot. *Bull. Wildl. Dis. Assoc.* 2, 127-131.
- Lombardi, P.E., Peri, S.I., Guerreiro, N.R.V. 2010. Trace Metal Levels In *Prochilodus lineatus* collected from the La Plata River, Argentina. *Environ. Monit. Assess.* 160, 47-59.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MacDonald, A., Silk, L., Schwartz, M., Playle, R.C. 2002. A lead-gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 133C, 227-242.
- Mancera, J.M., McCormick, S.D. 2007. Role of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol in teleost osmoregulation. In: Baldisserotto, B., Romero, J.M.M., Kapoor, B.G. (Eds.) *Fish osmoregulation*. Science Publishers, California, 1^a ed., c.16, p.497-515.
- Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S. 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do Rio Tibagi. In: Medri, M.E., Bianchini, E., Shibatta, O.A. & Pimenta, J.A. (Eds.) *A bacia do Rio Tibagi*. Londrina: Ed. dos editores, c.29, pp.551-557.
- Martinez, C.B.R., Nagaie, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M. 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.* 64(4), 797-807.
- Mazon, A.F., Monteiro, E.A.S., Pinheiro, G.H.D., Fernandes, M.N. 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Braz. J. Biol.* 62A(4), 621-631.
- McCormick, S.D. 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Am. Zool.* 41, 781-794
- Mishra, M., Jain, S.K. 2009. Effect of natural ion exchanger chabazite for remediation of lead toxicity: an experimental study in teleost fish *Heteropneustes fossilis*. *Asian. J. Exp. Sci.* 23(1), 39-44.
- Mommsen, T.P., Vijayama, M.M., Moon, T.W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 9, 211-268.
- Moore, J., Goyer, R.A. 1974. Induced-lead inclusion bodies: composition and probable role in lead metabolism. *Environ. Health. Perspect.* May, 121-127.
- Morgan, I.J., Henry, R.P., Wood, C.M. 1997. The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of gill Na⁺ and Cl⁻ transport. *Aquat. Toxicol.* 38, 145-163.

- Mosher, S. 2008. Biomarkers of lead exposure in the freshwater mussel *Elliptio complanata* for assessing transportation related impacts. Dissertação de mestrado - North Carolina State University, Estados Unidos.
- Mozeto, A.A., Nascimento, M.R.L., Silva, E.F.A., Fioravanti, M.I.A. 2007. Avaliação da contaminação por metais metalóides (água, sedimento e peixe) no Rio São Francisco em Três Marias (MG-Brasil): Projeto de pesquisa participativa com a comunidade local. Final scientific reports or outputs, Brasil.
- Nolan, D.T. 2000. Skin response of fish to stressors. Tese de Doutorado – Universidade Católica de Nijmegen, Holanda.
- Nussey, G., Van-Vuren, J.H.J., Preez, H.H. 2000. Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. Water. SA. 26(2), 269-284.
- Ong, C.N.; Lee, W.R. 1980. Interaction of calcium and lead in human erythrocytes. Br. J. Ind. Med. 37, 70-77.
- Palaniappan, Pl.Rm., Krishnakumar, N., Vadivelu, M. 2009. Bioaccumulation of lead and the influence of chelating agents in *Catla catla* fingerlings. Environ. Chem. Lett. 912 7, 51-54.
- Paoliello, M.M.B., Chasin, A.A.M. 1998. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. *Série cadernos de referência ambiental*, Salvador: Centro de Recursos Ambientais – SRA. v.3, pp.144.
- Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di Toro, D.M., Dwyer, R.L., Galvez, F., Gensemer, F.W., Goss, G.G., Hogstrand, C., Janssen, C.R., Mcgeer, J.C., Naddy, R.B., Playle, R.C., Santore, R.C., Schneider, U.; Stubblefield, W.A.; Wood, C.M.; Benjamin Wu, K. 2002. The biotic ligand model: a historical overview. Comp. Biochem. Physiol. 133(C), 3-35.
- Paquin, P.R., Santore, R.C., Wu, K.B., Kavvadas, C.D., Di Toro, D.M. 2000. The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. Environ. Sci. Policy. 3, S175-S182.
- Patel, M., Rogers, J.T., Pane, E.F., Wood, C.M. 2006. Renal responses to acute lead waterborne exposure in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 80, 362-371.
- Pereira, B.F., Caetano, F.H. 2009. Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish. Micron. 40, 783-786.

