

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA DA SILVA PEREIRA

EFEITOS DO CÁDMIO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS,  
HEMATOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DE *Rhamdia quelen*

CURITIBA

2014

LETÍCIA DA SILVA PEREIRA

EFEITOS DO CÁDMIO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS,  
HEMATOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DE *Rhamdia quelen*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Aluna: Letícia da Silva Pereira.  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helena Cristina da Silva de Assis.

CURITIBA

2014

1 **ATA DO JULGAMENTO DA 94ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**  
2 Ao vigésimo quarto dia do mês de abril do ano de dois mil e quatorze, às quatorze horas,  
3 no Auditório do Departamento de Farmacologia, do Anexo I, do Setor de Ciências  
4 Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da  
5 Dissertação de Mestrado de autoria da pós-graduanda **LETÍCIA DA SILVA PEREIRA**,  
6 intitulada "Efeitos do cádmio em parâmetros bioquímicos, genotóxicos, hematológicos e  
7 histológicos de *Rhamdia quelen*", sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helena Cristina da Silva de  
8 Assis e composta pelos professores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helena Cristina da Silva de Assis  
9 (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Bueno dos Reis Martinez  
10 (Ciências Fisiológicas – UEL) e Dr.<sup>a</sup> Luciana Rodrigues de Souza (Fisiologia – UFPR). A  
11 Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para  
12 expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida durante trinta minutos por cada  
13 um dos membros da Banca e tendo trinta minutos para responder a cada uma das  
14 arguições. No final da sessão, a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer:  
15 APROVADA. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-  
16 Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a publicação, o trabalho  
17 deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Nada  
18 mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a  
19 presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos demais Membros da Banca  
20 Examinadora em Curitiba, 24 de abril de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helena Cristina da Silva de Assis (Presidente - Farmacologia - UFPR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Bueno dos Reis Martinez (Ciências Fisiológicas – UEL)

  
\_\_\_\_\_  
Dr.<sup>a</sup> Luciana Rodrigues de Souza (Fisiologia – UFPR)

## AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Daniel e meu filho, Davi, que são a razão da minha existência.

Aos meus pais, Neide e Luiz, pelo amor de sempre.

À minha cunhada, Débora, por ser uma grande amiga e meu braço direito nos últimos anos.

À minha orientadora, Helena, por ter acreditado na minha capacidade e pela oportunidade que me deu, ainda em 2009, que certamente foi o estopim para que eu conseguisse chegar até aqui e mantivesse o desejo de seguir na pesquisa.

A todos os colegas e amigos de laboratório, Ana Paula, João Luiz, Camila, Sabrina, Franciele, Ana Carolina, Juliana, mas em especial à Cris, pela amizade sincera que foi construída nestes anos de trabalho e conversa.

À Cibele, especialmente pelas conversas descontraídas, mas também pelas palavras de incentivo.

A todos os colegas de departamento, pelas conversas na hora do cafezinho.

Aos colegas que diretamente colaboraram para que este trabalho fosse concretizado: João Luiz, Taynah e Fabíola.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Bueno dos Reins Martinez (UEL) e à Dr<sup>a</sup>. Luciana Rodrigues de Souza (UFPR), pela avaliação e pelas contribuições feitas a este trabalho.

Ao CNPq e a CAPES, pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

## RESUMO

O cádmio (Cd) pode provocar efeitos adversos devido à sua alta toxicidade mesmo em pequenas quantidades e pela sua capacidade de se bioacumular na cadeia alimentar. Neste estudo foram avaliados os efeitos da exposição subcrônica a concentrações ecologicamente relevantes de Cd em jundiás (*Rhamdia quelen*). Os animais foram divididos em quatro grupos expostos ao Cd (0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), sendo as concentrações de 1 e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  os limites permitidos, em águas de classe I e II, ou III, respectivamente, pela Resolução 357/05 do CONAMA e um grupo controle (sem Cd). Após 15 dias os peixes foram anestesiados, e foi feita a coleta de sangue, destinado à análise de biomarcadores genotóxicos e dos parâmetros hematológicos. Em seguida foram eutanasiados e o fígado e o rim posterior foram coletados para a análise de genotoxicidade, dos biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo e da concentração de metalotioneínas (MT). No fígado também foi realizada a análise histopatológica. O cérebro e o músculo axial foram amostrados para a análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE). Os resultados mostraram que o Cd bioconcentrou-se no fígado dos animais expostos a 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd. A atividade da glutatona S-transferase (GST) hepática foi diminuída nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e aumentada no grupo exposto a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Nestas mesmas concentrações (0,1, 1 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) houve aumento na lipoperoxidação (LPO), acompanhada do aumento das lesões hepáticas, como a presença de necrose. No rim posterior, a atividade da catalase e a LPO diminuíram em todos os grupos expostos. A atividade da glutatona peroxidase e da etoxiresorufina-O-deetilase e a concentração de MT renais aumentaram no grupo exposto à maior concentração de Cd, mas o nível de GSH diminuiu. A genotoxicidade foi observada apenas em eritrócitos. A exposição ao Cd também causou a diminuição de vários parâmetros hematológicos, como o número de eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Não foi observada neurotoxicidade através das atividades da AChE cerebral e muscular nos grupos expostos. Estes resultados mostraram que o Cd, mesmo em baixas concentrações provocou alterações bioquímicas, hematológicas, histopatológicas e genotóxicas em jundiás. Sendo assim, evidenciou-se que os limites de Cd, permitidos na legislação brasileira, não asseguram a saúde dos peixes da espécie *Rhamdia quelen*.

**PALAVRAS-CHAVE:** cádmio; estresse oxidativo; biomarcadores; hematologia; *Rhamdia quelen*.

## ABSTRACT

Cadmium (Cd) can produce adverse effects due to its high toxicity even in small quantities and its capability of bioaccumulation in food-chain. In this study was evaluated the sub-chronic effects of ecologically concentrations of cadmium (Cd) exposure on silver catfish (*Rhamdia quelen*). Animals were divided in four groups exposed to Cd (0.1, 1, 10 and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), with concentrations of 1 and 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  allowed limits in waters of class I and II, or III, respectively, by Resolution 357/05 of CONAMA and a control group without Cd. After 15 days the fish were anesthetized, the blood was taken for the genotoxic biomarkers and hematological analysis. They were euthanized and the liver and posterior kidney were taken for genotoxic and biochemical biomarkers of oxidative stress and metallothioneins (MT) concentration analysis. In the liver was also carried out histopathological analysis. The brain and axial muscle were sampled for acetylcholinesterase (AChE) activity. The results showed a bioconcentration of Cd in the liver at 10 and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . The hepatic glutathione S-transferase (GST) activity decreased at 0.1 and 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  and increased at 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  of Cd. In these concentrations (0.1, 1 and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) was also observed an increasing in lipoperoxidation (LPO) and in the hepatic histopathological lesions as the presence of necrosis. In the posterior kidney, the catalase activity and LPO reduced in all exposed groups. The glutathion peroxidase and etoxiresorufin-O-deetilase activities and kidney MT concentration increased at the highest concentration of Cd, but GSH level decreased. The genotoxicity was observed only in erythrocytes. The Cd exposure also caused a decrease in several hematological parameters such as the number of erythrocytes, leukocytes and thrombocytes. It was not observed neurotoxicity by AChE activity in brain and muscle in the exposed groups. These results showed that Cd, even at low concentrations, caused biochemical, hematological, histopathological and genotoxic alterations in the silver catfish. Thus, it became clear that the limits of Cd, allowed by Brazilian law, do not ensure the health of fish species *R. quelen*.

**KEYWORDS:** cadmium; oxidative stress; *Rhamdia quelen*; biomarkers; hematology.

## ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Biomarcadores.....	11
1.1.1 Biomarcadores Bioquímicos.....	12
1.1.2 Biomarcador Morfológico.....	16
1.1.3 Biomarcadores Genéticos.....	17
1.1.4 Biomarcadores Hematológicos.....	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetvos Específicos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Animais.....	21
3.2 Desenho Experimental – bioensaio.....	21
3.3 Bioconcentração.....	22
3.4 Índice Hepatosomático.....	22
3.5 Biomarcadores Bioquímicos.....	23
3.5.1 Preparação das amostras.....	23
3.5.2 Acetilcolinesterase (AChE) .....	23
3.5.3 Catalase (CAT) .....	24
3.5.4 Superóxido dismutase (SOD) .....	24
3.5.5 Glutaciona S-transferase (GST) .....	24
3.5.6 Glutaciona peroxidase (GPx) .....	25
3.5.7 Etoxiresorufina O-deetilase (EROD) .....	25
3.5.8 Glutaciona reduzida (GSH) .....	25
3.5.9 Lipoperoxidação (LPO) .....	26
3.5.10 Carbonilação de proteínas (PCO) .....	26
3.5.11 Metalotioneínas (MT) .....	26
3.5.12 Concentração proteica.....	27
3.6 Biomarcador Morfológico.....	27
3.7 Biomarcadores Genéticos.....	28
3.7.1 Ensaio cometa.....	28
3.7.2 Micronúcleo písceo.....	28

3.8 Biomarcadores Hematológicos.....	29
3.9 Análise estatística.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Bioconcentração.....	31
4.2 Índice Hepatosomático.....	31
4.3 Biomarcadores Bioquímicos.....	32
4.4 Biomarcador Morfológico.....	36
4.5 Biomarcadores Genéticos.....	38
4.6 Biomarcadores Hematológicos.....	40
5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÕES.....	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49



## 1 INTRODUÇÃO

O ambiente aquático reflete efeitos de várias atividades que ocorrem ao seu redor, pois está aguda e cronicamente exposto a poluentes que podem prejudicar o desenvolvimento da biota. Diversos fatores colaboram para o aumento significativo dos lançamentos de despejos e resíduos nos cursos d'água, como: o alto nível de industrialização, a intensa atividade agrícola e a concentração de atividades humanas próximas de áreas onde encontramos a maioria dos recursos hídricos, sendo que a contaminação do ambiente aquático por substâncias tóxicas pode, além de causar efeitos locais a curto prazo, levar a alterações sistêmicas como a contaminação de bacias hidrográficas e o comprometimento de reservatórios hídricos subterrâneos.

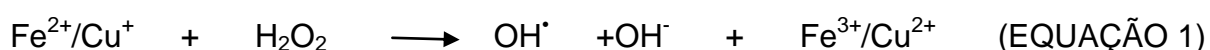
A contaminação do ambiente aquático provém, principalmente, de atividades industriais e agrícolas, e diversos metais podem estar presentes em resíduos destas atividades. Consequentemente a contaminação destes ambientes pode causar efeitos adversos na biota e inclusive no homem, visto que a nossa espécie utiliza extensivamente os recursos hídricos, seja para fins energéticos, recreativos, de transporte, de consumo direto ou como fonte de alimentos. Outro agravante para a contaminação por metais se deve à sua persistência no ambiente, pois estes compostos não podem ser degradados por processos biológicos, e ainda possuem a capacidade de se bioacumular nos organismos (FAROMBI; ADELOWO; AJIMOKO, 2007; MORAES; JORDÃO, 2002)

A falta de controle no descarte de resíduos contaminados com metais tem feito com que estes elementos se tornem um problema global de contaminação ambiental. Os metais estão causando alterações na qualidade dos solos, das águas e do ar, além de impactos ecológicos pela sua capacidade de incorporar em tecidos e então serem assimilados na cadeia alimentar (OLIVA *at al.*, 2012; VEADO *at al.*, 2006).

Alguns metais, como ferro, cobre e zinco, são considerados metais essenciais, pois desempenham importantes funções nos sistemas biológicos. No entanto, o cádmio, assim como o chumbo e o mercúrio, é um metal não essencial, sendo tóxico mesmo em pequenas quantidades e com capacidade de biacumulação na cadeia trófica (ENSAFI *at al.*, 2006; TÜZEN, 2003).

O cádmio está entre os poluentes ambientais mais tóxicos, sendo capaz de causar uma série de disfunções bioquímicas na maioria dos organismos, causando danos a órgãos como pulmões, rins, fígado, testículos e placenta, e podendo induzir morte celular. O sistema circulatório também pode ser um alvo do cádmio, pois ele é absorvido para a corrente sanguínea através de transportadores de metal. Outra propriedade toxicológica do cádmio provém de sua semelhança estrutural com o cálcio e com o zinco, permitindo que ele possa interferir nas funções fisiológicas destes elementos (SUWALSKY *at al.*, 2004).

Por não ser um metal redox ativo, o Cd não participa da reação de Fenton (EQUAÇÃO 1), no entanto ele está envolvido na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Um dos possíveis mecanismos envolvidos neste processo pode ser o aumento indireto de ERO através do deslocamento de metais como cobre (Cu) e ferro (Fe) que são metais redox ativos e diretamente participam da formação de ERO através da reação de Fenton (FILIPICĀ, 2012).



Os organismos aquáticos, em especial os peixes, que estão expostos aos metais, como o Cd, estão sujeitos a duas principais vias de contaminação, uma quando o metal está dissolvido na água e pode ser absorvido pelas brânquias, e a outra quando o metal se encontra ligado a partículas sólidas propiciando a ingestão do mesmo, que será absorvido pelo epitélio do trato digestivo (MARTIGNAGO *at al.*, 2009). Sabe-se ainda, que o cádmio possui grande afinidade por grupamentos SH, os quais são importantes para a manutenção do estado redox intracelular e da estrutura e função de algumas enzimas. Este metal pode estar associado com a oxidação de macromoléculas e pode alterar o sistema antioxidante, através de mudanças no estado redox da célula (DORTS *at al.*, 2012).

Atualmente, o cádmio ainda é de grande importância para a indústria, estando presente em diversos produtos, como baterias e pilhas, pigmentos, revestimentos de metal, plásticos, fertilizantes e ligas metálicas (MÉNDEZ-ARMENTA; RÍOS, 2007). Algumas fontes naturais, como desgaste de minerais, emissões vulcânicas e queimadas em florestas, além do descarte dos produtos e resíduos industriais e

agrícolas, constituem as principais fontes de entrada do Cd no ambiente (KALIČANIN, 2009).

Segundo a Resolução 357/05, do Conselho Nacional do Meio Ambiente, sobre a qualidade da água brasileira, o limite máximo permitido de cádmio no meio aquático é de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  em águas de classe I e II, e de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  em águas de classe III, que compreendem as águas destinadas a consumo humano e animal, após tratamento simples, convencional ou avançado (CONAMA, 2005). No entanto este metal vem sendo encontrado em concentrações acima deste limite em alguns corpos d'água brasileiros, como no Lago Extremoz, do Rio Grande do Norte, onde Barbosa *et al.* (2010) encontraram até  $15 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd, e na Represa da Pampulha, em Minas Gerais, onde até  $180 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd foram encontrados por Rietzler, Fonseca e Lopes (2001). Mas isto não ocorre apenas no Brasil, em outros países, como Tunísia, Canadá e Bélgica também foram detectadas altas concentrações de Cd em corpos d'água (BARHOUMI *at al.*, 2009; BERVOETS *at al.*, 2009; REYNDERS *at al.*, 2008; TOMPSETT *at al.*, 2014).

Na toxicologia, muitos estudos utilizam peixes como modelo animal de toxicidade. Fatores como a manutenção em laboratório, cuidados com a limpeza, alimentação, baixos custos para manutenção dos animais e a fácil aquisição dos exemplares favorece a utilização deste grupo em bioensaios.

O peixe *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824, Siluriformes, Heptapteridae) (FIGURA 1), também conhecido popularmente como jundiá, é uma espécie de água doce, endêmica da América do Sul (BARCELLOS *at al.*, 2010), ocorrendo do sul do México ao centro da Argentina (GOMES *at al.*, 2000).

