

MARITANA MELA

**Uso de Biomarcadores na Avaliação dos Efeitos do Metilmercúrio
em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traíra)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro.

Curitiba

2004

“A mão em que mais deves confiar é aquela
que esta na ponta de teus braços” .
(Padre Réus)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor **Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro**, meus sinceros agradecimentos pela confiança, orientação, paciência, dedicação, carinho e amizade;

À Professora **Dra. Flávia Sant'Anna Rios**, do Departamento de Biologia Celular, agradeço por sua dedicação, apoio e principalmente pela amizade;

À Professora **Dra. Helena Cristina da Silva de Assis**, do Departamento de Farmacologia - UFPR, agradeço pela atenção e disponibilidade;

A **Inês da Silva Rabitto**, minha amiga de todas as horas, obrigada pela amizade, dedicação e sobretudo companheirismo;

Ao Professor **Ms. Marco Randi**, por toda atenção e disponibilidade;

À Secretária da Pós-Graduação em Biologia Celular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas: **Marlene B. de Camargo**;

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica** da Universidade Federal do Paraná;

Ao **Departamento de Estatística** da Universidade Federal do Paraná

À **Fazenda Experimental Canguiri** da UFPR, Pinhais;

A todos os meus amigos do laboratório: **Chico, João Costa, Rogério, Fabiola Akaishi, Fabiola Valdez, Virginia, Juliana**, e os demais amigos aqui encontrados.

A **todos professores do programa de pós-graduação** em Biologia Celular e Molecular, por toda contribuição na minha formação como mestre.

Aos **meus pais (Adir e Bernadete) e irmãs (Camila e Débora)** que mesmo de longe, me deram tanto apoio.

Ao meu amado **Vinicius** por todo amor, carinho, respeito e compreensão.

A **Deus**.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT.....	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 METAIS PESADOS	3
1.2 MERCÚRIO: OCORRÊNCIA, USO E FONTES DE EXPOSIÇÃO.....	6
1.3 TRANSFORMAÇÃO DO MERCÚRIO NO AMBIENTE.....	10
1.4 FORMAS TÓXICAS DO MERCÚRIO E EFEITOS A SAÚDE	13
1.5 FONTES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL PELO MERCÚRIO NO BRASIL	17
1.6 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM PEIXES	20
1.7 BIOINDICADOR	24
1.7.1 <i>Caracterização do bioindicador <i>Hoplias malabaricus</i></i>	25
1.8 BIOMARCADORES	27
1.8.1 <i>Colinesterases</i>	27
1.8.2 <i>Parâmetros hematológicos</i>	29
1.8.3 <i>Histopatologia</i>	30
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 OBJETIVO GERAL:	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL – BIOENSAIOS	34
3.2 HEMATOLOGIA	35
3.2.1 <i>Obtenção e análise de extensões sangüíneas</i>	35
3.2.2 <i>Contagem de células do sangue</i>	35
3.2.3 <i>Hemoglobinometria</i>	36
3.2.4 <i>Determinação do hematócrito</i>	36
3.2.5 <i>Determinação dos índices hematimétricos</i>	36
3.2.6 <i>Morfometria dos eritrócitos</i>	36
3.2.7 <i>Fragilidade osmótica dos eritrócitos</i>	37
3.2.8 <i>Análise estatística</i>	37
3.3 ATIVIDADE COLINESTERÁSICA NO MÚSCULO	38
3.3.1 <i>Análise estatística</i>	39
3.4 ANÁLISE QUÍMICA ANALÍTICA EM MÚSCULO E FÍGADO	39
3.4.1 <i>Análise estatística</i>	39
3.5 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES	40

3.5.1	<i>Análise estatística</i>	41
3.6	ANÁLISE QUANTITATIVA DOS CENTROS DE MELANOMACRÓFAGOS E MELANOMACRÓFAGOS LIVRES	41
3.6.1	<i>Análise estatística</i>	41
4	RESULTADOS	42
4.1	ANÁLISES HEMATOLÓGICAS:	42
4.2	ATIVIDADE COLINESTERÁSICA.....	43
4.3	ANÁLISE QUÍMICA DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE METILMERCÚRIO	44
4.4	CONTAGEM DOS CENTROS DE MELANOMACRÓFAGOS E MELANOMACRÓFAGOS LIVRES	44
4.5	ANÁLISES MORFOLÓGICAS	45
4.5.1	<i>Organização estrutural do fígado de Hoplias malabaricus</i>	45
4.5.2	<i>Organização estrutural do rim posterior de Hoplias malabaricus</i>	47
4.5.3	<i>Organização estrutural do rim anterior de Hoplias malabaricus</i>	47
4.6	ANÁLISES ULTRAESTRUTURAIS.....	48
4.6.1	<i>Organização ultraestrutural do fígado de Hoplias malabaricus</i>	48
4.6.2	<i>Organização ultraestrutural do rim anterior de Hoplias malabaricus</i>	50
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÕES	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8	ANEXOS	124