- Pereira-Maduenho, L., Martinez, C.B.R. 2008. Acute effect of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 148(3), 265-272.
- Perry, S.F. 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 325-347.
- 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.
- Ramesh, M., Saravanan, M., Kavitha, C. 2009. Hormonal responses of the fish, *Cyprinus carpio*, to environmental lead exposure. *Afr. J. Biotechnol.* 8(17), 4154 - 4158.
- Rathore, R.S., Khangarot, B.S. 2003. Effects of hardness and metal concentration on a freshwater *Tubifex tubifex* muller. *Water. Air. Soil. Pollut.* 142, 341-356.
- Rogers, J.T., Richards, J.G., Wood, C.M. 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 64, 215-234.
- Rogers, J.T., Wood, C.M. 2004. Characterization of branchial lead–calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 207, 813-825.
- Rogers, J.T., Patel, M., Gilmour, K.M. E Wood, C.M. 2005. Mechanisms behind Pb - induced disruption of Na⁺ and Cl⁻ balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. – Reg. Integr. Comp. Physiol.* 289, R463–R472.
- Rose, A.M., Valdes Jr., R. 1994. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clin. Chem.* 40(9), 1674-1685.
- Sampaio, F.G., Boijink, C.L., Oba, E.T., Santos, L.R.B., Kalinin, A.L., Rantin, F.T. 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 147C, 43-51.
- Schmitt, C.J., Brumbaugh, W.G., May, T.W. 2007a. Accumulation of metals in fish from lead–zinc mining areas of southeastern Missouri, USA. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 14-30.
- Schmitt, C.J., Whyte, J.J., Roberts, A.P., Annis, M.L., May, T.W., Tillitt, D.E. 2007b. Biomarkers of metals exposure in fish from lead–zinc mining areas of southeastern Missouri, USA. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 31-47.

- Schneerberger, E.E., Lynch, R.D. 1984. Tight junctions: their structure, composition, and function. *J. Am. Heart. Ass. – Circ. Res.* 55, 723-233.
- Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R. 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 112-120.
- Skaggs, H.S., Henry, R.P. 2002. Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C, 605-612.
- Skerfving, S., Bergdahl, I.A. 2007. Lead. In: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg, L.T. (Eds.) *Handbook on the toxicology of metals*. Amsterdam: Elsevier. 3^a ed., c.31, pp.599-643.
- Souza-Bastos, L.R., Freire, C.A. 2009. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquac.* 289, 167-174.
- Spokas, E.G., Crivellone, M.D., Kemp, F., Bogden, J.D., Cohen, G.M. 2002. Characterization of sodium, potassium, ATPase activity in the gills of *Pimephales promelas* (fathead minnow): influence of in vitro exposure to lead. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 384-392.
- Spokas, E.G., Spur, B.W., Smith, H., Kemp, F.W., Bogden, J.D. 2006. Tissue lead concentration during chronic exposure of *Pimephales promelas* (Fathead Minnow) to lead nitrite on aquarium water. *Environ. Sci. Technol.* 40(21), 6852-6858.
- Storelli, M.M., Giacomini-Stuffler, R., Storelli, A., Marcotrigiano, G.O. 2005. Accumulation of mercury, cadmium, lead and arsenic in swordfish and bluefin tuna from the Mediterranean Sea: A comparative study. *Baseline. – Mar. Pollut. Bull.* 50, 993-1018.
- Streit, B. 1998. Bioaccumulation of contaminants in fish. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. *Fish ecotoxicology*. Basel: Birkhäuser. c.12, pp.353-387.
- Tao, S., Liu, C., Dawson, R., Cao, J., Li, B. 1999. Uptake of particulate lead via the gills of fish (*Carassius auratus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 352-357.
- Torre, F.R., Salibian, A., Ferrari, L. 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere*. 68, 1582-1590.