O jundiá prefere viver em fundos de rios e lagos, locais mais escuros e onde a água é mais calma, buscam esconder-se durante o dia e a noite saem para se alimentar. Esta espécie pode ser considerada euritérmica, pois suportam temperaturas entre  $15$  e  $34^\circ \text{C}$ , esta característica favorece sua criação em ambientes de clima temperado e subtropical, pois confere altas taxas de crescimento no verão e boa tolerância ao frio do inverno. Teoricamente os machos podem viver até 11 anos e as fêmeas até 21. São onívoros e generalistas, buscando recursos alimentares ao longo de toda a coluna d'água. A maturidade sexual, em ambos os sexos, acontece por volta de 1 ano de idade, e eles não apresentam cuidado parental com a prole (GOMES *at al.*, 2000).

Devido a estas características, a espécie *R. quelen* tem sido intensivamente criada e amplamente estudado em diversos aspectos, como sua fisiologia geral e reprodutiva (BARCELLOS *at al.*, 2001, 2004b; BIBIANO MELO *at al.*, 2006; COLDEBELLA *at al.*, 2011; HERNÁNDEZ *at al.*, 2012; MEYER; FRACALLOSSI, 2004; SANCHES *at al.*, 2011) e suas respostas à exposição a agrotóxicos (DOS SANTOS MIRON *at al.*, 2004; FERREIRA *at al.*, 2010; KREUTZ *at al.*, 2010; MELA *at al.*, 2013; MELO *at al.*, 2008; SOSO *at al.*, 2007), a anti-inflamatórios, como a dipirona (PAMPLONA *et al.*, 2011). No entanto, ainda são escassos os trabalhos que avaliam sua resposta à exposição a metais (BENADUCE *at al.*, 2008; CORREA *at al.*, 2008; PRETTO *at al.*, 2010, 2011, 2014).

Portanto, diante do exposto, torna-se relevante a avaliação dos possíveis efeitos do cádmio na biota presente no meio aquático, como é o caso do jundiá (*Rhamdia quelen*), que foi o bioindicador escolhido para este trabalho.



FIGURA 1: exemplares de *Rhamdia quelen*.  
FONTE: a autora (2014).

### 1.1 Biomarcadores

Biomarcadores são alterações bioquímicas, fisiológicas, celulares ou teciduais em resposta a poluentes ambientais, que podem ser mensuradas, indicando a presença, o efeito e por vezes o grau de contaminação (WALKER, 1995).

Por refletir o *status* saudável do organismo, inclusive nos níveis mais baixos de organização (celular e molecular), apresentarem rápida resposta ao estresse e possuírem grande importância toxicológica, os biomarcadores podem ser utilizados como indicadores precoces de alterações ambientais, auxiliando na tomada de decisões que evitem ou mitiguem danos ambientais, antes que estes se tornem irreversíveis (SILVA DE ASSIS, 1998; SILVA, 2007).

Existem diversos tipos de biomarcadores, como os hematológicos, os genéticos, os morfológicos, os bioquímicos, entre diversos outros. Neste trabalho foram utilizados biomarcadores bioquímicos, que detectam efeitos do agente tóxico em enzimas e proteínas, biomarcadores morfológicos, que avaliam danos a nível celular e tecidual, biomarcadores genéticos que avaliam danos do DNA ou falhas no processo de replicação celular, e biomarcadores hematológicos, que avaliam células como leucócitos, trombócitos e eritrócitos, além da análise de bioconcentração, que também pode ser considerada um biomarcador. Portanto, em conjunto, estes biomarcadores permitem a avaliação de respostas fisiológicas do organismo bioindicador frente à ação de agentes estressores.

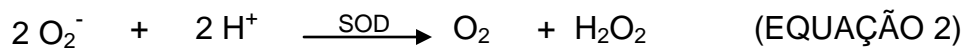
### 1.1.1 Biomarcadores bioquímicos

A avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), que em peixes é encontrada no cérebro, eritrócitos e no músculo (KLEMZ; SILVA DE ASSIS, 2005), é um biomarcador bioquímico de neurotoxicidade, pois esta é uma enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na sinapse, facilitando a transmissão de impulsos nervosos de um neurônio para outro (VIRGENS, 2009), prevenindo que ocorra um estímulo contínuo do neurônio, mantendo o funcionamento normal do sistema motor e sensorial. A atividade desta enzima é um biomarcador a muito tempo estabelecido quando se trata de exposições a agrotóxicos organofosforados e carbamatos, que são compostos capazes de inibir sua atividade mesmo em pequenas concentrações. Em relação a esta classe de contaminantes (agrotóxicos) há uma extensa literatura que aborda diferentes tipos de exposições em diversas espécies (ALMEIDA e MORAES, 2005; BALDISSEROTTO, 2009; DA FONSECA *et al.*, 2008; MELA *et al.*, 2013). Em relação aos metais, o que se observa é a inibição na atividade desta enzima, normalmente esta relacionada à concentrações elevadas do contaminante (PRETTO *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2009).

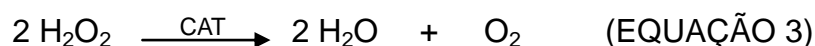
Outros biomarcadores bioquímicos se referem ao sistema antioxidante e avaliam enzimas e proteínas relacionadas ao balanço na produção e degradação de espécies reativas (ERO) e radicais livres no organismo e também o sistema de biotransformação, que é responsável pela metabolização de compostos tóxicos. No

sistema antioxidante têm-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX) e o composto não enzimático glutathiona reduzida (GSH). O sistema de biotransformação envolve as enzimas de fase I e II do metabolismo como a etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e glutathiona S-transferase (GST).

A SOD é uma metaloenzima responsável pela degradação de um radical livre de oxigênio, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), atuando na primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHO *at al.*, 2006). Na reação de dismutação do  $O_2^-$  a SOD produz peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) (EQUAÇÃO 2). A atividade desta enzima evita que ocorram reações do  $O_2^-$  com constituintes celulares, ou então que este ânion venha a gerar novos radicais livres de alta reatividade, como o  $OH^-$  (hidroxil), que podem reagir com lipídios e proteínas, causando danos celulares.



Apesar da SOD atuar evitando que o  $O_2^-$  cause danos, o produto desta reação, o  $H_2O_2$ , também pode causar diversos danos celulares, visto que se trata de uma ERO que pode penetrar nas células e diretamente inativar enzimas (ATLI *at al.*, 2006). Desta forma, as enzimas CAT e GPx são as responsáveis por degradar o  $H_2O_2$ . A CAT é uma enzima que está presente nos peroxissomos da maioria das células, e atua convertendo esta ERO ( $H_2O_2$ ) em  $H_2O$  e  $O_2$  (EQUAÇÃO 3). Diferentemente de outras peroxidases, como a GPx, que convertem outros peróxidos, a CAT apenas converte o  $H_2O_2$  (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).



A GPx, é uma enzima selênio-dependente, e como dito acima, também atua na degradação do  $H_2O_2$ . Ela é considerada a principal peroxidase em peixes, de grande importância para a degradação de peróxidos lipídicos, indicando que uma de suas principais funções é evitar a propagação da reação em cascata envolvida na peroxidação lipídica (LPO) (FIGURA 2). E para exercer sua atividade, a GPx

necessita de GSH como cofator, que será oxidada durante a degradação de peróxidos (EQUAÇÃO 4)(VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).



Onde R pode ser um hidrogênio, um lipídeo ou um éster.

A GSH é um componente não enzimático de grande importância para o sistema antioxidante, além de atuar como cofator para a GPx ela possui outras funções de grande relevância no processo de desintoxicação, como atuar no metabolismo de fase II, especialmente através da atividade da GST, sendo conjugada a compostos eletrofílicos, ou então agindo como um potente antioxidante, substituindo grupamentos como de hidrogênio e cloro presentes em compostos eletrofílicos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Ainda, a GSH é capaz de influenciar na toxicidade de um metal, alterando suas taxas de absorção e eliminação, visto que os metais, tanto os essenciais quanto os não essenciais, dependem de moléculas com grupamento tiol (SH), como a GSH, para entrar nas células (LANGE; AUSSEIL; SEGNER, 2002). Sendo assim, alterações nos níveis de GSH estão diretamente relacionadas à capacidade de desintoxicação de um organismo.

Em relação à fase I de biotransformação, o principal componente é o grupo de enzimas do citocromo P450 (CYP 450), especificamente em peixes, a principal subfamília responsável pela biotransformação de xenobióticos é a CYP1A. Para avaliar a resposta desta subfamília, pode-se mensurar sua atividade catalítica, por exemplo, através da atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD). Muitos trabalhos demonstram que a CYP1A pode ser induzida por compostos orgânicos, como PCBs (bifenilas policloradas) e PAHs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Em relação à exposição à íons metálicos, inclusive o Cd, alguns trabalhos observaram a inibição da EROD, e sugere-se que esta resposta se deve a ação direta dos metais em enzimas que contenham o grupamento sulfidríla (SH), como a EROD, ou então indiretamente, através do aumento da produção de ERO (BOZCAARMUTLU; ARINÇ, 2004).

Como citado anteriormente, a fase II de biotransformação conta com a atividade das enzimas GSTs, que pertencem a uma família de isoenzimas multigênicas, o que lhes permite conjugar uma grande diversidade de compostos

lipofílicos com a GSH, tais compostos podem ser de origem endógena, como metabólitos celulares, ou de origem exógena, como contaminantes (metais, agrotóxicos, fármacos). Através desta conjugação estes compostos, de característica lipofílica, se tornam conjugados hidrofílicos e podem ser mais facilmente excretados (KIM *at al.*, 2010), e assim pode ser evitada a formação de ERO pelos contaminantes.

Em relação a contaminação por metais, um importante biomarcador bioquímico não enzimático é a avaliação da concentração de metalotioneínas (MT) que são um conjunto de proteínas com grande conteúdo de metais, especialmente zinco e cobre, e uma incomum abundância de cisteínas. Suas funções fisiológicas estão ligadas ao transporte e armazenamento de metais pesados essenciais, como o cobre e o zinco, e à desintoxicação de metais não essenciais, como o cádmio e o mercúrio, mas outras funções estão sendo propostas a elas, como a proteção contra EROs e a adaptação ao estresse (HIDALGO *at al.*, 2001).

Por fim, os biomarcadores bioquímicos que auxiliam na avaliação de danos causados por um contaminante são a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) e a carbonilação de proteínas (PCO). A LPO é considerada a principal causa de morte e injúria celular, estando associada a várias condições patológicas. Seus danos nas membranas biológicas podem variar de reduções localizadas na fluidez da membrana à ruptura total da integridade da bicamada lipídica (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000). Ela é um dos danos mais importantes causados pelas ERO e as membranas celulares são os locais mais suscetíveis. A LPO acontece pela retirada de prótons  $H^+$  do grupo metileno dos fosfolipídios pelos radicais livres, produzindo dienos conjugados e formando hidroperóxidos lipídicos, que continuarão uma reação em cascata (FIGURA 2) (SILVA, 2007).



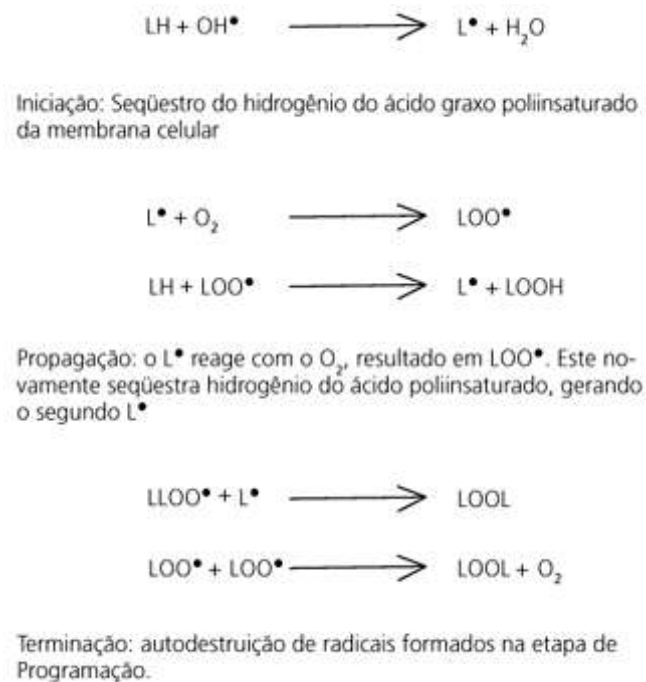


FIGURA 2 - Etapas da reação de lipoperoxidação.  
 FONTE: Batista, Costa e Pinheiro-Sant'ana (2007).

A PCO é um dano que pode ocorrer em organismos sob condições de estresse oxidativo. Ela consiste na modificação de proteínas, através da formação de grupamentos como aldeídos e cetonas em cadeias laterais de aminoácidos. Tais alterações além de indicar o dano causado pelo estresse oxidativo, podem indicar a perda de funções por algumas enzimas, como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a piruvato desidrogenase, envolvidas no processo de metabolismo energético, e a SOD, sendo estas algumas das enzimas sensíveis a esse tipo de alteração (FILIPAK NETO, 2007; ROSSI, 2013).

### 1.1.2 Biomarcador Morfológico

A histopatologia é um biomarcador morfológico utilizado para avaliar danos ao nível celular e tecidual de organismos expostos a contaminantes, sendo também um indicativo do estado de saúde dos mesmos (RABITTO *at al.*, 2005), podendo indicar se a exposição causa prejuízos a funções vitais do organismo. Diversos estudos utilizam a histopatologia como ferramenta na avaliação da exposição a metais (FIGUEIREDO-FERNANDES *at al.*, 2007; GUARDIOLA *at al.*, 2013; RABITTO *at al.*,

2005; THOPHON *at al.*, 2003; WANGSONGSAK *at al.*, 2007), especialmente em fígado. Segundo Van Dyk, Pieterse e Van Vuren (2007) alterações morfológicas no fígado de peixes pode variar de acordo com a duração da exposição e com as concentrações de metais às quais o indivíduo está exposto. E sendo o fígado um órgão importante para a desintoxicação de contaminantes, alterações morfológicas neste órgão podem fornecer informações importantes sobre a toxicidade de contaminantes, como metais, no entanto, é necessária a associação da histopatologia com biomarcadores que avaliem outros níveis de organização biológica para que seja feita uma avaliação precisa dos efeitos de um composto tóxico.

### 1.1.3 Biomarcadores Genéticos

Como citado anteriormente, os biomarcadores genéticos são ferramentas utilizadas para avaliar danos DNA e assim, no processo de replicação celular, que podem ser causados por ERO geradas em um organismo exposto a xenobióticos.

Um destes biomarcadores é o teste do micronúcleo píceo, que foi proposto por Heddle (1973) e Schimid (1975) como um avaliação do dano no DNA através da quantificação e análise dos corpúsculos de Howell-Joly. Estes corpúsculos são estruturas encontradas em células em divisão, e que foram chamadas de micronúcleos, que são compostos por partes de cromossomos ou cromossomos inteiros, que não se mantiveram internalizados no núcleo durante a divisão celular, e formam uma estrutura arredondada, semelhante ao núcleo celular. Por avaliar alterações provenientes da divisão celular, este teste só deve ser aplicado em células com capacidade de divisão. E existem premissas para que uma estrutura seja considerada de fato um micronúcleo: (a) a estrutura deve estar visivelmente afastada do núcleo; (b) devem ter o tamanho de 1/5 a 1/20 do núcleo principal; (c) não podem ser maiores que 1/3 do núcleo principal e (d) e devem possuir bordar distinguíveis e de mesma refringência que o núcleo principal. Em peixes, o tamanho do micronúcleo (b) deve estar entre 1/10 e 1/30 do núcleo principal devido ao menor tamanho dos cromossomos (BOMBAIL *at al.*, 2001; VICARI, 2009). Junto a este teste também pode-se avaliar a estrutura morfológica nuclear, que pode estar alterada, ou seja, sem a sua conformação oval, e desta forma classificar as

alterações morfológicas nucleares (AMN), que também constituem um indicativo de genotoxicidade (VICARI, 2009).