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DE UM EXEMPLAR DE TRAÍRA <i>Hoplias malabaricus</i> (BRITZKI ET AL., 1999).	26
FIGURA 2 - FRAGILIDADE OSMÓTICA DOS ERITRÓCITOS DE <i>Hoplias malabaricus</i> APÓS EXPOSIÇÃO TRÓFICA E SUBCRÔNICA AO METILMERCÚRIO.....	42
FIGURA 3 - ATIVIDADE COLINESTERÁSICA MÚSCULO BRANCO DE <i>Hoplias malabaricus</i> APÓS EXPOSIÇÃO TRÓFICA E SUBCRÔNICA AO METILMERCÚRIO	44
FIGURA 4 - ANÁLISE QUANTITATIVA DOS CENTROS DE MELANO-MACRÓFAGOS (CMM/MM ²) E MELANOS LIVRES (ML/MM ²) EM RIM ANTERIOR DE <i>Hoplias malabaricus</i>	45
FIGURA 5 - ÍNDICE DE LESÃO NO FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i> , APÓS EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO	47
FIGURA 6 - ÍNDICE DE LESÃO EM RIM ANTERIOS DE <i>Hoplias malabaricus</i> , APÓS EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO	48
FIGURA 7 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i>	53
FIGURA 8 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i>	54
FIGURA 9 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO RIM POSTERIOR DE <i>Hoplias malabaricus</i>	56
FIGURA 10 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DE FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i>	57
FIGURA 11 - ORGANIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i>	59
FIGURA 12 - ORGANIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i>	61
FIGURA 13 - ORGANIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i>	62
FIGURA 14 - ORGANIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO RIM ANTERIOR DE <i>Hoplias malabaricus</i>	63
FIGURA 15 - ORGANIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO RIM ANTERIOR DE <i>Hoplias malabaricus</i>	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FORMAS ORGÂNICAS E INORGÂNICAS DO MERCÚRIO	10
TABELA 2 - ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ANALISADAS EM FÍGADO E RIM ANTERIOR	40
TABELA 3 – VALORES HEMATOLÓGICOS DE <i>Hoplias Malabaricus</i>	43
TABELA 4 - ANÁLISE QUÍMICO ANALÍTICA EM MÚSCULO E FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i> , EXPOSTA AO XENOBIONTE.....	44

RESUMO

O mercúrio está entre os poucos poluentes que se acumula em organismos topo de cadeia, através dos níveis tróficos inferiores, e sendo assim os organismos predadores são os mais expostos aos efeitos tóxicos deste metal. Neste trabalho a espécie *Hoplias malabaricus* (traíra) foi utilizada para avaliar experimentalmente o efeito subcrônico do metilmercúrio (MeHg) por via trófica. Nove exemplares foram utilizados como controles e nove foram expostos ao organometal através de doses consecutivas de 0,075 µgMeHg/g peixe, onde exemplares vivos de *Astyanax* sp. foram utilizados como veículo. Após 14 doses administradas a cada 5 dias, totalizando 70 dias de exposição, os peixes foram anestesiados e amostras foram coletadas para análises químicas, hematológicas, bioquímicas e morfológicas (Microscopia de Luz e Microscopia Eletrônica de Transmissão). Os dados histopatológicos mostraram a presença de infiltração leucocitária e um aumento centro de melanomacrófagos no fígado. Além disso, através da ultraestrutura foi possível identificar outros tipos de alterações como: a presença de vacuolização celular nas células endoteliais dos sinusóides, grânulos eletrodensos no citosol dos hepatócitos, bem como áreas de necrose. A diminuição do número de microvilos dos hepatócitos no espaço de Disse e necroses nesta região também foram alterações observadas. O rim anterior exibiu áreas de necrose e um aumento do número de centro de melanomacrófagos. Houve também um aumento do espaço entre as células do parênquima e das áreas fagocíticas. Foi observado ainda a presença de células atípicas no grupo exposto ao contaminante. Os parâmetros hematológicos apresentaram algumas variações. O grupo exposto ao MeHg mostrou um aumento no número de eritrócitos, leucócitos, neutrófilos, trombócitos e também nos valores do hematócrito, hemoglobina e Volume Corpuscular Médio, no entanto o número de linfócitos diminuiu no grupo tratado. Com as análises bioquímicas, foi observado uma inibição da atividade colinesterásica no músculo dos peixes expostos. A concentração total de MeHg em músculo e fígado mostrou uma tendência de acúmulo de metilmercúrio, porém esta não foi estatisticamente significativa. Através do presente trabalho, verificou-se que a dose trófica e subcrônica do metilmercúrio é potencialmente tóxico para a espécie *Hoplias malabaricus*, acrescentando dados que auxiliam a compreensão dos mecanismos de toxicidade deste importante organometal.