- Villar, C.; Stripeikis, J.; Colautti, D.; D'Huicque, L.; Tudino, M.; Bonetto, C. 2001. Metals contents in two fishes of different feeding behaviour in the Lower Paraná River and Río de la Plata Estuary. *Hydrobiologia*. 457, 225-233.
- Vitale, A.M.; Monserrat, J.M.; Castilho, P.; Rodriguez, E.M. 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 122(C), 121-129.
- Winkaler, E.U., Silva, A.G., Galindo, H.C., Martinez, C.B.R. 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta. Sci. histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado* 23(2), 507-514.
- Wood, C.H. 2001. Toxic responses of the gills. In: Schlenk, D., Benson, W.H. (Eds.) *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts*. New York: Taylor and Francis, v.1, c.1, pp.1-101.
- Yabe, M.J.S., Oliveira, E. 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Quim. Nova*. 21(5), 551-556.

REFERÊNCIAS GERAIS

- AHERN, M.D.; MORRIS, S. (1998) Accumulation of lead and its effects on Na balance in the freshwater crayfish *Cherax destructor*. *The Journal of Experimental Zoology*, 281(4):270-279.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2010) *Biologia molecular da célula*. 5^a ed. 1494p. Ed. Artmed, Porto Alegre.
- ALMEIDA, J.S.; MELETTI, P.C.; MARTINEZ, C.B.R. (2005) Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140(C):356-363.
- ALVES, L.C.; GLOVER, C.N.; WOOD, C.M. (2006) Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51:615-625.
- ALVES, L.C.; WOOD, C.M. (2006) The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquatic Toxicology*, 78:217-232.
- AL-YOUSUF, M.H.; EL-SHAHAWI, M.S.; AL-GHAIS, S.M. (2000) Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. *The Science of the Total Environment*, 256:87-94.
- ATES, B.; ORUN, I.; TALAS, Z.S.; DURMAZ, G.; YILMAZ, I. (2008) Effects of sodium selenite on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb and Cu. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34:53-59.
- ATSDR. (2007) Toxicguide for lead. ATSDR/CAS# 7439-92-1. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATLI, G.; CANLI, M. (2007) Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145(C):282-287.
- ATLI, G.; CANLI, M. (2008) Characterization of Branchial Na,K-ATPase from Three Freshwater Fish Species (*Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio*, and *Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Zoology*, 32:299-304.

- AY, Ö; KALAY, M.; TAMER, L. CANLI, M. (1999) Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na,K-ATPase activity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62:160 - 168.
- BARTON, B.A. (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42:517-525.
- BERGDAHL, I.A.; SHAVELEVA, M.; SCHÜTZ, A.; ARTAMONOVA, V.G.; SKERFVING, S. (1998) Plasma and blood lead in humans: capacity-limited binding to d-aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components. *Toxicological Sciences*, 46:247-253.
- BIJVELDS, M.J.C.; VAN DER VELDEN, J.A.; KOLAR, Z.I.; FLIK, G. (1998) Magnesium transport in freshwater teleosts. *The Journal of Experimental Biology*, 201:1981-1990.
- BLOOM, J.C.; BRANDT, J.T. (2008) Toxic responses of the blood. In: CASARETT, L.J.; KLAASSEN, C.D.; DOULL S, J. *Toxicology: the basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill. 7^a ed. c.11, pp.455-484.
- BRASIL (2007) *Anuário estatístico: setor metalúrgico*. Secretaria de geologia, mineração e transformação mineral. 110p. <www.mme.gov.br> acessado em 16/03/2010.
- BROWN, R.C.; DAVIS, T.P. (2002) Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Journal of the American Heart Association -stroke*, 33:1706-1711.
- BURY, N.R.; JIE, L.; FLIK, G.; LOCK, R.A.C.; WENDELAAR-BONGA, S.,E. (1998) Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro. *Aquatic Toxicology*. 40:193-202.
- BURY; N.R.; WOOD, C.M. (1999) Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na⁺ channel. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 277:1385-1391.
- 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*. *Aquatic Toxicology*, 94:40-46.
- CANLI, M.; ATLI, G. (2003) The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental Pollution*, 121:129-136.