Outro biomarcador genético bastante aplicado em exposições a xenobióticos é o ensaio cometa, ou SCGE (Single-Cell Gel Electrophoresis). Este ensaio possibilita a visualização de quebras de fita simples ou dupla de DNA, que são produzidas sob condições de estresse oxidativo (CAMBIER *at al.*, 2010; ISANI *at al.*, 2009). Neste ensaio as células são submetidas a uma eletroforese, onde o padrão de migração do DNA no gel pode ser visualizado e analisado. O nome cometa provem da cauda que pode ser formada por fragmentos de DNA após a migração, pois pequenos fragmentos tendem a migrar mais rápido que os grandes fragmentos, e quando não há fragmentação o DNA migrará em conjunto, formando uma estrutura circular, chamada de nucleóide. Uma das formas de mensurar o dano é através da razão entre o raio do núcleo e o comprimento da cauda, e os diferentes níveis de danos são então classificados de 0 a 4 (onde 0= nenhum dano e 4= dano máximo, indicando possível apoptose) (VICARI, 2009).

O ensaio cometa possui algumas vantagens em relação a outras técnicas que avaliam do dano em DNA, como (a) permite a avaliação em qualquer célula eucariótica; (b) o dano é detectado ao nível de uma única célula; (c) são necessárias poucas células; (d) é mais rápido e mais sensível que outras técnicas que avaliam quebra de DNA e (e) permitem uma resposta precoce a um xenobiótico, visto que após a exposição, rapidamente ocorrem quebras no DNA (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009; VICARI, 2009)

#### 1.1.4 Biomarcadores Hematológicos

A análise de biomarcadores hematológicos permite a avaliação de eritrócitos, do padrão heme, que é necessário para a síntese de hemoproteínas, como a hemoglobina e para a síntese de alguns citocromos, como o P450, também permite a avaliação de parâmetros relacionados à imunidade dos animais, através da avaliação da série branca (leucócitos, monócitos, linfócitos, mononucleares e neutrófilos) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), além da avaliação dos trombócitos, que são células presentes em peixes com função equivalente às plaquetas de mamíferos, atuando na coagulação.

De acordo com Tavares-Dias *et al.* (2002) as enfermidades, tanto no homem como nos animais, estão relacionadas a alterações hematológicas, o que torna importante o estudo destes parâmetros em peixes expostos a contaminantes. Portanto, avaliando os componentes sanguíneos podem ser geradas informações sobre a fisiologia e o estado de saúde do organismo em questão, e em condições específicas podem ser usados como biomarcadores para os efeitos de um determinado contaminante (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do cádmio em peixes da espécie *Rhamdia quelen* expostos subcronicamente, por via hídrica a concentrações ecologicamente relevantes, incluindo os limites, para águas de classe I, II e III, estabelecidos pela Resolução 357/05 do CONAMA.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar a bioconcentração do cádmio em *Rhamdia quelen* expostos subcronicamente;

Avaliar biomarcadores bioquímicos do sistema antioxidante, do sistema de biotransformação e de neurotoxicidade em *Rhamdia quelen* expostos subcronicamente ao cádmio;

Avaliar biomarcadores hematológicos, de genotoxicidade e morfológicos em *Rhamdia quelen* expostos subcronicamente ao cádmio.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 50 indivíduos, machos e adultos ( $118,03 \pm 8,29$  g;  $22,67 \pm 0,58$  cm), de *Rhamdia quelen* adquiridos da Psicultura Patronato Santo Antônio, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Os peixes foram transportados para o Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, onde permaneceram durante todo o experimento. Por 30 dias estes animais foram aclimatados em condições de laboratório, em tanques escuros de 100 L, com densidade de 10 animais por tanque, contendo água filtrada, aeração constante e filtros de carvão ativado. A temperatura foi mantida a  $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$  e o fotoperíodo em 12 horas. A alimentação foi realizada uma vez ao dia com ração comercial (32% proteína, Primor, Brasil). Todos os procedimentos adotados durante o experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob o certificado número 524.

#### 3.2 Desenho experimental - bioensaio

Após a aclimação, os animais foram mantidos nos mesmos tanques e sob as mesmas condições de temperatura, aeração, fotoperíodo e alimentação. A água utilizada para o bioensaio continuou sendo filtrada (pH entre 7,1 e 7,9), no entanto os filtros externos foram retirados a fim de evitar a perda do contaminante pelo sistema de filtros. A exposição ao cádmio ocorreu por via hídrica, por um período sub-crônico de 15 dias. As concentrações do metal utilizadas foram:  $0 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  (grupo controle);  $0,1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  (10 vezes menor que o limite estabelecido pelo CONAMA para águas de classe I e II);  $1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  (limite estabelecido pelo CONAMA, na Resolução 357/2005, para águas de classe I e II);  $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  (limite estabelecido pelo CONAMA, na Resolução 357/2005, para águas de classe III) e  $100 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  (10 vezes maior que o limite estabelecido pelo CONAMA para águas de classe III). Durante a exposição, 1/3 da água foi trocada a cada 24 horas e a concentração inicial de cádmio foi

totalmente reposta. A escolha do tempo e modelo de reposição do contaminante foi feita com base no estudo do grupo de Química Ambiental do Departamento de Química-UFPR, em parceria com nosso grupo de pesquisa (WILTEMBURG, 2012) onde a concentração de cádmio biodisponível ou lábil mostrou uma queda de aproximadamente 90% após 24 horas em condições de bioensaio.

A solução de cádmio ( $500 \text{ mg.L}^{-1}$ ) utilizada para a contaminação foi feita a partir de uma solução padrão de  $\text{CdCl}_2$  (Sigma-Aldrich) de  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Após os 15 dias de exposição, os animais foram anestesiados em benzocaína 0,001%, pesados, medidos e o sangue coletado através de punção da veia caudal. Imediatamente eles foram eutanasiados por secção da medula espinhal e os órgãos de interesse foram coletados (fígado, rim posterior, cérebro e músculo). O fígado também foi pesado a fresco para o cálculo do índice hepatossomático. Exceto o sangue e as porções de tecido (fígado e rim) destinadas ao ensaio cometa e/ou histopatologia, as demais amostras foram congeladas a  $-80^\circ \text{ C}$ .

### 3.3 Bioconcentração

Para a análise de bioconcentração do Cd, *pools* de fígado e de músculo (0,5 g) foram digeridos em ácido nítrico (65%) e peróxido de hidrogênio (30%), sob aquecimento ( $90-95^\circ \text{ C}$ , por aproximadamente 30 minutos), para aceleração do processo de digestão. A concentração de Cd foi aferida nas amostras digeridas por espectrofotometria de emissão ótica por plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP-OES), pelo Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (CEPPA-UFPR).

### 3.4 Índice Hepatossomático

O índice hepatossomático (IHS) foi calculado a partir do peso do fígado de cada animal em relação ao seu peso total, e expresso em porcentagem, como na fórmula abaixo:

$$\text{IHS} = \frac{\text{peso fígado}}{\text{peso total}} \times 100$$

### 3.5 Biomarcadores Bioquímicos

#### 3.5.1 Preparação das amostras

Um fragmento de cérebro ( $\pm 50$  mg) e do músculo axial ( $\pm 100$  mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5), numa proporção 1:10 (peso: volume). Em seguida o homogenato foi centrifugado a 12.000 xg por 20 minutos à 4° C. O sobrenadante foi aliqotado para a análise da atividade da AChE.

Uma porção ( $\pm 100$  mg) de cada amostra de fígado e de rim posterior foi homogeneizada em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7), numa proporção de 1:10 (peso:volume) e centrifugadas à 15.000 xg por 30 minutos à 4° C. O sobrenadante foi aliqotado para a análise das atividades da SOD, CAT, GST, EROD e GPx e dos níveis de GSH, LPO e PCO.

Outra porção ( $\pm 80$  mg) de cada amostra de fígado e rim posterior foi homogeneizada em tampão Tris-HCl/sacarose buffer (20 mM/500 mM, pH 8,6), numa proporção de 1:5 (peso:volume), centrifugada a 15.000 xg por 30 minutos à 4° C, e o sobrenadante foi aliqotado para a quantificação de MT.

#### 3.5.2 Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE tanto cerebral quanto muscular foi medida segundo método de Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998), que consiste no desenvolvimento de uma reação colorimétrica entre o ATC (iodeto de acetilticolina) e o DTNB (5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato) na presença de AChE, que pode ser mensurada por espectrofotometria a 405 nm. Para tanto as amostras foram diluídas para 800  $\mu\text{g}$  de proteína. $\text{mL}^{-1}$  em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5). Em microplaca foram pipetados 50  $\mu\text{L}$  de amostra, 200  $\mu\text{L}$  de DTNB (0,75 mM) e 50  $\mu\text{L}$  de ATC (9 mM), respectivamente. A leitura da atividade foi feita por 3 minutos em intervalos de 15 segundos, e a mesma foi expressa em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$  de proteína $^{-1}$ .



### 3.5.3 Catalase (CAT)

Para medir a atividade da CAT hepática e renal foi utilizado o método de Aebi (1984), que se baseia no consumo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) exógeno pela CAT, gerando água e oxigênio, podendo ser mensurado por espectrofotometria a 240 nm. As amostras foram diluídas (1:5) e como substrato foi utilizada uma solução de  $H_2O_2$  a 20 mM. Em microplaca foram adicionados 5  $\mu$ L da amostra e 295  $\mu$ L da solução de  $H_2O_2$ . A leitura da absorbância foi realizada a cada 15 segundos durante 1 minuto e a atividade foi expressa em  $\mu$ mol. $min^{-1}$ .mg de proteína $^{-1}$ .

### 3.5.4 Superóxido dismutase (SOD)

Para a análise da atividade da SOD, no fígado e rim, foi utilizado o método proposto por Gao *et al.*(1998) que se baseia na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. O sobrenadante foi diluído de 1:10 (ou 10% V/V) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0). Em microtubo foram adicionados 885  $\mu$ L de tampão Tris/EDTA (1 M / 5 mM, pH 8,0) e 50  $\mu$ L de pirogalol (15 mM) a 40  $\mu$ L de amostra. A solução foi incubada por 30 minutos. A reação foi interrompida com 25  $\mu$ L de HCl 1N. Em microplaca foram adicionados 300  $\mu$ L por poço e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 440 nm. Concomitantemente foi realizado um controle por amostra com adição dos reagentes, mas sem incubação, sendo este valor igual a 100%. A quantidade de SOD que inibi a reação de auto-oxidação do pirogalol em 50% (IC50) equivale a 1 unidade (U) de SOD. A atividade foi expressa em U de SOD. mg de proteína $^{-1}$ .

### 3.5.5 Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida segundo o método descrito por Keen, Habig e Jakoby (1976), baseado na catalisação da reação de conjugação do CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a glutathione reduzida (GSH), pela GST, formando um tioéter que pode ser medido pelo aumento da absorbância a 340 nm. Os sobrenadantes de fígado e rim foram diluídos para 2 mg de proteína.mL $^{-1}$ . Em microplaca foram adicionados 20  $\mu$ L de amostra, seguido de 180  $\mu$ L de solução reação [GSH (3mM),

CDNB (3 mM), tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 6,5)]. A medida da absorvância foi feita a cada 15 segundos durante 3 minutos, e a atividade foi expressa em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

### 3.5.6 Glutaciona peroxidase (GPx)

A atividade desta enzima foi mensurada pelo decréscimo da absorvância a 340 nm, ocasionado pela redução de GSSG (glutaciona oxidada) em GSH, na presença de NADPH, promovido pela GR (glutaciona redutase), pois a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional a produção de GSSG, pela GPx, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de acordo com o método proposto por Hafeman, Sunde e Hoekstra (1974). Para tanto, em microplaca, foi adicionado a amostra, uma solução de azida sódica (2 mM), com o objetivo de inibir a atividade da CAT, para que ela não degrade o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente, e por último uma solução reação, contendo: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM), NADPH (0,3077 mM), GSH (3,0769 mM) e GR (1,54 U.mL<sup>-1</sup>) diluídos em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7). A leitura da atividade foi feita por 2 minutos, a cada 15 segundos e os resultados foram expressos em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

### 3.5.7 Etoxiresorufina O-deetilase (EROD)

A análise da EROD foi realizada segundo o método de Burke e Mayer (1974), a partir da determinação por espectrofluorimetria, a 530 nm de excitação e 590 nm de emissão, da resorufina resultante da metabolização da 7-etoxiresorufina pela EROD. Em microplaca, de fundo e paredes pretas, foram adicionados: a amostra, uma solução de 7-etoxiresorufina (2,6  $\mu\text{M}$ ), e a microplaca permaneceu incubada por 5 minutos, em seguida foi adicionada a solução contendo o cofator NADPH (2,6 mM). Imediatamente a fluorescência foi mensurada, a cada 1 minuto, por 10 minutos. A atividade foi expressa em  $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

### 3.5.8 Glutaciona reduzida (GSH)

A concentração de GSH foi determinada segundo o método proposto por Sedlak e Lindsay (1968), utilizando uma curva-padrão de GSH (0, 2,5, 5, 10, 20, 40

e 80 nM) para comparação, e a leitura foi realizada por espectrofotometria a 415 nm. O método se baseia na capacidade de ligação do DTNB com grupamentos tióis (SH), que estão presentes na GSH, para tanto é realizada uma precipitação de proteínas presentes no sobrenadante com ácido tricloroacético 50% (TCA), seguida de centrifugação. O sobrenadante obtido, onde é preservado o conteúdo de GSH, é adicionado em microplaca, seguido de tampão Tris-base (0,4 M) e da solução de DTNB (2,5 mM). A unidade de concentração usada foi  $\mu\text{g}.\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

### 3.5.9 Lipoperoxidação (LPO)

A análise da LPO foi feita através da avaliação da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio FOX (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992), com leitura em espectrofotômetro a 570 nm. O método consiste na oxidação do ferro, mediada pela presença de peróxidos em meio ácido. Para tanto, os sobrenadantes foram diluídos em metanol (1:2 v/v) e centrifugados. 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram incubados por 30 minutos com 900  $\mu\text{L}$  da solução reação contendo laranja de xilenol (0,1 mM), BHT (4 mM), sulfato ferroso amoniacal (2,5 mM) e ácido sulfúrico (25 mM), diluídos em metanol. A unidade de concentração de peróxidos lipídicos usada foi nmol. mg de proteína<sup>-1</sup>.

### 3.5.10 Carbonilação de proteínas (PCO)

A carbonilação de proteínas (PCO) foi analisada segundo o método proposto por Levine *et al.* (1994), que se baseia na reação do DNPH (2,4-dinitrofenil-hidrazina) com proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas, que podem ser detectadas a 370 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}.\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

### 3.5.11 Metalotioneínas (MT)

Para a avaliação do conteúdo de metalotioneínas foi utilizado o método proposto por Viarengo *et al.* (1997), com algumas modificações. Este método determina o conteúdo de sulfidrilas (presentes nas MTs) a partir da comparação com uma curva de GSH, através da determinação da absorbância a 412 nm

considerando 30% como a porcentagem de cisteínas que correspondem à MTs. Para tanto foi realizada uma série de precipitações, centrifugações e ressuspensões, culminado na ressuspensão do *pellet* contendo MT, ao qual foi adicionado a solução de Ellman, contendo: DTNB (0,4 mM) em tampão fosfato de sódio/NaCl (0,2 M/ 2 M, pH 8). A unidade de concentração de MT usada foi  $\mu\text{g. mg de proteína}^{-1}$ .

### 3.5.12 Concentração proteica

A concentração de proteínas totais foi mensurada, em espectrofotômetro a 595 nm, pelo método de Bradford (1976), usando BSA (soro de albumina bovina) como padrão.

### 3.6 Biomarcador Morfológico

Uma porção de cada fígado foi imersa em fixador ALFAC (álcool 80%, formol e ácido acético glacial) durante 16 horas, em seguida as amostras passaram por desidratação em série alcoólica crescente (70, 80, 90 e 100%), diafanização em xilol e inclusão em Paraplast Plus® (Sigma) (56°C). Os blocos foram cortados em micrótomo manual para a obtenção dos cortes histológicos, com 5  $\mu\text{m}$  de espessura, que foram distendidos em lâmina histológica e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscopia de luz. Para a análise histopatológica foi usado Índice de Lesão proposto por Bernet *et al.* (1999), com escores de: 0 – ausência; 2 – ocorrência ocasional; 4 – ocorrência moderada e 6 – alta ocorrência, e o fator de importância (FI) para cada alteração segundo a TABELA 1.