- CARDOSO, T.P.; MÁRSICO, E.T.; MEDEIROS, R.J.; TORTELLY, R.; SOBREIRO, L.G. (2009) Concentração de mercúrio e análise histopatológica em músculo, rim e cérebro de peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) coletados na praia de Itaipu, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Ciência Rural*, 39(2):540-546.
- CARVALHO, C.S.; ARAUJO, H.S.S.; FERNANDES, M.N. (2004) Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137(B):225-234.
- CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M.J.; SCARABOTTI, P.A.; WUNDERLIN, D.A. (2009) Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution*, 157:3025-3033.
- CICIK, B.; AY, Ö; KARAYAKAR, F. (2004) Effects of lead and cadmium interactions on the metal accumulation in tissue and organs of the nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72:141-148.
- CLAIBORNE, J.B.; EDWARDS, S.L.; MORRISON-SHETLAR, A.I. (2002) Acid– base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*, 293:302-319.
- CONAMA (2005) Conselho Nacional do Meio Ambiente, *Resolução nº 357*, de 17 de março de 2005, Brasil, 23 p.
- COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. (2008) A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7):1820-1830.
- COSTA, J.R.M.A.; MELA, M.; ASSIS, H.C.S.; PELLETIER, E.; RANDI, M.A.F.; RIBEIRO, C.A.O. (2007) Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead(II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67:82-88.
- DANG, Z.; BALM, P.H.M.; FLIK, G.; WENDELAAR-BONGA, S.E.; LOCK, R.A.C. (2000a) Cortisol increases Na^+/K^+ -ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia *Oreochromis mossambicus*. *The Journal of Experimental Biology*, 203:2349-2355.
- DANG, Z.; LOCK, R.A.C.; FLIK, G.; WENDELAAR-BONGA, S.E. (2000b) Na^+/K^+ -ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *The Journal of Experimental Biology*, 203:379-387.

- DAVIES, P.H.; GOETTI, J.P.; SINLEY Jr., J.R.; SMITH, N.F. (1976) Acute and chronic toxicity of lead to rainbow trout *Salmo gairdneri*, in hard and soft water. *Water Research*, 10:199-206.
- DI GIULIO, R.T.; NEWMAN, M.C. (2008) Ecotoxicology In: KLAASSEN, C.D. (Ed.) *Toxicology: the basic science of poisons*. c.29, pp.1157-1187.
- EISLER, R. (1988) Lead hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *Biological Reviews*, v.85, n.14.
- EVANS, D.H. (1987) The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 71:47-58.
- _____ (2008) Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *American Journal of Physiology -Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295:R704–R713.
- EVANS, D.H.; CLAIBORNE, J.B. (2009) Osmotic and ionic regulation in fishes. In: EVANS, D.H. (Ed.) *Osmotic and Ionic Regulation: cell and animals*. Boca Raton: CRC Press, c.8, pp.295-366.
- 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. *Physiology Reviews*, 85:97-177.
- FISCHER, P.W.; GIROUX, A. (1987) Effects of Dietary Magnesium on Sodium-Potassium Pump Action in the Heart of Rats. *Bureau of Nutritional Sciences*. 252:2091-2095.
- FLIK, G.; VERBOST, P.M. (1995) Cellular mechanisms in calcium transport and homeostasis in fish. In: HOCHACHKA, P.W.; MOMMSEN, T.P. (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, New York: Elsevier Science Publishers, v.5, c.13, pp.251-263.
- FOSKETT, J.K.; BERN, H.A.; MACHEN, T.E.; CONNER, M. (1983) Chloride cells and the hormonal control of teleost fish osmoregulation. *Journal of Experimental Biology*, 106:255-281.
- GILMOUR, K.M.; PERRY, S.F. (2009) Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. *The Journal of Experimental Biology*, 212:1647-1661.

- GOSS, G.G.; PERRY, S.F.; FRYER, J.N.; LAURENT, P. (1998) Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119A(1):107-115.
- GROSELL, M.; GERDES, R.; BRIX, K.V. (2006) Influence of Ca, humic acid and pH on lead accumulation and toxicity in the fathead minnow during prolonged water-borne lead exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143C:473-483.
- HAS-SCHÖN, E.; BOGUT, I.; RAJKOVIĆ, V.; BOGUT, S.; ČAČIĆ, 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). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54:75–83.
- HEATH, A.G. (1995) *Water Pollution and Fish Physiology*. 2^a ed. 395p. CRC Press, Inc, Boca Raton, New York, London, Tokyo.
- HODSON, P.V.; BLUNT, B.R.; WHITTLE, D.M. (1980) Biochemical monitoring of fish blood as an indicator of biologically available lead. *Thalassia Jugoslavica*, 16(2/3):389-396.
- HUANG, Z.W.; ZHANG, O.; CHEN, J.; ZHUANG, Z.X.; WANG, X.R. (2007) Bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) co-exposed to cadmium, mercury and lead. *Applied Organometallic Chemistry*, 21:101-107.
- HWANG, P.P.; LEE, T.H. (2007) New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148(A):479 - 497.
- IWAMA, G.K.; AFONSO, L.O.B.; VIJAYAN, M.M. (2006) Stress in fish. In: EVANS, D.H.; CLAIBORNE, J.B. (Eds.) *The Physiology of Fishes*. CRC Taylor & Francis, 3^aed., c.9, pp.319-342
- JEREZ, S.; MOTAS, M.; CÁNOVAS, R.A.; TALAVERA, J.; ALMELA, R.M.; RÍO, A.B. (2010) Accumulation and tissue distribution of heavy metals and essential elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Spanish Mediterranean coastline of Murcia. *Chemosphere* 78:256–264.
- KANEKO, T.; HIRANO, T. (1993) Role of prolactin and somatolactin in calcium regulation in fish. *Journal of Experimental Biology*, 184:31-45.
- KLAVINS, M.; POTAPOVICS, O.; RODINOV, V. (2009) Heavy metals in fish from lakes in Latvia: concentrations and trends of changes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82:96-100.

- KÖCK, G.; HOFER, R. (1998) Origin of cadmium and lead in clear softwater lakes of high-altitude and high-latitudes, and their bioavailability and toxicity to fish. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (eds.) *Fish Ecotoxicology*. 396p. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- KREAGER, N.; WAINMAN, B.C.; JAYASINGHA, R.K.; TSUJI, L.J.S. (2008) Lead Pellet Ingestion and Liver-Lead Concentrations in Upland Game Birds from Southern Ontario, Canadá. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(2):331-336.
- KUTLU, M.; SÖMER, S. (2008) Some biochemical properties of β -aminolevulinic acid dehydratase in *Gammarus pulex*. *Food and Chemical Toxicology*, 46:115-118.
- LI, J.; QUABIUS, E.S.; WENDELAAR BONGA, S.E.; FLIK, G.; LOCK, R.A.C. (1998) Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na^+/K^+ -ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquatic Toxicology*, 43:1-11.
- LIMA, M.C.; GIACOMELLI, M.B.O.; STÜPP, V.; ROBERGE, F.D. (2001) Especificação de cobre e chumbo em sedimento do Rio Tubarão (SC) pelo método tessier. *Química Nova*, 24(6):734-742.
- LIU, J.; GOYER, R.A.; WAALKES, M.P. (2008) Toxic effects of metals. In: Casarett, L.J., Klaassen, C.D., Doull^{sc}, J. *Toxicology: the basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill. 7^a ed. c.23, pp.931-979.
- LOCKE, L.N., BAGLEY, G.E., IRBY, H.D. (1966) Acid-fast intranuclear inclusion bodies in the kidneys of mallards fed lead shot. *Bulletin of Wildlife Disease Association*, 2:127-131.
- LOPES, A.A.; BRIGANTE, J.; SCHALCH, J. (2007) Influência do Aterro Sanitário de São Carlos (SP), Brasil, na Qualidade das Águas Superficial e Subterrânea. *Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology*, 2(2):115-127.
- LOMBARDI, P.E.; PERI, S.I.; GUERREIRO, N.R.V. (2010) Trace metal levels in *Prochilodus lineatus* collected from the La Plata River, Argentina. *Environmental Monitoring Assessment*, 160:47-59.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.