TABELA 1 – Fator de Importância (FI) para as diferentes alterações histopatológicas.

ALTERAÇÃO	FI
Necrose	3
Vacuolização	1
Congestão sinusóides	1
Citoplasma claro	1
Alteração morfologia celular	2
Tumor	4

FONTE: Bernet *et al.* (1999)

### 3.7 Biomarcadores Genéticos

#### 3.7.1 Ensaio cometa

O sangue para o ensaio cometa foi processado segundo o método de Singh *et al.* (1988), modificado por Ferraro *et al.* (2004). O mesmo método, adaptado por Ramsdorf *et al.* (2009) foi utilizado para o preparo das amostras de fígado e rim. Para tanto, 10 µL de sangue foram diluídos em 1 mL de soro bovino fetal, e uma pequena porção de fígado ou rim foi homogeneizada em 500 µL de soro bovino fetal. Para o sangue, 10 µL da solução com soro bovino fetal, e para os tecidos, 40 µL do homogenato, foram misturados a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e esta mistura foi colocada em uma lâmina coberta por agarose. As lâminas foram mantidas por 24 horas a 4° C em uma solução de lise (NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (1%), triton X100 (1%) e DMSO (10%)), protegidas da luz. Em seguida foi efetuada a desnaturação do DNA por imersão das lâminas em uma solução de NaOH/EDTA (10 N/ 200 mM, pH 13) por 25 minutos e as lâminas foram então submetidas a uma eletroforese (300 mA, 25 V) por 25 minutos. Após, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 M, pH 7,5) e fixadas em etanol por 5 minutos. Por fim elas foram coradas com brometo de etídio (0,02 g.mL<sup>-1</sup>) e os nucleóides foram analisados em microscópio de epifluorescência.

Em cada amostra, 100 nucleóides foram visualizados e a migração do DNA foi classificada em cinco classes (0: sem dano visível; 1: dano pequeno; 2: dano médio; 3: dano extensivo e 4: dano máximo) de acordo com Collins *et al.* (1997). O escore foi calculado através do somatório da multiplicação do número de nucleóides encontrados em uma classe de dano pelo número da classe. A análise foi realizada à cego.

#### 3.7.2 Micronúcleo píceo e alterações morfológicas nucleares

De cada amostra de sangue, coletadas por punção da veia caudal, uma gota foi colocada sobre uma lâmina de microscopia e foi realizado o esfregaço. Tais lâminas foram secas em temperatura ambiente por 24 horas e em seguida fixadas em etanol absoluto por 30 minutos. As lâminas foram coradas com Giemsa 10%. Em

cada lâmina foram analisadas, à cego, 2000 células e a técnica utilizada para a análise foi a descrita por Carrasco, Tilbury e Myers (1990).

### 3.8 Biomarcadores Hematológicos

A contagem de eritrócitos ou RBC (Red Blood Cells) foi realizada com a técnica do formol - citrato, modificada por Oliveira-Júnior, Tavares-Dias e Marcon (2009). Para a contagem, 10  $\mu\text{L}$  de sangue foram diluídos em 2 mL de formol – citrato, e colocados em uma câmara de Neubauer, onde foi contado o número de eritrócitos presentes em 5 campos de  $0,04 \text{ mm}^2$ . A quantidade total foi expressa em eritrócitos  $\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de sangue.

Para determinar a taxa de hemoglobina foi utilizado o método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944; DRABKIN, 1946), diluindo 20  $\mu\text{L}$  de sangue em 5 mL de reagente de Drabkin. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em  $\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ .

O hematócrito, que determina a porcentagem do volume ocupado pelos eritrócitos no sangue total, foi determinado usando microhematócritos heparinizados que por capilaridade foram preenchidos com sangue, em seguida centrifugados para a medida e cálculo da porcentagem ocupada pelos eritrócitos (HINE, 1992; NELSON; MORRIS, 1989).

Para a contagem de leucócitos e trombócitos, e para a diferenciação de leucócitos foi realizado uma extensão sanguínea. As lâminas foram coradas com o método de coloração rápida com May-Grunwald-Giemsa-Wright (MGGW) (TAVARES-DIAS; MORAES, 2003). Os leucócitos e trombócitos foram contados na extensão em relação a 2000 eritrócitos, evitando áreas de aglomeração de células, e para obter a quantidade de por  $\mu\text{L}$  de sangue foi usado o resultado da contagem de eritrócitos, e aplicada a fórmula abaixo (TAVARES-DIAS; MORAES, 2006). A contagem diferencial de leucócitos foi adaptada de Tavares-Dias *et al.* (1999a, 2002)

$$\text{Leucócitos ou trombócitos}\cdot\mu\text{L}^{-1} = \frac{\text{Leucócitos ou trombócitos na extensão x eritrócitos}\cdot\mu\text{L}^{-1}}{2000 \text{ eritrócitos na extensão}} \quad (1)$$

### 3.9 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados normais foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman-Keulls. Para os dados não normais foi utilizado o teste de Kruskal-wallis, seguido do teste de Dunn. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, para os dados normais, e em mediana para os dados não normais. O limite de significância foi considerado quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Bioconcentração

No músculo o Cd não foi detectado, no entanto, nas maiores concentrações (10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) o Cd se bioconcentrou no fígado (TABELA 2).

TABELA 2 - Concentração de cádmio no músculo e no fígado de *Rhamdia quelen* expostos ao Cd.

	Concentração de cádmio $\mu\text{g.L}^{-1}$				
	Controle	0,1	1	10	100
Músculo	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
Fígado	< 0,10	< 0,10	< 0,10	1,69	12,68

Unidade:  $\mu\text{g Cd.g}$  de tecido úmido<sup>-1</sup>

### 4.2 Índice Hepatosomático

Após a exposição ao Cd, o IHS aumentou nos animais expostos a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cd, nos demais grupos não houveram alterações quando comparados ao grupo controle (FIGURA 3).

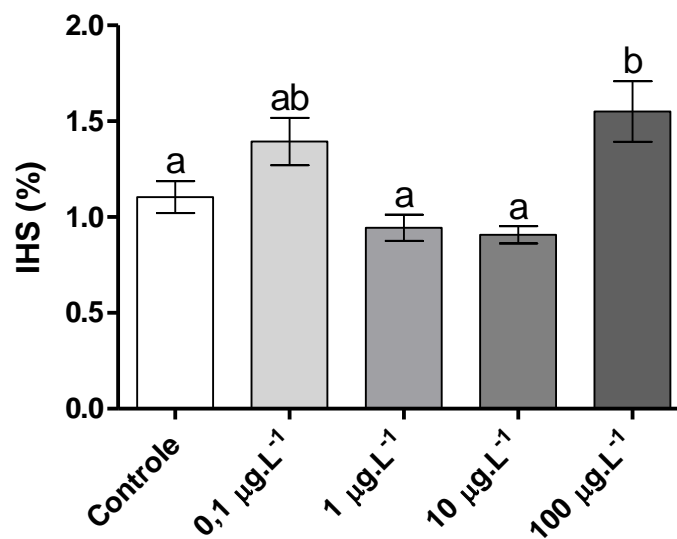


FIGURA 3 - Índice hepatossomático em *R. quelen* expostos ao Cd. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão.



### 4.3 Biomarcadores Bioquímicos

Em todos os grupos expostos ao Cd a atividade da AChE não foi alterada, tanto no cérebro, como no músculo, quando comparados ao controle (FIGURA 4). Porém foi observada diminuição da atividade da GST hepática nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , no entanto, na maior concentração (100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) esta enzima teve sua atividade aumentada (FIGURA 5D), quando comparados ao grupo controle. Também no fígado a LPO aumentou nas concentrações de 0,1, 1 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  comparado ao grupo controle (FIGURA 6D), e nos demais biomarcadores bioquímicos neste tecido não foram observadas alterações em relação ao controle. No entanto, a atividade da GPx hepática teve sua atividade aumentada nos grupos expostos às maiores concentrações (10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), quando comparados ao grupo exposto à menor concentração de Cd.

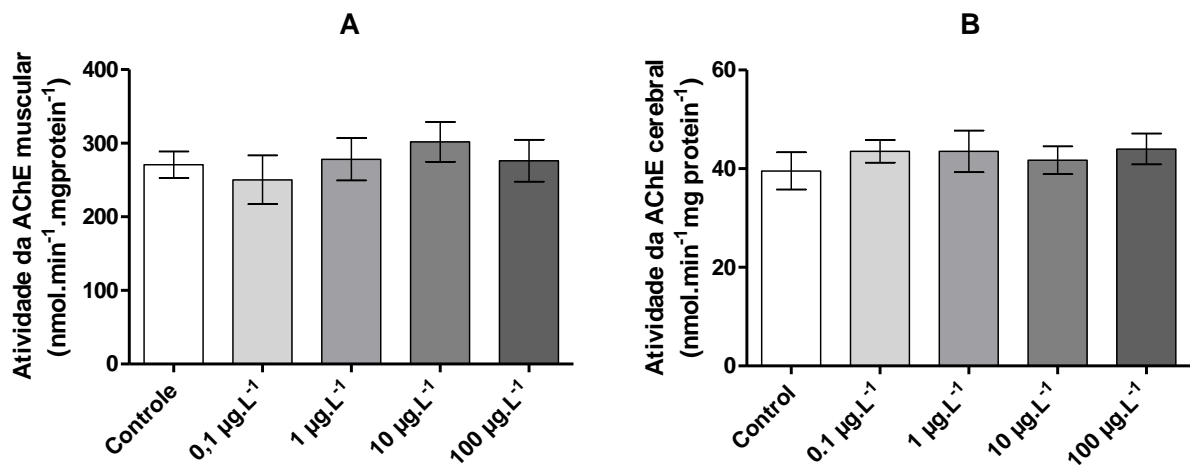


FIGURA 4: Atividade da acetilcolinesterase em *R. quelen* expostos ao Cd. A – muscular; B – cerebral. Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão.

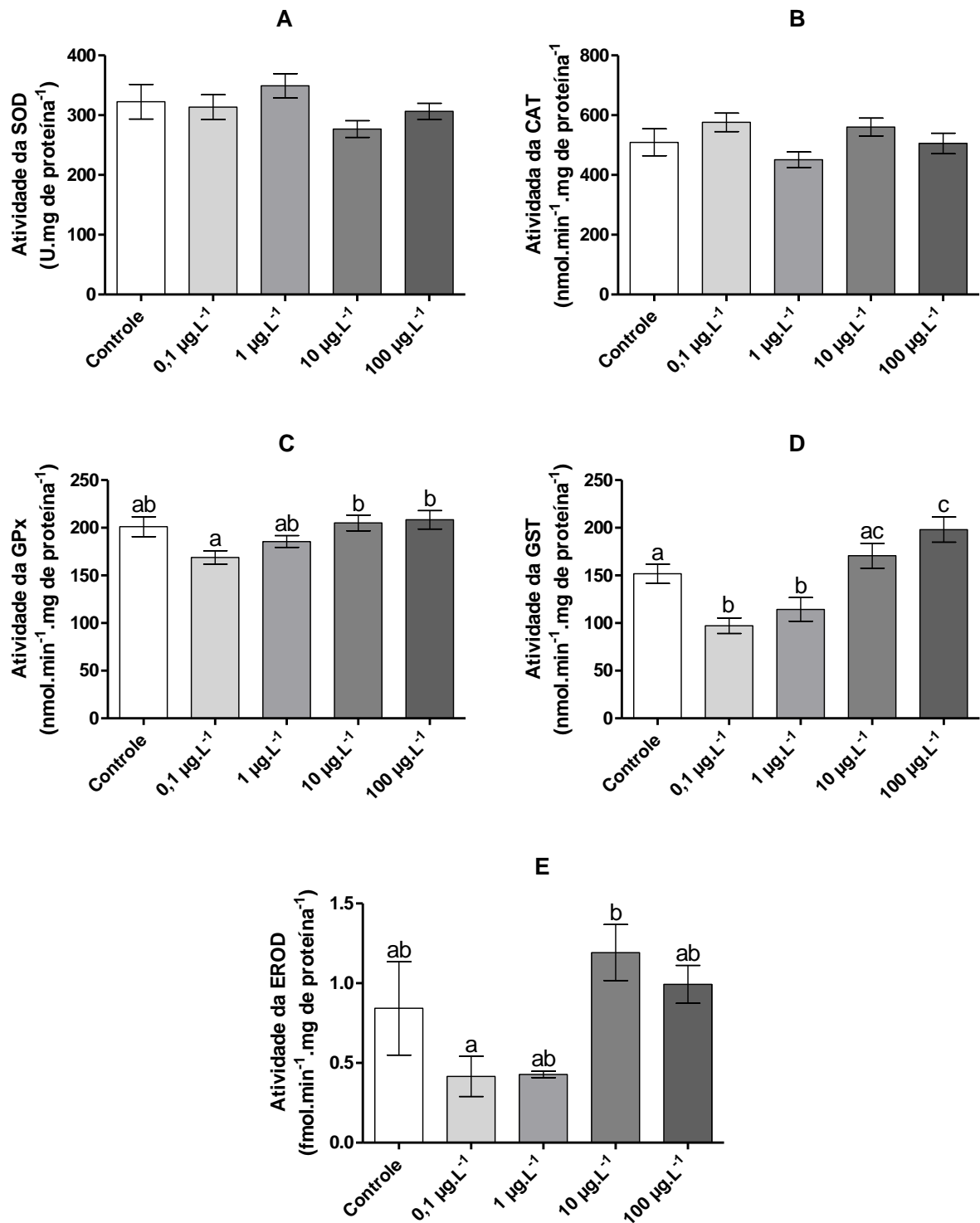


FIGURA 5: Biomarcadores bioquímicos em fígado de *R. quelen* expostos ao Cd. A – atividade da superóxido dismutase; B – atividade da catalase; C – atividade da glutiona peroxidase; D – atividade de glutiona S-transferase; E – atividade da etoxiresorufina o-deetilase. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão.

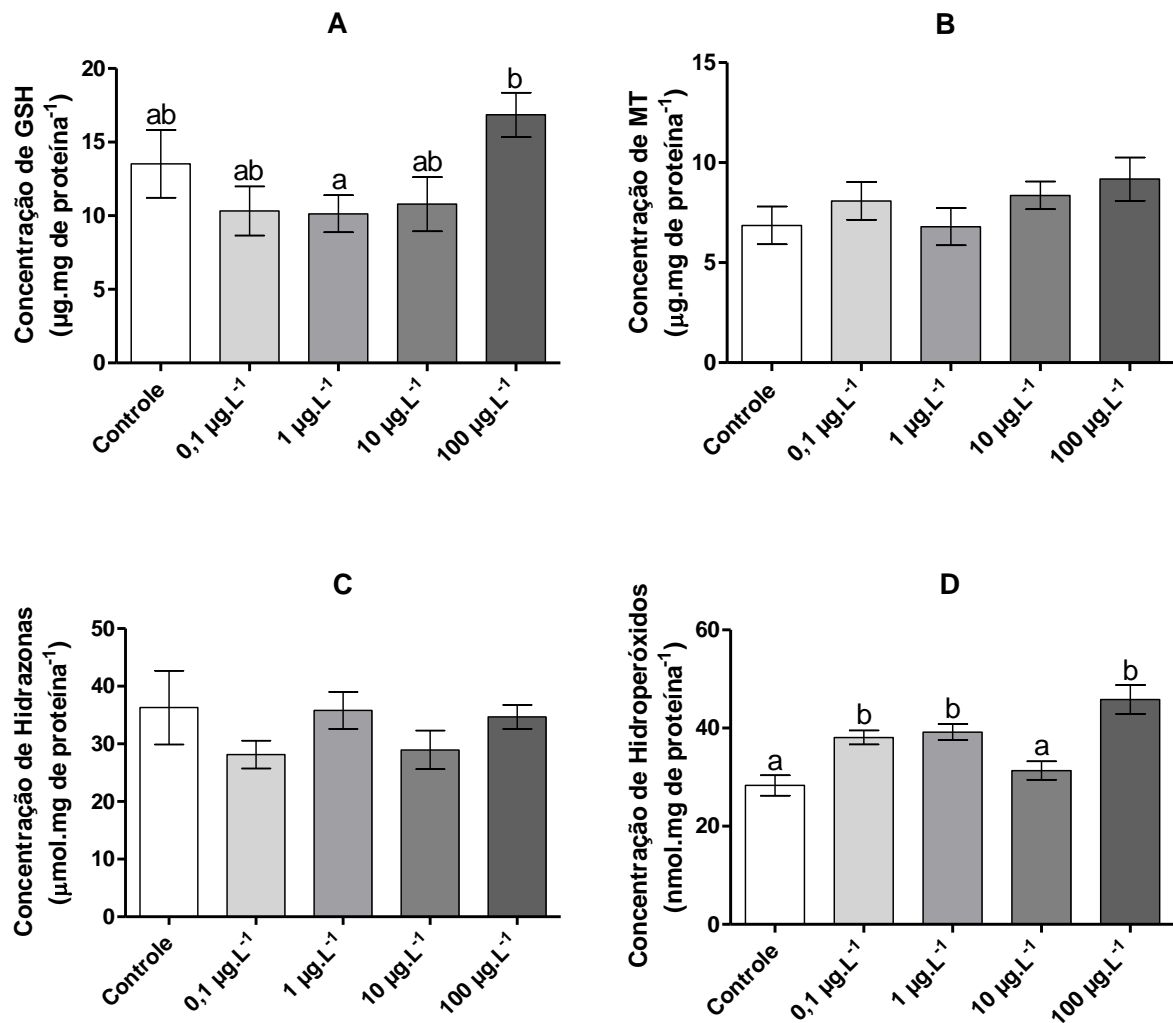


FIGURA 6: Biomarcadores bioquímicos em fígado de *R. quelen* expostos ao Cd. A – glutationa reduzida; B – metalotioneínas; C – carbonilação de proteínas; D – peroxidação lipídica. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão.