- MACDONALD, A.; SILK, L.; SCHWARTZ, M.; PLAYLE, R.C. (2002) A lead–gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133(C):227-242.
- MACHADO, M.R. (1999) Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde*, 1(1): 63-76.
- MANCERA, J.M.; MCCORMICK, S.D. (2007) Role of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol in teleost osmoregulation. In: BALDISSEROTTO, B.; ROMERO, J.M.M.; KAPOOR, B.G. (Eds.) *Fish Osmoregulation*. Science Publishers, California, 1ª ed., c.16, p.497-515.
- MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. (2002) Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do Rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A. & PIMENTA, J.A. (Eds.) *A Bacia do Rio Tibagi*. Londrina: Ed. dos editores, c.29, pp.551-557.
- MARTINEZ, C.B.R.; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. (2004) Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Brazilian Journal of Biology*, 64(4):797-807.
- MALLATT, J. (1985) Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42:630-648.
- MAZON, A.F.; MONTEIRO, E.A.S.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. (2002) Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4A):621-631.
- MCCORMICK, S.D. (2001) Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoology*, 41:781-794.
- MELLANBY, K. (1982) *Biologia da Poluição*. 89p. EPU: Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- METCHEVA, R.; YURUKOVA, L.; BEZRUKOV, V.; BELTCHEVA, M.; YANKOV, Y.; DINITROV, K. (2010) Trace and toxic elements accumulation in food chain representatives at Livingston Island (Antarctica). *International Journal of Biology*. 2(1):155-160.
- MÍDIO, A.F. (1992) *Glossário de Toxicologia*. 95p. Roca, São Paulo.

- MISHRA, M.; JAIN, S.K. (2009) Effect of natural ion exchanger chabazite for remediation of lead toxicity: an experimental study in teleost fish *Heteropneustes fossilis*. *Asian Journal of Experimental Science*, 23(1):39-44.
- MOMMSEN, T.P.; VIJAYAMA, M.M.; MOON, T.W. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9:211-268.
- MOORE, J.; GOYER, R.A. (1974) Induced-lead inclusion bodies: composition and probable role in lead metabolism. *Environmental Health Perspectives*, May:121-127.
- MORGAN, I.J.; HENRY, R.P.; WOOD, C.M. (1997) The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of gill Na^+ and Cl^- transport. *Aquatic Toxicology*, 38:145-163.
- MOSHER, S. (2008) *Biomarkers of lead exposure in the freshwater mussel Elliptio complanata for assessing transportation related impacts*. Dissertação de mestrado - North Carolina State University, Estados Unidos.
- MOZETO, A.A.; NASCIMENTO, M.R.L.; SILVA, E.F.A.; FIORAVANTI, M.I.A. (2007) *Avaliação da contaminação por metais metalóides (água, sedimento e peixe) no Rio São Francisco em Três Marias (MG-Brasil): Projeto de pesquisa participativa com a comunidade local*. Final scientific reports or outputs, Brasil.
- NOLAN, D.T. (2000) *Skin response of fish to stressors*. Tese de Doutorado – Universidade Católica de Nijmegen, Holanda.
- NUSSEY, G.; VAN-VUREN, J.H.J.; PREEZ, H.H. (2000) Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. *Water SA*, 26(2):269-284.
- ONG, C.N.; LEE, W.R. (1980) Interaction of calcium and lead in human erythrocytes. *British Journal of Industrial Medicine*, 37:70-77.
- PALANIAPPAN, P.L.R.M.; KRISHNAKUMAR, N.; VADIVELU, M. (2009) Bioaccumulation of lead and the influence of chelating agents in *Catla catla* fingerlings. *Environmental Chemistry Letters*, 7:51-54.
- PAOLIELLO, M.M.B.; CHASIN, A.A.M. (1998) Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. *Série cadernos de referência ambiental*, Salvador: Centro de Recursos Ambientais – SRA. v.3, pp.144.

- PAQUIN, P.R.; GORSUCH, J.W.; APTE, S.; BATLEY, G.E.; BOWLES, K.C.; CAMPBELL, P.G.C.; DELOS, C.G.; DI TORO, D.M.; DWYER, R.L.; GALVEZ, F.; GENSEMER, F.W.; GOSS, G.G.; HOGSTRAND, C.; JANSSEN, C.R.; MCGEER, J.C.; NADDY, R.B.; PLAYLE, R.C.; SANTORE, R.C.; SCHNEIDER, U.; STUBBLEFIELD, W.A.; WOOD, C.M.; WU, K.B. (2002) The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133(C):3-35.
- PAQUIN, P.R.; SANTORE, R.C.; WU, K.B.; KAVVADAS, C.D.; DI TORO, D.M. (2000) The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. *Environmental Science and Policy*, 3:S175-S182.
- PATEL, M.; ROGERS, J.T.; PANE, E.F.; WOOD, C.M. (2006) Renal responses to acute lead waterborne exposure in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 80:362-371.
- PEAKALL, D.; BURGER, J. (2003) Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56:110–121.
- PEREIRA, B.F.; CAETANO, F.H. (2009) Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish. *Micron*, 40:783-786.
- PEREIRA-MADUENHO, L.; MARTINEZ, C.B.R. (2008) Acute effect of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry Physiology*, 148(3):265-272.
- PERRY, S.F. (1997) The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annual Review of Physiology*, 59:325-347.
- 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. *General and Comparative Endocrinology*, 108:472-482.
- RAJASEKARAN, A.K.; RAJASEKARAN, S.A. (2003) Role of Na-K-ATPase in the assembly of tight junctions. *American Journal of Physiology -Renal Physiology*, 285:F388–F396.
- RAJASEKARAN, S.A.; BARWE, S.P.; GOPAL, J.; RYAZANTSEV, S.; SCHNEEBERGER, E.E.; RAJASEKARAN, A.K. (2007) Na-K-ATPase regulates tight junction permeability through occludin phosphorylation in pancreatic epithelial cells. *American Journal of Physiology -Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1):G124–G133.

- RAJASEKARAN, S.A.; PALMER, L.G.; MOON, S.Y.; PERALTA-SOLER, A.; APODACA, G.L.; HARPER, J.F.; ZHENG, Y.; RAJASEKARAN, A.K. (2001) Na,K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 12:3717-3732.
- RAMESH, M.; SARAVANAN, M.; KAVITHA, C. (2009) Hormonal responses of the fish, *Cyprinus carpio*, to environmental lead exposure. *African Journal of Biotechnology*, 8(17):4154-4158.
- RATHORE, R.S.; KHANGAROT, B.S. (2003) Effects of hardness and metal concentration on a freshwater *Tubifex tubifex* muller. *Water, Air, and Soil Pollution*, 142:341–356.
- RATTNER, B.A.; GOLDEN, N.H.; TOSCHIK, P.C.; MCGOWAN, P.C.; CUSTER, T.W. (2008) Concentrations of metals in blood and feathers of nestling ospreys (*Pandion haliaetus*) in Chesapeake and Delaware Bays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54:114-122.
- ROACH, A.C.; MAHER, W.; KRIKOWA, F. (2008) Assessment of Metals in Fish from Lake Macquarie, New South Wales, Australia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54:292–308.
- ROGERS, J.T.; PATEL, M.; GILMOUR, K.M. E WOOD, C.M. (2005) Mechanisms behind Pb-induced disruption of Na⁺ and Cl⁻ balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289:R463-R472.
- ROGERS, J.T.; RICHARDS, J.G.; WOOD, C.M. (2003) Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 64:215-234.
- ROGERS, J.T.; WOOD, C.M. (2004) Characterization of branchial lead–calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Experimental Biology*, 207:813-825.
- ROSE, A.M.; VALDES JR., R. (1994) Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clinical Chemistry*, 40(9):1674-1685.
- SAMPAIO, F.G.; BOIJINK, C.L.; OBA, E.T.; SANTOS, L.R.B.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. (2008) Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147(C):43– 51.

- SCHMITT, C.J.; BRUMBAUGH, W.G.; MAY, T.W. (2007a) Accumulation of metals in fish from lead–zinc mining areas of southeastern Missouri, USA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67:14-30.
- SCHMITT, C.J.; WHYTE, J.J.; ROBERTS, A.P.; ANNIS, M.L.; MAY, T.W.; TILLITT, D.E. (2007b) Biomarkers of metals exposure in fish from lead–zinc mining areas of southeastern Missouri, USA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67:31–47.
- SCHNEERBERGER, E.E.; LYNCH, R.D. (1984) Tight junctions: their structure, composition, and function. *Journal of the American Heart Associations -Circulation Research*, 55:723-233.
- SIEGEL, G.J.; FOGT, S.M. (1977) Inhibition by lead ion of *Electrophorus* electroplax (Na^+ - K^+)-adenosine triphosphatase and K^+ -p-nitrophenylphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(15):201-5205.
- SIMONATO, J.D.; ALBINATI, A.C.; MARTINEZ, C.B.R. (2006) Effects of the soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76:505-511.
- SIMONATO, J.D.; GUEDES, C.L.B.; MARTINEZ, C.B.R. (2008) Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69:112–120.
- SKAGGS, H.S.; HENRY, R.P. (2002) Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133(C):605-612.
- SKERFVING, S.; BERGDAHL, I.A. (2007) Lead. In: NORDBERG, G.F.; FOWLER, B.A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L.T. (Eds.) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Amsterdam: Elsevier. 3^a ed., c.31, pp.599-643.
- SKIDMORE, J.F. (1970) Respiration and osmoregulation in rainbow trout with gills damaged by zinc sulphate. *Journal of Experimental Biology*, 53:481-494.
- SOUZA-BASTOS, L.R.; FREIRE, C.A. (2009) The handling of salt by the neotropical cultures freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*. 289:167-174.
- SPOKAS, E.G.; CRIVELLONE, M.D.; KEMP, F.; BOGDEN, J.D.; COHEN, G.M. (2002) Characterization of sodium, potassium, ATPase activity in the gills of *Pimephales*