No rim posterior foi observada uma diminuição, em relação ao grupo controle, na atividade da CAT (FIGURA 7B) e nos níveis de LPO (FIGURA 8D) em todas as concentrações testadas. A atividade da GPx foi aumentada, quando comparada à atividade do grupo controle, nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cd (FIGURA 7C). A atividade da EROD aumentou no grupo exposto a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  quando comparada a atividade dos grupos controle e exposto a 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (FIGURA 7E). A concentração de MT (FIGURA 8B) aumentou e a concentração de GSH diminuiu (FIGURA 8A) na maior concentração testada, quando comparados ao controle. Os demais biomarcadores bioquímicos não foram alterados, em relação ao grupo controle, no rim posterior após a exposição ao Cd.

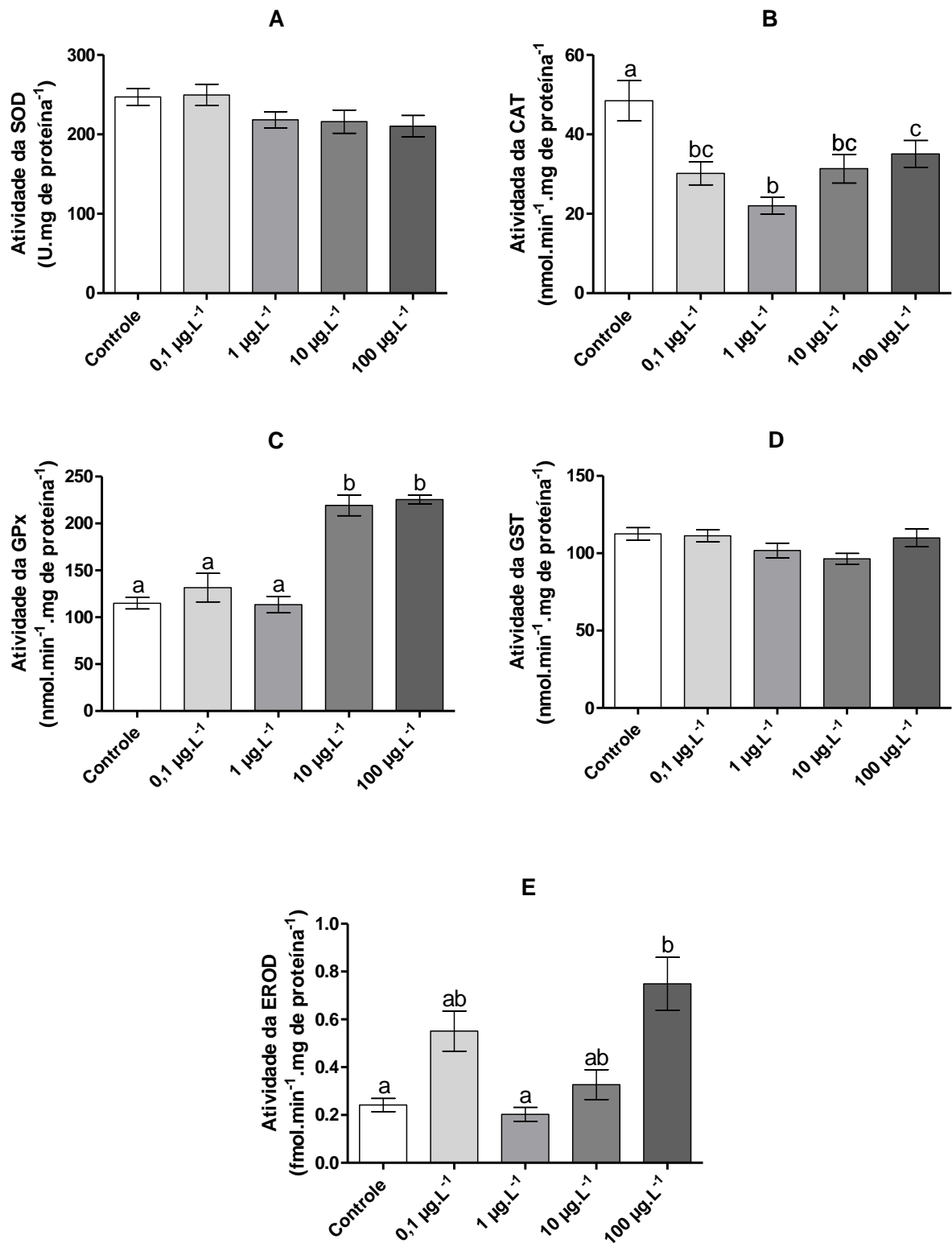


FIGURA 7: Biomarcadores bioquímicos em rim posterior de *R. quelen* expostos ao Cd. A – atividade da superóxido dismutase; B – atividade da catalase; C – atividade da glutatona peroxidase; D – atividade de glutatona S-transferase; E – atividade da etoxiresorufina o-deetilase. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão.

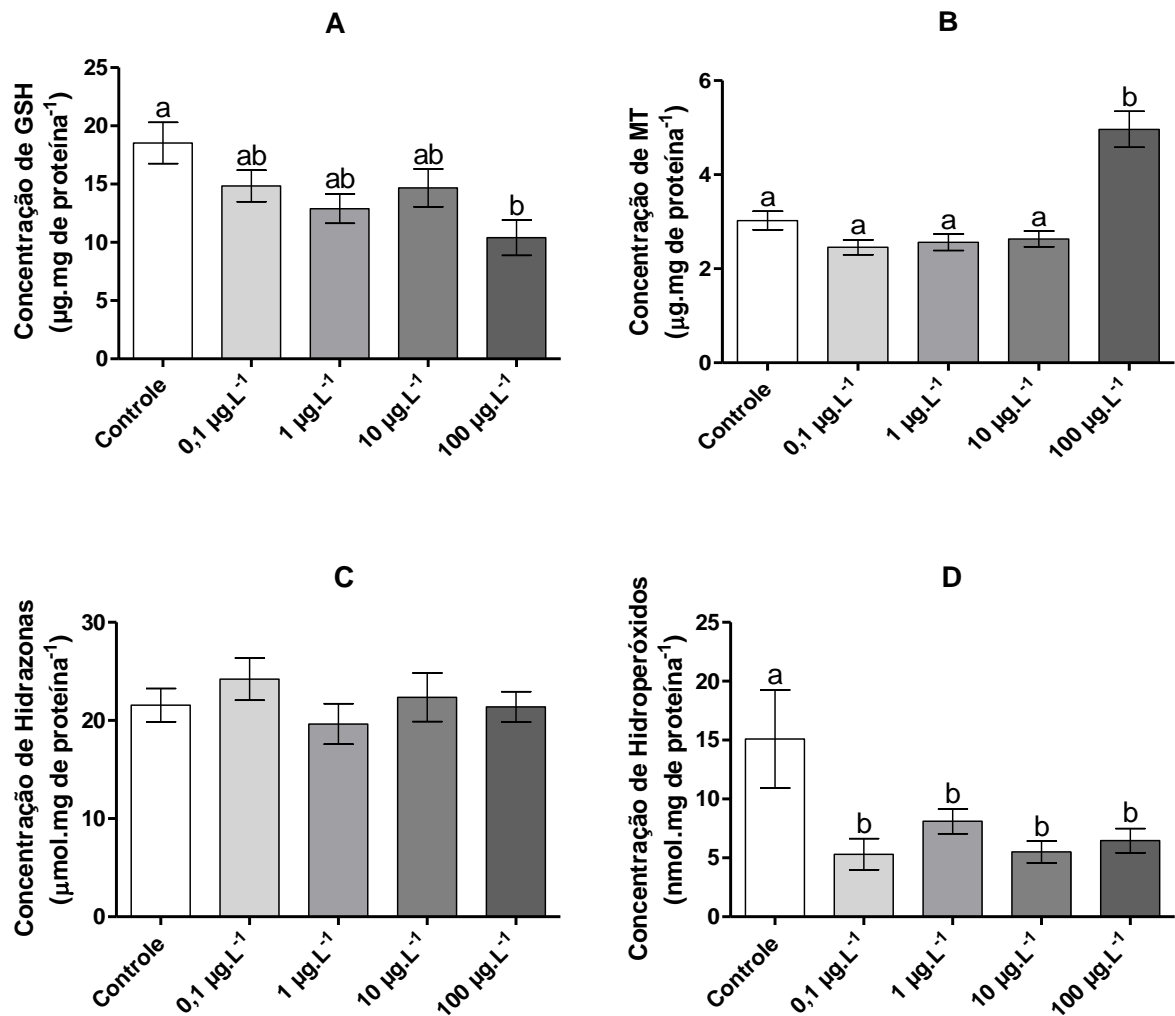


FIGURA 8: Biomarcadores bioquímicos em rim posterior de *R. quelen* expostos ao Cd. A – glutationa reduzida; B – metalotioneínas; C – carbonilação de proteínas; D – peroxidação lipídica. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão.

#### 4.4 Biomarcador Morfológico

Os fígados dos animais expostos ao Cd apresentaram áreas de dilatação e congestão de sinusóides (FIGURA 9B). A proliferação de tecido fibroso ao redor dos vasos foi frequentemente acompanhada de desorganização dos hepatócitos (FIGURA 9C). Áreas de necrose apresentaram alta prevalência (FIGURA 9D). A ocorrência de infiltração, vacuolização e corpos eosinofílicos foram observadas em alguns dos peixes expostos ao Cd (FIGURA 9D). Os animais expostos a 0,1, 1 e 100 µg.L<sup>-1</sup> de Cd apresentaram aumento significativo das lesões hepáticas quando comparados ao controle (FIGURA 10).

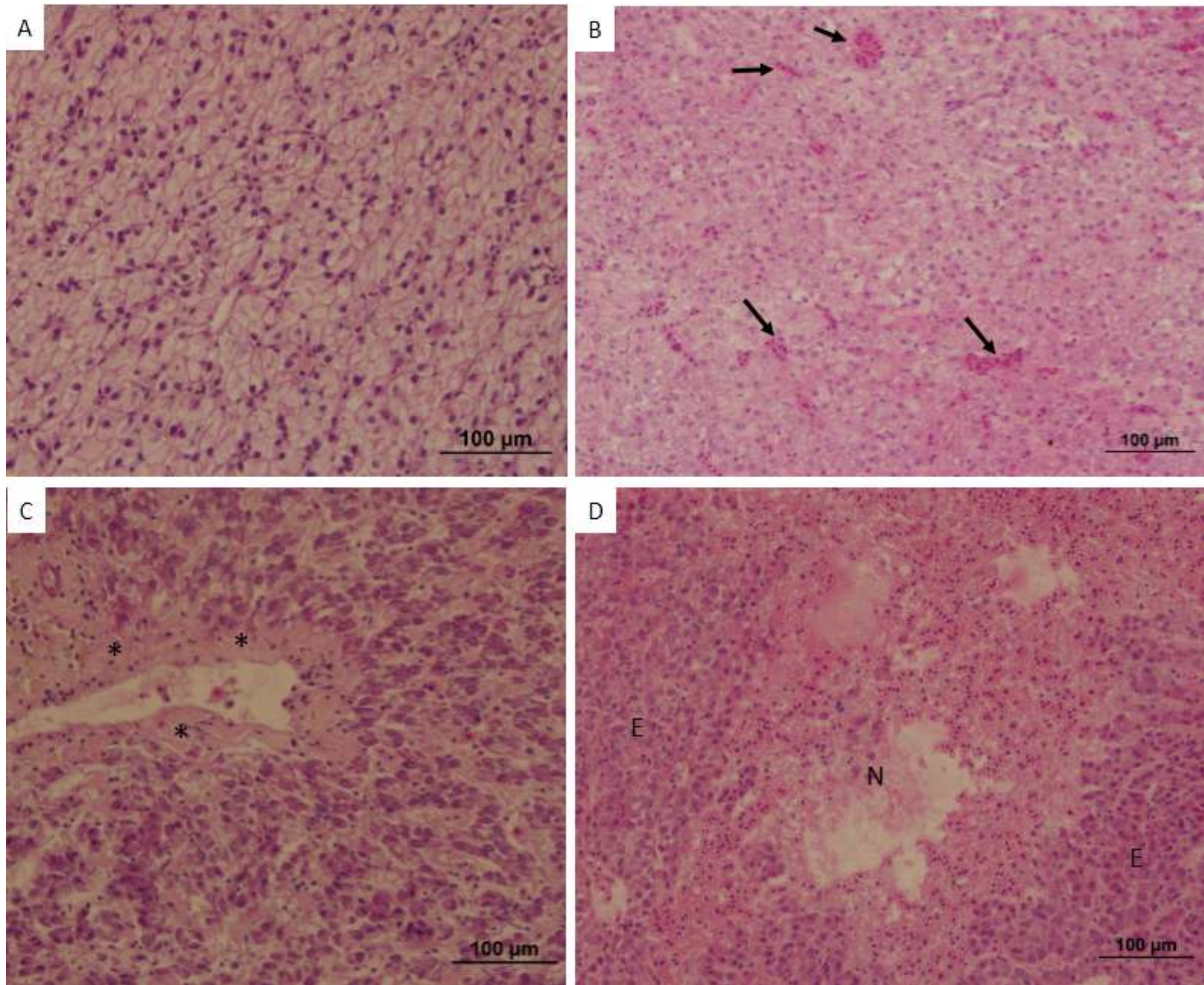


FIGURA 9: Lesões histopatológicas observadas em fígado de *R. quelen* expostos ao Cd. A - fígado do controle; B - áreas de dilatação e congestão de sinusóides (setas); C - proliferação de tecido fibroso ao redor dos vasos (\*), nota-se a desorganização dos hepatócitos e D - necrose (N) e ocorrência de hepatócitos eosinofílicos (E)

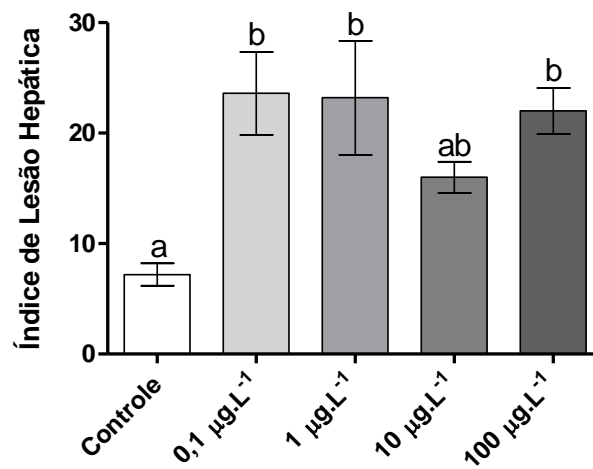


FIGURA 10: Índice de lesão hepática em *R. quelen* expostos ao Cd. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão.

#### 4.5 Biomarcadores Genéticos

O dano no DNA, mensurado pelo ensaio cometa, aumentou nos eritrócitos dos animais expostos a 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd, quando comparados ao grupo controle (FIGURA 11A). Nas células de fígado e rim não foram observadas alterações entre os grupos expostos e o controle (FIGURA 11B e C). No grupo exposto a 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd não foi determinado o dano no DNA de eritrócitos através do ensaio cometa (FIGURA 11A).

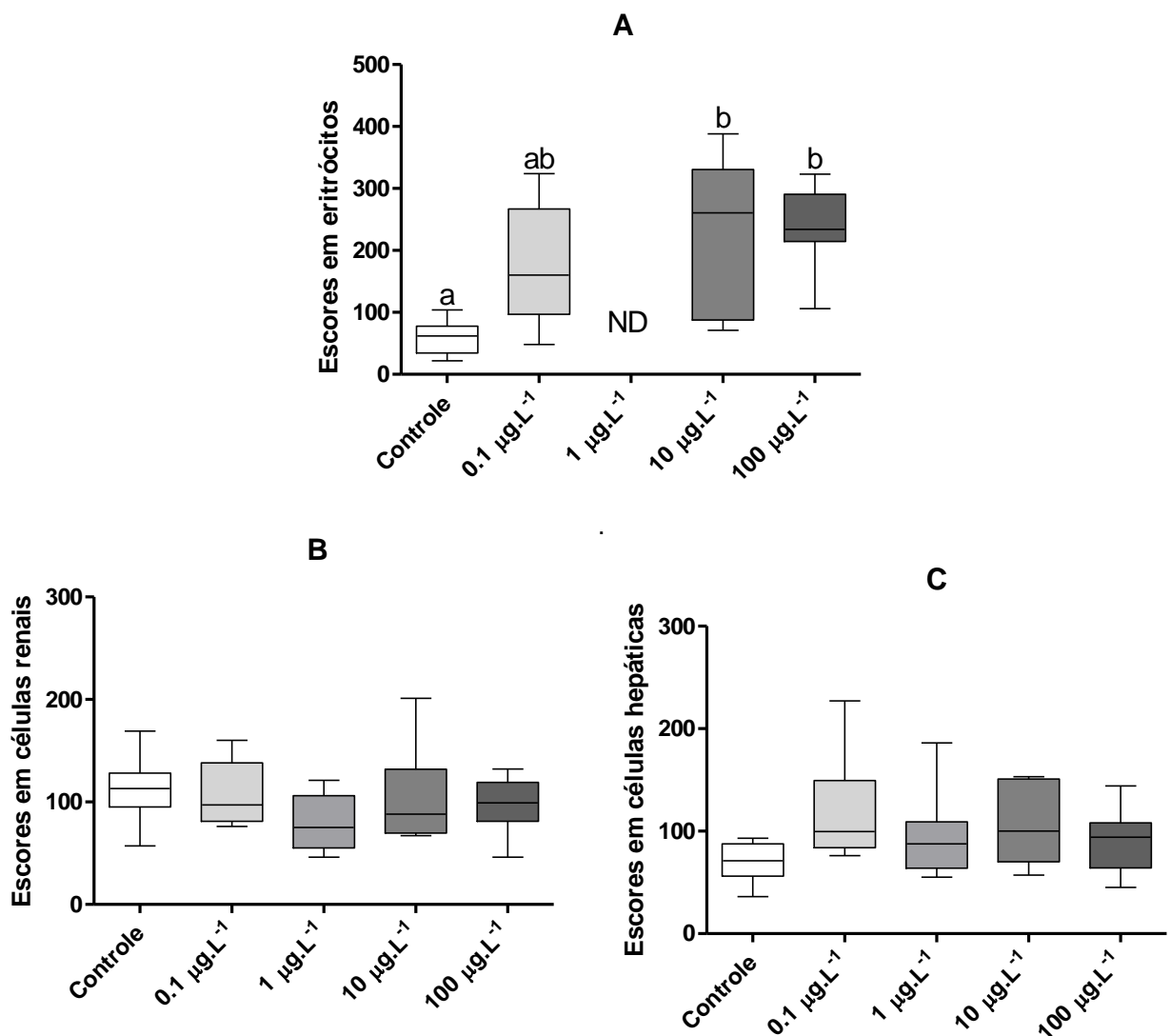
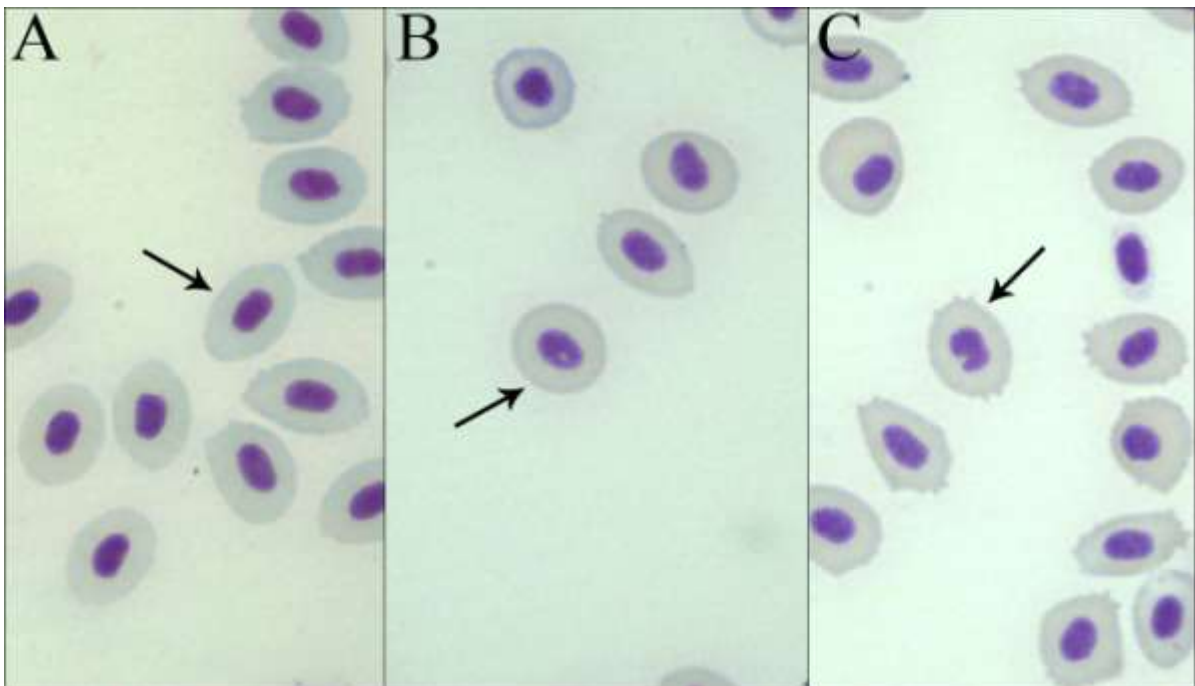


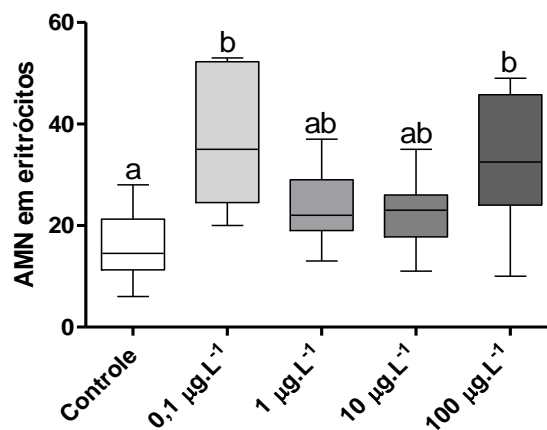
FIGURA 11: Escores do ensaio cometa em *R. quelen* expostos ao Cd. A – eritrócitos; B – células renais; C – células hepáticas. Dados estão expressos em mediana. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). ND= não determinado



Nenhum micronúcleo foi observado em eritrócitos, no entanto foram observadas alterações morfológicas nucleares do tipo notched (entalhado) (FIGURA 12C) e vacuolated (vacuolizado) (FIGURA 12B), sendo a última a mais frequente. Quando comparados ao controle, os grupos expostos a 0,1 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd tiveram um aumento no número de alterações morfológicas nucleares (AMN) (FIGURA 13).



**Figura 12:** alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Rhamdia quelen*. Seta indica em A – núcleo normal; B – núcleo vacuolated e C – núcleo notched.



**Figura 13** - Número de alterações morfológicas nucleares (AMN) em 2000 eritrócitos de *Rhamdia quelen* expostos ao Cd. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Dados estão expressos em mediana.



#### 4.6 Biomarcadores Hematológicos

O número de eritrócitos diminuiu no grupo exposto a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd, quando comparado ao grupo controle e aos grupos expostos as demais concentrações. Neste mesmo grupo a concentração de hemoglobina diminuiu em relação ao grupo controle e ao grupo exposto a menor concentração de Cd ( $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Todas as concentrações de Cd causaram a diminuição no número de trombócitos em relação ao grupo controle. A contagem de leucócitos e monócitos foi menor nos grupos expostos as maiores concentrações de Cd ( $10$  e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) quando comparada a contagem dos grupos controle e expostos a  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ . O número de neutrófilos foi menor nos grupos expostos as maiores concentrações quando comparado aos grupos controle e expostos às demais concentrações. O hematócrito não foi alterado em nenhum dos grupos expostos ao Cd (TABELA 3).

TABELA 3 - Biomarcadores hematológicos em *R. quelen* expostos ao Cd.

	Concentração de Cd ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )				
	Controle	0,1	1	10	100
Eritrócitos ( $10^6.\mu\text{L}^{-1}$ )	$1,78 \pm 0,091^a$	$1,71 \pm 0,08^a$	$1,71 \pm 0,08^a$	$1,70 \pm 0,11^a$	$1,39 \pm 0,04^b$
Hemoglobina ( $\text{g.dL}^{-1}$ )	$6,37 \pm 0,36^a$	$6,31 \pm 0,43^a$	$5,86 \pm 0,32^{ab}$	$5,46 \pm 0,17^{ab}$	$5,01 \pm 0,29^b$
Hematócrito (%)	$31,33 \pm 1,86$	$27,86 \pm 2,12$	$27,30 \pm 2,37$	$27,40 \pm 2,63$	$27,60 \pm 1,23$
Trombócitos ( $10^3.\mu\text{L}^{-1}$ )	$65,93 \pm 2,41^a$	$28,87 \pm 2,22^b$	$26,61 \pm 2,02^b$	$30,15 \pm 1,96^b$	$17,49 \pm 1,97^c$
Leucócitos ( $10^3.\mu\text{L}^{-1}$ )	$123,90 \pm 2,41^a$	$111,50 \pm 5,39^{ab}$	$131,00 \pm 7,05^a$	$99,51 \pm 3,92^b$	$62,16 \pm 6,10^c$
Neutrófilos ( $10^3.\mu\text{L}^{-1}$ )	$9,29 \pm 1,00^a$	$11,55 \pm 0,59^a$	$9,38 \pm 1,29^a$	$5,39 \pm 0,46^b$	$4,62 \pm 0,60^b$
Mononucleares ( $10^3.\mu\text{L}^{-1}$ )	$114,60 \pm 1,92^a$	$99,95 \pm 5,10^{ab}$	$121,70 \pm 6,57^a$	$94,12 \pm 3,71^b$	$57,54 \pm 5,76^c$

Valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

. Em nosso estudo podemos supor que os 15 dias de exposição foram suficientes para a mobilização do Cd para o rim e o sistema antioxidante foi capaz de adaptar suas respostas a este metal. Pois, embora tenha ocorrido a bioconcentração do Cd no fígado dos peixes expostos a 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cd, não há uma relação clara com hepatotoxicidade observada através de alterações em alguns biomarcadores neste tecido.

Os resultados demonstram que a exposição ao Cd alterou a atividade da GST hepática, causando diminuição nas menores concentrações e aumento na maior concentração. Este resultado pode ser explicado pelo efeito do Cd nas diferentes isoformas de GST. Diferenças individuais foram demonstradas por Espinoza *et al.* (2012) que estudaram a expressão da isoformas de GST hepáticas no salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*) expostos a 3.1  $\text{mg.L}^{-1}$  Cd e observaram que após 24 horas de exposição a expressão de três isoformas foi diminuída. No entanto, com 48 horas de exposição a expressão de uma única isoforma foi aumentada. Vários estudos têm observado alterações na GST hepática em algumas espécies de peixes expostas ao Cd, como diminuição em juvenis de *Paralichthys olivaceus* expostos a 6, 24 e 48  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cd por 78 dias (CAO *at al.*, 2010) ou aumento em *Oreochromis mossambicus* expostos a 5  $\text{mg.L}^{-1}$  Cd por 1-30 dias (BASHA; RANI, 2003) e *Rhamdia quelen* expostos a 236 and 414  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cd por 7 dias (PRETTO *at al.*, 2011). Estes estudos, em conjunto com o nosso, demonstram que de maneira geral menores concentrações de Cd provocam a diminuição da atividade da GST, enquanto concentrações mais elevadas provocam o aumento de sua atividade, independente do tempo de exposição ao qual os animais foram expostos.

O aumento dos níveis de LPO no fígado a 0,1, 1 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cd indica que alterações na GST podem ser a causa do dano nas membranas lipídicas. Pretto *et al.* (2011) também observaram um aumento na LPO hepática em *R. quelen* após a exposição ao Cd. Sabe-se também que metais pesados podem aumentar a peroxidação lipídica, formando produtos que são substratos para as GSTs (KIM *at al.*, 2010) e isso pode explicar o aumento tanto da GST quanto da LPO hepáticas, no grupo exposto a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Porém, para os grupos expostos às menores

concentrações (0,1 e  $1\mu\text{g.L}^{-1}$ ) a mesma relação não pode ser aplicada e essa diferença pode ter ocorrido por se tratarem de concentrações baixas do metal, e neste caso, o dano na fase II de biotransformação, causado pela diminuição da atividade da GST, pode acarretar no aumento de compostos tóxicos no tecido hepático, e estes compostos por sua vez podem aumentar a produção de ERO e assim ocasionar o aumento da LPO. Ainda no grupo exposto a  $100\mu\text{g.L}^{-1}$ , também foi observado um aumento no IHS, o que pode estar relacionado ao aumento da atividade de enzimas do sistema de biotransformação (FIGUEIREDO-FERNANDES *at al.*, 2007), como o aumento da GST e também o acúmulo de lipídios neste tecido.

Desta forma, mesmo sabendo que o fígado é o órgão com a maior atividade de enzimas antioxidantes e mais resistente ao estresse oxidativo do que outros órgãos (ATLI; CANLI, 2010), neste estudo, as defesas antioxidantes não foram capazes de prevenir a ocorrência do dano lipídico, indicando que o Cd causou hepatotoxicidade. Ainda, a hepatotoxicidade pode ser comprovada pelo aumento do índice de lesão, nos grupos expostos a 0,1, 1 e  $100\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd, indicando a presença de danos significativos neste tecido, especialmente pela prevalência de necrose. Sendo estes mesmos danos também observados no tecido hepático de outras espécies de peixes expostos ao Cd. Em *Sparus aurata* (GUARDIOLA *at al.*, 2013) foi observada desorganização celular, vacuolização, infiltração, congestão dos sinusóides e necrose. Em *Puntius gonionotus* (WANGSONGSAK *at al.*, 2007) onde foi observada a dilatação dos sinusóides, além de vacuolização e necrose.