promelas (fathead minnow): influence of in vitro exposure to lead. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69:384-392.

SPOKAS, E.G.; SPUR, B.W.; SMITH, H.; KEMP, F.W.; BOGDEN, J.D. (2006) Tissue lead concentration during chronic exposure of *Pimephales promelas* (Fathead Minnow) to lead nitrite on aquarium water. *Environmental Science Technology*, 40(21):6852-6858.

STORELLI, M.M.; GIACOMINELLI-STUFFLER, R.; STORELLI, A.; MARCOTRIGIANO, G.O. (2005) Accumulation of mercury, cadmium, lead and arsenic in swordfish and bluefin tuna from the Mediterranean Sea: A comparative study. *Baseline -Marine Pollution Bulletin*, 50:993-1018.

STREIT, B. (1998) Bioaccumulation of contaminants in fish. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. *Fish Ecotoxicology*. Basel: Birkhäuser. c.12, pp.353-387.

SUIÇMEZ, M.; KAYIM, M.; D. KÖSEOĞLU, D.; HASDEMİR, E. (2006) Toxic effects of lead on the liver and gills of *Oncorhynchus mykiss* WALBAUM 1792. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 77:551-58.

TAO, S.; LIU, C.; DAWSON, R.; CAO, J.; LI, B. (1999) Uptake of particulate lead via the gills of fish (*Carassius auratus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37:352-357.

TERRA, B.F.; ARAÚJO, F.G.; CALZA, C.F.; LOPES, R.T. & TEIXEIRA, T.P. (2008) Heavy Metal in Tissues of Three Fish Species from Different Trophic Levels in a Tropical Brazilian River. *Water, Air, and Soil Pollution*, 187(1-4):275-284.

THOMAS, P. (2008) The endocrine system. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. (Eds.) *The Toxicology of Fishes*. c.10, pp.457-488. CRC Press, Boca Raton.

TORRE, F.R.; SALIBIAN, A.; FERRARI, L. (2007) Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosfere*, 68:1582-1590.

VILLAR, C.; STRIPEIKIS, J.; COLAUTTI, D.; D'HUICQUE, L.; TUDINO, M.; BONETTO, C. (2001) Metals contents in two fishes of different feeding behaviour in the Lower Paraná River and Río de la Plata Estuary. *Hydrobiologia*, 457:225-233.

VINODHINI, R.; NARAYANAN, R. (2008) Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *International Journal of Environmental Science and Technology*, 5(2):179-182.

- 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). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 122(C):121-129.
- WENDELAAR-BONGA, S.E. (1997) The Stress response in fish. *Physiological Reviews*. 77(3):591-618.
- WENDELAAR-BONGA, S.E.; LOCK, R.A.C. (2008) The osmoregulatory system. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. (Eds.) *The Toxicology of Fishes*. c.8, pp.401-415. CRC Press, Boca Raton.
- WINKALER, E.U.; SILVA, A.G.; GALINDO, H.C.; MARTINEZ, C.B.R. (2001) Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum*, 23(2):507-514.
- WHO (1995) *World Health Organization: Environmental Health Criteria* 165. Geneva: International Programme on Chemical Safety.
- WOOD, C.H. (2001) Toxic responses of the gills. In: SCHLENK, D.; BENSON, W.H. (Eds.) *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts*. New York: Taylor and Francis, v.1, c.1, pp.1-101.
- YABE, M.J.S.; OLIVEIRA, E. (1998) Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Química Nova*, 21(5):551-556.