No rim posterior, o Cd causou aumento da atividade da EROD nos animais expostos a  $100\mu\text{g.L}^{-1}$ , no entanto este resultado é oposto ao observado em diversos estudos, que demonstram que o Cd e outros metais estão associados à diminuição da atividade da EROD. No entanto esta relação é comumente encontrada quando se trata da atividade da EROD proveniente do tecido hepático, como em microsomas hepáticos de tainha expostos ao Cd, níquel, zinco e mercúrio (Hg) (BOZCAARMUTLU e ARINÇ, 2004), *Pomatoschistus microps* expostos por 96 horas a diversas concentrações de cobre e Hg (VIEIRA *at al.*, 2009) e como observado por Al-Arabi e Goksøyr (2002) em *Apocryptes bato* e *Rita rita* após 10 dias de uma única dose intraperitoneal de Cd. Desta forma, por se tratar de outro órgão, a relação pode não ser a mesma no rim posterior, e ainda pode estar relacionada a , diferenças entre as espécies, o tempo e a via de exposição utilizados.

A atividade da CAT diminuiu no rim dos animais expostos a todas as concentrações de Cd. Este resultado também foi observado em outras espécies quando expostas, como *Clarias batrachus* (KUMAR *et al.*, 2009) expostas *in vivo* por 45 dias à 5 e 10 mg.L<sup>-1</sup> de Cd ou no tecido renal de *Oreochromis niloticus* (ATLI *et al.*, 2006) e *Dicentrarchus labrax* (ROMÉO *et al.*, 2000) expostos *in vitro*. No entanto, PRETTO *et al.* (2011) não observaram alterações na CAT renal de *R. quelen* expostos as concentrações de 0,44, 236 e 414 µg.L<sup>-1</sup> de Cd, porém, esta ausência de alteração na atividade foi observada comparando estas diferentes concentrações entre si. Um possível mecanismo de ação do Cd para a diminuição da atividade da CAT pode ser a alteração mediada diretamente pelo metal, da estrutura da enzima, além da diminuição da síntese desta enzima (ROMÉO *et al.*, 2000).

No rim posterior dos jundiás expostos a 10 and 100 µg.L<sup>-1</sup> de Cd, também houve aumento da atividade da GPx. Desde que a CAT e GPx atuam na degradação de hidroperóxidos, pode ter ocorrido uma competição pelo substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), explicando a diminuição da atividade da CAT e o aumento da GPx (UNER; ORUÇ; SEVGILER, 2005). Em *Paralichthys olivaceus* (CAO *et al.*, 2012) e *Oreochromis mossambicus* (BASHA e RANI, 2003) a GPx renal também foi induzida pelo Cd. No rim dos animais expostos a 100 µg.L<sup>-1</sup> Cd, o aumento na GPx pode estar relacionado com o decréscimo nos níveis de GSH. Essa molécula é necessária para a atividade da GPx e da GST, mas também é considerada a primeira linha de defesa do sistema antioxidante contra xenobióticos, incluindo metais como Cd e cobre (Cu) (SANTOVITO *et al.*, 2012). Elia *et al.* (2003) sugerem uma direta ligação dos metais com o grupo SH (sulfidríla) como a causa do decréscimo nos níveis de GSH, e de acordo com Jemai *et al.* (2010) este provavelmente é o principal mecanismo de eliminação do Cd.

O grupo exposto a maior concentração de Cd também apresentou aumento na concentração de MT no rim posterior. Essas proteínas compreendem uma família de proteínas, com alto conteúdo de cisteínas, que atuam na homeostase de metais essenciais, como zinco (Zn) e Cu, e também na desintoxicação de metais não essenciais (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). De acordo com Isani *et al.* (2009) o acúmulo de MT no rim ocorre devido a uma redistribuição de Cd pelo organismo, pois após a absorção pelas brânquias, o metal é transportado para o fígado, onde estimula a síntese de MT, as quais são então transportadas para o rim.

Desta forma, as MT atuam como um transportador de Cd para o rim (ASAGBA; ERIYAMREMU; IGBERAESE, 2008; CHOWDHURY; WOOD, 2007). Outra função que tem sido atribuída a estas proteínas é a eliminação de radicais livres por seus resíduos de cisteínas (ATIF *et al.*, 2006; SANTOVITO *et al.*, 2012). Portanto, o aumento observado na concentração de MT indica que o grupo exposto a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  Cd pode estar mais protegido contra do estresse oxidativo.

O aumento de MT atuando como mecanismo de defesa antioxidante pode ser evidenciado pela diminuição da LPO no grupo exposto a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  Cd. No entanto, nos grupos expostos às demais concentrações de Cd também houve diminuição na LPO, sugerindo que no rim posterior pode estar ocorrendo o aumento de algum outro composto antioxidante, que não os testados neste estudo. Ainda, observando estudos com outras espécies de peixes expostas ao Cd, como o de Asagba *et al.* (2008) com *Clarias gariepinus* expostos por 21 dias a 200 e  $400 \mu\text{g.L}^{-1}$  Cd e o de Kumar *et al.* (2009) com *Clarias batrachus* expostos a  $5 \text{mg.L}^{-1}$  Cd por 45 dias e  $10 \text{mg.L}^{-1}$  Cd por 15 - 45 dias. Nestes estudos, nota-se que o aumento da LPO renal está relacionada a altas concentrações de Cd, maiores que as testadas em nosso estudo, além de, em geral, ocorrer após um período mais longo de exposição.

Nossos resultados demonstram a genotoxicidade provocada pelo Cd, através do aumento no dano e DNA observado no ensaio cometa de eritrócitos dos animais expostos a 10 e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  Cd, e também pelo aumento de AMN nos grupos expostos a 0,1 e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  Cd, demonstrando que estas células, em *R. quelen*, são mais sensíveis ao efeito deste metal. No entanto, em outra espécie, *Sparus aurata*, a mesma concentração de  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  Cd, por 11 dias, não foi capaz de aumentar o dano de DNA em células sanguíneas (ISANI *et al.*, 2009). Já as células renais e hepáticas se mostraram mais resistentes à ocorrência de dano ao DNA, visto que não houve aumento do escore no ensaio cometa em nenhum dos grupos expostos ao Cd. Esta maior resistência pode ser relacionada a espécie estudada, pois no estudo de Ahmed *et al.* (2010), a exposição de *Anabas testudineus* a 0,1, 1 e  $2 \text{mg.L}^{-1}$  Cd por 96 horas causou o aumento no dano de DNA de maneira concentração-dependente nas células renais e hepáticas. Assim, a variação na atividade de reparo do dano no DNA e nos sistemas metabólico e antioxidante podem explicar as diferenças observadas no dano de DNA entre células renais, hepáticas e eritrócitos (Ahmed *et al.*, 2010), e também entre as diferentes espécies.

Cavas, Garanko e Arkhipchuk (2005) observaram o aumento de micronúcleos e/ou binúcleos em eritrócitos de *Cyprinus carpio*, *Carassius gibelio* e *Coridoras paleatus* expostos por 21 dias à  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  Cd, também demonstrando o efeito genotóxico do Cd. Em nosso estudo não foram encontrados micronúcleos nos eritrócitos de *R. quelen*, no entanto o aumento de AMN, nos animais expostos à menor e à maior concentração de Cd, corroboram com o efeito genotóxico deste metal, visto que mesmo sem estar esclarecido o mecanismo responsável pela promoção de AMN em peixes, estas anormalidades podem ser indicadoras de genotoxicidade (RAMSDORF *at al.*, 2009; VICARI, 2009).

No sangue também foram observadas algumas alterações como a diminuição no número de eritrócitos e na hemoglobina no grupo exposto a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd, indicando um possível quadro anêmico (BRAGA *at al.*, 2006) que pode ter ocorrido por uma diminuição na viabilidade celular devido a ação do Cd no tecido eritropoiético ou por diminuição da síntese de células vermelhas (KÖPRÜCÜ *at al.*, 2006; PAMPLONA *at al.*, 2011).

Todas as concentrações de Cd causaram diminuição no número de trombócitos, indicando deficiência no processo de coagulação destes indivíduos. Outras funções também são atribuídas a estas células, como a diminuição da predisposição a infecções, pois elas também são consideradas células de defesa orgânica, como os leucócitos (PAMPLONA *at al.*, 2011). Barcellos *et al.* (2004b) observaram que o estresse crônico, causou diminuição no número de mononucleares (linfócitos e monócitos), e aumento do número de neutrófilos em *R. quelen*. Os autores sugerem que a diminuição de monócitos, especialmente linfopenia, pode ocorrer pela mobilização das células para tecidos linfoides e pela indução da apoptose de células B, causada pela liberação de cortisol. Desta forma, em nosso estudo, a diminuição no número de mononucleares nos jundiás expostos a 10 e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd pode ter ocorrido por um aumento da liberação de cortisol causada pelo estresse químico da exposição ao metal. Este resultado também indica perda da capacidade fagocítica destes indivíduos, com efeitos deletérios no sistema imune e portanto maior suscetibilidade a infecções. A diminuição da contagem de leucócitos totais, ou leucopenia, também observada nos animais expostos às maiores concentrações de Cd, além de corroborar à deficiência do sistema imune causada pela perda da capacidade fagocítica, ainda indica outros

prejuízos ao sistema imune, como na apresentação de antígeno, produção de citocinas e liberação de agentes anti-microbianos e anti-tumorais (VAZZANA *et al.*, 2014).

Por fim, o Cd não apresentou neurotoxicidade nas concentrações testadas. No entanto, Pretto *et al.* (2010) observaram diminuição na atividade da AChE cerebral após 14 dias, em *R. quelen* expostos a 236 and 414  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cd, e na AChE muscular nos animais expostos a 414  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cd, sendo estas, concentrações maiores que as testadas em nosso estudo. Indicando, como sugerido por Sturm, Silva de Assis e Hansen (1999), que apesar de metais não serem inibidores específicos da AChE, a exposição a concentrações maiores destes contaminantes podem também causar a diminuição da atividade desta enzima.



## 6 CONCLUSÕES

A exposição sub-crônica ao cádmio causou hepatotoxicidade nos jundiás expostos as concentrações de 0,1, 1 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . No entanto, apenas se bioconcentrou neste órgão nos grupos expostos a 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . A nefrotoxicidade também pode ser apontada, visto que todas as concentrações de Cd causaram alterações em biomarcadores bioquímicos no rim posterior. A genotoxicidade deste metal apenas foi evidenciada em eritrócitos, tanto na menor concentração (0,1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) quanto nas maiores (10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Ainda, o Cd, especialmente na concentração de 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , causou a diminuição de vários parâmetros hematológicos que indicam alterações imunológicas e no processo de coagulação, além de um possível quadro anêmico. No entanto, nas demais concentrações também foram observadas algumas destas alterações.

Diante do exposto, pode-se concluir que os limites de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd para águas de classe I e II e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd para águas de classe III, estabelecidos pelo CONAMA (Resolução 357/05), não são eficientes em oferecer um ambiente seguro para a saúde de peixes da espécie *Rhamdia quelen*.

Portanto, os resultados deste trabalho são um alerta para novos estudos de toxicidade em relação às concentrações limite (previstas pela legislação brasileira) para o cádmio e até mesmo de outros contaminantes presentes do meio aquático.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AHMED, M. K.; PARVIN, E.; ARIF, M.; AKTER, M. S.; KHAN, M. S.; ISLAM, M. M. Measurements of genotoxic potential of cadmium in different tissues of fresh water climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch), using the comet assay. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 80–4, jul. 2010.
- AL-ARABI, S. A M.; GOKSØYR, A. Cytochrome P4501A responses in two tropical fish species, riverine catfish (*Rita rita*) and marine mudfish (*Apocryptes bato*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP**, v. 131, n. 1, p. 61–71, jan. 2002.
- ALMEIDA, L. C. DE; MORAES, G. Effect of methyl parathion on the muscle and brain acetylcholinesterase activity of matrinxã (*Brycon cephalus*). **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 35, n. 6, p. 1412–1416, 2005.
- ASAGBA, S. O.; ERIYAMREMU, G. E.; IGBERAESE, M. E. Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 61–69, mar. 2008.
- ATIF, F.; KAUR, M.; YOUSUF, S.; RAISUDDIN, S. In vitro free radical scavenging activity of hepatic metallothionein induced in an Indian freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-biological Interactions**, v. 162, n. 2, p. 172–180, 25 ago. 2006.
- ATLI, G.; ALPTEKIN, O.; TÜKEL, S.; CANLI, M. Response of catalase activity to  $Ag^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP**, v. 143, n. 2, p. 218–224, jun. 2006.
- ATLI, G.; CANLI, M. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 8, p. 1884–1889, nov. 2010.
- BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; DE MEDEIROS, S. R. B. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 3, p. 320–325, mar. 2010.
- BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; DE SOUZA, C.; RODRIGUES, L. B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R. M.; CERICATO, L.; SOSO, A. B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; LACERDA, L. D. A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, v. 237, n. 1-4, p. 229–236, ago. 2004a.
- BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; FIOREZE, I.; CERICATO, L.; SOSO, A. B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; BALDISSERA, R. K.; BRUSCHI, A.; RITTER, F. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 383–394, abr. 2004b.

- BARCELLOS, L. J. G.; MARQUEZE, A.; TRAPP, M.; QUEVEDO, R. M.; FERREIRA, D. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 300, n. 1-4, p. 231–236, fev. 2010.
- BARCELLOS, L. J.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A. P.; WOEHLE, V. M.; QUEVEDO, R. M.; ITZÉS, I.; KRIEGER, M. H.; LULHIER, F. Steroid profiles in cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 121, n. 3, p. 325–332, mar. 2001.
- BARHOUMI, S.; MESSAOUDI, I.; DELI, T.; SAÏD, K.; KERKENI, A. Cadmium bioaccumulation in three benthic fish species, *Salaria basilisca*, *Zosterisessor ophiocephalus* and *Solea vulgaris* collected from the Gulf of Gabes in Tunisia. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 7, p. 980–984, jan. 2009.
- BASHA, P. S.; RANI, A. U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 2, p. 218–221, out. 2003.
- BATISTA, E. D. S.; COSTA, A. G. V.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Adição da vitamina E aos alimentos : implicações para os alimentos e para a saúde humana. **Revista de Nutrição, Campinas**, v. 20, n. 1, p. 525–535, 2007.
- BENADUCE, A. P. S.; KOCHHANN, D.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Toxicity of cadmium for silver catfish *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) embryos and larvae at different alkalinities. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 2, p. 274–282, fev. 2008.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25–34, 1999.
- BERVOETS, L.; VAN CAMPENHOUT, K.; REYNDERS, H.; KNAPEN, D.; COVACI, A.; BLUST, R. Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 3, p. 720–728, mar. 2009.
- BIBIANO MELO, J. F.; LUNDSTEDT, L. M.; METÓN, I.; BAANANTE, I. V.; MORAES, G. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, n. 2, p. 181–187, out. 2006.
- BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 383–392, 2001.
- BOZCAARMUTLU, A.; ARINÇ, E. Inhibitory effects of divalent metal ions on liver microsomal 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity of leaping mullet. **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2-5, p. 521–524, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRAGA, M.; GLUSCZAK, L.; MIRON, S.; DUARTE, M. F.; Ã, P. V. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and

hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 237–241, 2006.

BURKE, D.; MAYER, T. Etoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 2, p. 583–588, 1974.

CAMBIER, S.; GONZALEZ, P.; DURRIEU, G.; BOURDINEAUD, J.-P. Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 3, p. 312–319, mar. 2010.

CAO, L.; HUANG, W.; LIU, J.; YIN, X.; DOU, S. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 151, n. 3, p. 386–392, abr. 2010.

CAO, L.; HUANG, W.; SHAN, X.; YE, Z.; DOU, S. Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 16–25, jan. 2012.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123–2136, 1990.

CAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 43, n. 4, p. 569–574, abr. 2005.

CHO, Y. S.; CHOI, B. N.; KIM, K. H.; KIM, S. K.; KIM, D. S.; BANG, I. C.; NAM, Y. K. Differential expression of Cu/Zn superoxide dismutase mRNA during exposures to heavy metals in rockbream (*Oplegnathus fasciatus*). **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 667–679, mar. 2006.

CHOWDHURY, M. J.; WOOD, C. M. Renal function in the freshwater rainbow trout after dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C**, v. 145, n. 3, p. 321–332, abr. 2007.

COLDEBELLA, I. J.; NETO, J. R.; MALLMANN, C. A.; VEIVERBERG, C. A.; BERGAMIN, G. T.; PEDRON, F. A.; FERREIRA, D.; BARCELLOS, L. J. G. The effects of different protein levels in the diet on reproductive indexes of *Rhamdia quelen* females. **Aquaculture**, v. 312, n. 1-4, p. 137–144, fev. 2011.

COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, p. 550–552, 1944.

COLLINS, A.; DUSINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RASLOVÁ, K.; VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, n. 2, p. 139–146, 1997.

CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio Ambiente. Resolução Nº. 357 de 17 de março de 2005**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acessado em: Fevereiro/2014.

- CORREA, L. M.; KOCHHANN, D.; BECKER, A. G.; PAVANATO, M. A.; LLESUY, S. F.; LORO, V. L.; RAABE, A.; MESKO, M. F.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Biochemistry, cytogenetics and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 88, n. 4, p. 250–256, 30 jul. 2008.
- DA FONSECA, M. B.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B. S.; DE MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; TIERNO, M. A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F. F.; LORO, V. L. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 3, p. 416–420, mar. 2008.
- DORTS, J.; BAUWIN, A.; KESTEMONT, P.; JOLLY, S.; SANCHEZ, W.; SILVESTRE, F. Proteasome and antioxidant responses in *Cottus gobio* during a combined exposure to heat stress and cadmium. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 155, n. 2, p. 318–324, mar. 2012.
- DOS SANTOS MIRON, D.; SILVA, L. V. F. DA; GOLOMBIESKI, J. I.; OLIVEIRA MACHADO, S. L. DE; MARCHEZAN, E.; BALDISSEROTTO, B. Lethal concentration of clomazone, metsulfuron-metil, and quinclorac for silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 34, n. 5, p. 1465–1469, 2004.
- DRABKIN, D. L. Spectrometric studies, XIV: the crystallographic and optimal properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 164, p. 703–723, 1946.
- ELIA, A. C.; GALARINI, R.; TATICCHI, M. I.; DÖRR, A. J. M.; MANTILACCI, L. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 2, p. 162–167, jun. 2003.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. J.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.
- ENSAFI, A. A.; KHAYAMIAN, T.; BENVIDI, A.; MIRMOMTAZ, E. Simultaneous determination of copper, lead and cadmium by cathodic adsorptive stripping voltammetry using artificial neural network. **Analytica Chimica Acta**, v. 561, n. 1-2, p. 225–232, mar. 2006.
- ESPINOZA, H. M.; WILLIAMS, C. R.; GALLAGHER, E. P. Effect of cadmium on glutathione S-transferase and metallothionein gene expression in coho salmon liver, gill and olfactory tissues. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 110-111, p. 37–44, abr. 2012.
- FAROMBI, E. O.; ADELOWO, O. A.; AJIMOKO, Y. R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 4, n. 2, p. 158–165, jun. 2007.
- FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 103–107, 2004.

- FERREIRA, D.; DA MOTTA, A. C.; KREUTZ, L. C.; TONI, C.; LORO, V. L.; BARCELLOS, L. J. G. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. **Chemosphere**, v. 79, n. 9, p. 914–921, maio 2010.
- FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FERREIRA-CARDOSO, J. V.; GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S. M.; CARROLA, J.; MATOS, P.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 103–109, 2007.
- FILIPAK NETO, F. **Avaliação da citotoxicidade de uma mistura complexa de pesticidas, MeHg e DDT em hepatócitos de *Hoplias malabaricus***. Brasil. Universidade Federal do Paraná-UFPR, 2007.
- FILIPIČ, M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. **Mutation Research**, v. 733, p. 69–77, 1 maio 2012.
- FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 80–92, 2009.
- GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, mar. 1998.
- GOLOMBIESKI, J. I.; MARCHESAN, E.; REIMCHE, G. B.; BAUMART, J. S.; SALBEGO, J.; LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Acetylcholinesterase activity in the brain and muscle of *Cyprinus carpio* and *Aristichthys nobilis* exposed to azimsulfuron and metsulfuron-methyl. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 19, p. 81–89, 2009.
- GOMES, L. D. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 30, n. 1, p. 179–185, 2000.
- GUARDIOLA, F. A.; CUESTA, A.; MESEGUER, J.; MARTÍNEZ, S.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, M. J. Accumulation, histopathology and immunotoxicological effects of waterborne cadmium on gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Fish & shellfish immunology**, v. 35, p. 792–800, 2013.
- GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136–147, 2000.
- HAFEMAN, D. G.; SUNDE, R. A.; HOEKSTRA, W. C. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **Journal of nutrition**, v. 104, n. 4, p. 580–587, 1974.
- HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, n. 2, p. 187–190, 1973.
- HERNÁNDEZ, D. R.; VIGLIANO, F. A.; SÁNCHEZ, S.; BERMÚDEZ, R.; DOMITROVIC, H. A.; QUIROGA, M. I. Neuroendocrine system of the digestive tract in *Rhamdia quelen* juvenile: an immunohistochemical study. **Tissue & Cell**, v. 44, n. 4, p. 220–226, ago. 2012.

- HIDALGO, J.; ASCHNER, M.; ZATTA, P.; VASÁK, M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 133–145, 15 maio 2001.
- HINE, P. M. The granulocytes of fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 2, p. 79–98, 1992.
- ISANI, G.; ANDREANI, G.; COCCHIONI, F.; FEDELI, D.; CARPENÉ, E.; FALCIONI, G. Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sub-lethal Cd exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 1, p. 224–230, jan. 2009.
- JEMAI, H.; LACHKAR, H. A.; MESSAOUDI, I.; KERKENI, A. Effects of zinc pre-treatment on blood glutathione, serum zinc and kidney histological organisation in male rats exposed to cadmium. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 24, n. 4, p. 2772–2782, out. 2010.
- JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–389, 1992.
- KALIČANIN, B. M. Determination of very toxic metal — Cadmium in natural water samples. **Desalination**, v. 249, n. 1, p. 58–62, nov. 2009.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.
- KIM, J.-H.; DAHMS, H.-U.; RHEE, J.-S.; LEE, Y.-M.; LEE, J.; HAN, K.-N.; LEE, J.-S. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 151, n. 1, p. 99–106, jan. 2010.
- KLEMZ, C.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of Endosulfan on Acetylcholinesterase Activity of “ Cascudo ” ( *Ancistrus multispinnis* , Fish , Teleostei ). **Revista Acadêmica**, v. 3, p. 51–58, 2005.
- KÖPRÜCÜ, S. Ş.; KÖPRÜCÜ, K.; URAL, M. Ş.; İSPIR, Ü.; PALA, M. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, n. 2, p. 99–105, out. 2006.
- KREUTZ, L. C.; BARCELLOS, L. J. G.; MARTENINGHE, A.; DOS SANTOS, E. D.; ZANATTA, R. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 4, p. 694–7, out. 2010.
- KUMAR, P.; PRASAD, Y.; PATRA, A. K.; RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R. C.; PAL, S. Ascorbic acid, garlic extract and taurine alleviate cadmium-induced oxidative stress in freshwater catfish (*Clarias batrachus*). **The Science of the Total Environment**, v. 407, n. 18, p. 5024–5030, 1 set. 2009.
- LANGE, A.; AUSSEIL, O.; SEGNER, H. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to

cadmium and zinc. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP**, v. 131, n. 3, p. 231–243, mar. 2002.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994.

MARTIGNAGO, R.; TRINCHELLA, F.; SCUDIERO, R.; CRETÌ, P. Cadmium, lead and metallothionein contents in tissues of the sea bream *Sparus aurata* from three different fish farming systems. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 154, n. 1, p. S21, set. 2009.

MELA, M.; GUILOSKI, I. C.; DORIA, H. B.; RANDI, M. A. F.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; PEREIRA, L.; MARASCHI, A. C.; PRODOCIMO, V.; FREIRE, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 13–21, 2013.

MELO, G. C. DE; DONATTI, L.; RUDNIKI, C. A. M.; FANTA. Hepatic alterations in the fish *Rhamdia quelen* contaminated with Folidol 600. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 821–829, 2008.

MÉNDEZ-ARMENTA, M.; RÍOS, C. Cadmium neurotoxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 350–358, maio 2007.

MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M. Protein requirement of jundia fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v. 240, p. 331–343, out. 2004.

MORAES, D. S. DE L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 370–374, 2002.

NELSON, D. A.; MORRIS, M. W. Basic methodology. Hematology and coagulation, part IV. In: NELSON, D. A.; HENRY, J. . (Eds.). **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 17. ed. Philadelphia, USA: W.B. Saunder Company, 1989. p. 578–625.

OLIVA, M.; PERALES, J. A.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L.; GALINDO-RIAÑO, M. D. Biomarkers responses in muscle of Senegal sole (*Solea senegalensis*) from a heavy metals and PAHs polluted estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 10, p. 2097–2108, out. 2012.

OLIVEIRA-JÚNIOR, A. A.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 1, p. 146–151, 2009.

PAMPLONA, J. H.; OBA, E. T.; DA SILVA, T. A.; RAMOS, L. P.; RAMSDORF, W. A.; CESTARI, M. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 342–349, mar. 2011.

PRETTO, A.; LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; CATTANEO, R.; CLASEN, B.; FINAMOR, I. A.; DRESSLER, V. Effects of water cadmium concentrations on bioaccumulation and various oxidative stress parameters in *Rhamdia quelen*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 309–318, fev. 2011.



- PRETTO, A.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; CLASEN, B.; HOEHNE, L.; DRESSLER, V. Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 4, p. 1008–1014, maio 2010.
- PRETTO, A.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; SANTI, A.; TONI, C. Alterations in carbohydrate and protein metabolism in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 188–192, 2014.
- RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, E. E.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, n. 2, p. 147–56, fev. 2005.
- RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; COSTA, J. R. M.; CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 158, n. 1-4, p. 77–85, nov. 2009.
- REYNDERS, H.; BERVOETS, L.; GELDERS, M.; DE COEN, W. M.; BLUST, R. Accumulation and effects of metals in caged carp and resident roach along a metal pollution gradient. **The Science of the Total Environment**, v. 391, n. 1, p. 82–95, 25 fev. 2008.
- RIETZLER, A. C.; FONSECA, A. L.; LOPES, G. P. Heavy metals in tributaries of Pampulha Reservoir, Minas Gerais. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 3, p. 363–370, ago. 2001.
- ROMÉO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 48, n. 2-3, p. 185–194, 1 mar. 2000.
- ROSSI, S. C. **Estudo ecotoxicológico da exposição ao chumbo e à nanopartícula de dióxido de titânio em *Hoplias malabaricus***. Brasil. Universidade Federal do Paraná-UFPR, 2013.
- SANCHES, E. A.; NEUMANN, G.; BAGGIO, D. M.; BOMBARDELLI, R. A.; PIANA, P. A.; ROMAGOSA, E. Time and temperature on the storage of oocytes from jundiá catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 319, n. 3-4, p. 453–458, out. 2011.
- SANTOVITO, G.; PICCINNI, E.; BOLDRIN, F.; IRATO, P. Comparative study on metal homeostasis and detoxification in two Antarctic teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 155, n. 4, p. 580–586, maio 2012.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9–15, 1975.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. C, p. 192–205, 1968.
- SILVA, C. A. DA. **Avaliação da qualidade da água após cinco anos de derramamento de petróleo no município de Araucária, Paraná**. Brasil. Universidade Federal do Paraná - UFPR, 2007.

- SILVA DE ASSIS, H. C. **Der Einsatz Von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen.** Alemanha. Universidade Técnica de Berlim, 1998.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184–191, 1988.
- SOSO, A. B.; BARCELLOS, L. J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; ANZILIERO, D.; LIMA, M.; SILVA, L. B. DA; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; FINCO, J. A. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 308–313, maio 2007.
- STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H. C.; HANSEN, P.-D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**, v. 47, p. 389–398, 1999.
- SUWALSKY, M.; VILLENA, F.; NORRIS, B.; CUEVAS, F.; SOTOMAYOR, C. P. Cadmium-induced changes in the membrane of human erythrocytes and molecular models. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 6, p. 1061–1066, jun. 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G.; MORAES, F. R. DE. Características hematológicas de teleosteos brasileiros: IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 693–698, 2002.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19, p. 103–110, 2003.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. **Hidrobiológica**, v. 16, p. 271–274, 2006.
- TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R. A.; GIOLI, L. D.; FAUSTINO, C. D. Características hematológicas de teleosteos brasileiros: II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 2, p. 423–431, 1999.
- THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 121, n. 3, p. 307–20, jan. 2003.
- TOMPSETT, A. R.; VARDY, D. W.; HIGLEY, E.; DOERING, J. A.; ALLAN, M.; LIBER, K.; GIESY, J. P.; HECKER, M. Effects of Columbia River water on early life-stages of white sturgeon ( *Acipenser transmontanus* ). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 101, p. 23–30, 2014.
- TÜZEN, M. Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea ( Turkey ) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 80, p. 119–123, 2003.

- UNER, N.; ORUÇ, E.; SEVGILER, Y. Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 99–106, jul. 2005.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, fev. 2003.
- VAN DYK, J. C.; PIETERSE, G. M.; VAN VUREN, J. H. J. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 3, p. 432–40, mar. 2007.
- VAZZANA, M.; CELI, M.; TRAMATI, C.; FERRANTELLI, V.; ARIZZA, V.; PARRINELLO, N. In vitro effect of cadmium and copper on separated blood leukocytes of *Dicentrarchus labrax*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 102, p. 113–120, 2014.
- VEADO, M. A. R. V.; ARANTES, I. A.; OLIVEIRA, A. H.; ALMEIDA, M. R. M. G.; MIGUEL, R. A.; SEVERO, M. I.; CABALEIRO, H. L. Metal pollution in the environment of Minas Gerais State - Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 117, p. 157–172, 2006.
- VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, v. 44, n. 1, p. 69–84, 1997.
- VICARI, T. **AVALIAÇÃO DO EFEITO MUTAGÊNICO DE DUAS CONCENTRAÇÕES (0,075 µg/g E 0,75 µg/g) DO METILMERCÚRIO EM *Hoplias malabaricus* (PISCES) ATRAVÉS DOS ENSAIOS COMETA E MICRONÚCLEO**. Brasil. Universidade Federal do Paraná-UFPR, 2009.
- VIEIRA, L. R.; GRAVATO, C.; SOARES, A. M. V. M.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. **Chemosphere**, v. 76, n. 10, p. 1416–1427, set. 2009.
- VIRGENS, A. C. DAS. **Biomarcadores enzimáticos, hematológicos e histológicos em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.) em resposta à exposição ao acefato, difenoconazol e sulfluramida**. Brasil. Centro Universitário Vila Velha, 2009.
- WALKER, C. H. Biochemical biomarkers in ecotoxicology--some recent developments. **The Science of the Total Environment**, v. 171, n. 1-3, p. 189–95, 27 out. 1995.
- WANGSONGSAK, A.; UTARNPONGSA, S.; KRUATRACHUE, M.; PONGLIKITMONGKOL, M.; POKETHITIYOOK, P.; SUMRANWANICH, T. Alterations of organ histopathology and metallothionein mRNA expression in silver barb, *Puntius gonionotus* during subchronic cadmium exposure. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 19, n. 11, p. 1341–8, jan. 2007.
- WILTEMBURG, F. **Especiação de metais em a,binetes aquáticos utilizando dispositivos DGT modificados: aplicação em ensaios de toxicidade frente a peixes**. Brasil. Universidade Federal do Paraná - UFPR, 2012.