ABSTRACT

Mercury (Hg) is a toxic heavy metal able to concentrate in aquatic food chains, mainly in predatory fish, where the effects are more evident. In the present work a fish species, *Hoplias malabaricus* (thraíra), was used to evaluate the effects of subchronic and trophic exposure to methylmercury (MeHg). A group of nine individuals was used as control and another group received an organometal dose each five days (0,075 µgMeHg/g w.w.) through living *Astyanax sp.* After 14 doses have been administrated, corresponding to 70 days of exposure time, the fishes were anesthetized and samples were collected to perform chemical, haematological, biochemical and morphological (light and transmission electron microscopy) analyses. Some morphological findings were evident in liver tissue as: Leukocytes infiltration, melano-macrophages centers and the presence of necrosis area. The ultrastructure investigation showed some alterations on cells from liver as: the vacuolization of endothelial cells in the sinusoids vessels, electron-dense granules within the cytosol of hepatocytes and a decrease in the number of hepatocytes membrane projections near to the sinusoids barrier. Also, the head kidney presented necrosis areas and an increase of melano-macrophages centers. The space between parenquimal cells increase in the organ, as well as the phagocytic areas. The presence of necrosis areas were also found at head kidney of exposed individuals. In addition, atypical cells were observed in head kidney of individuals from treated group. The hematological parameters presented some interesting variations. Individuals from the exposed group showed an increase of erythrocytes, leukocytes, neutrophils and trombocytes numbers. Also, the hematocrit, hemoglobin and MCV values increased the respective values, despite of the lymphocytes number that decreased in the individuals from the treated group. The biochemical analyses showed an inhibition of acetilcolinesterase activity in muscle confirm the neurotoxicity of the organometal. The chemical analysis presented a tendency of bioconcentration in muscle and liver also confirming the characteristic of methylmercury accumulation in fish organs and in muscle. According to the present results, we confirm the toxicity of metylmercury and in addition, this work was the first to show experimentally the effects of trophic and subchronic doses in tropical fish species *Hoplias malabaricus*.

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos há algum tempo têm sido utilizados como locais para o despejo dos resíduos provenientes da atividade humana e, até recentemente, pensava-se que esses ecossistemas tinham capacidade infinita de absorver tais dejetos. Em outras palavras, a diluição foi considerada a solução para a poluição. Assim, a falta de preocupação no passado, com o despejo de resíduos, principalmente os mais tóxicos, como o mercúrio (Hg), podem ter contribuído para a então concepção de que ambientes aquáticos seriam um receptáculo sem limites (JOBILING, 1995).

O despejo de resíduos antropogênicos nos rios, lagos e águas costeiras é ainda praticado em várias regiões do planeta, sendo que esses produtos, muitas vezes tóxicos, podem ser biotransformados, podendo assim, aumentar sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, seu potencial tóxico. Por outro lado, alguns produtos podem percorrer grandes distâncias, provocando muitas vezes efeitos em lugares distantes da sua origem. Moléculas de mercúrio, são transportadas pela atmosfera, podendo ser depositadas a uma distância relativamente grande do local de origem. Isto significa que águas localizadas em áreas relativamente remotas e sem despejo direto deste metal podem ser também potencialmente contaminadas (LINDQUIST, 1994).

Embora seja cada vez mais evidente que os ambientes aquáticos apresentem uma capacidade limitada de absorver e degradar resíduos derivados da atividade antropogênica, uma quantidade muito grande de diversos produtos tóxicos continua sendo lançada nos ambientes aquáticos anualmente. Após a revolução industrial no início do século passado, a indústria tornou-se cada vez mais dependente do uso de novos produtos químicos, sendo que até 1995 mais de nove milhões de substâncias químicas tinham sido registradas e estima-se que destas 75 a 80 mil são utilizadas diariamente (JOBILING, 1995). Segundo o mesmo autor, muito pouco se conhece sobre o potencial tóxico desses produtos neste tipo de ecossistema.

Como conseqüência, danos em diferentes níveis de organização biológica (bioquímicos, morfológicos e fisiológicos) dos organismos aquáticos expostos a estes produtos, dentre eles os peixes, podem ser observados, podendo estes atingir

também a espécie humana (JOIRIS *et al.*, 1999; COUNTER & BUCHANAN, 2004). Isso pode levar a uma série de transformações que, ao longo do tempo, podem comprometer a permanência da espécie no ecossistema (JOBILING, 1995). O prejuízo ecológico pode atingir proporções mais amplas se a comunidade for afetada como um todo.

Os dados históricos e os contemporâneos indicam que os teores atmosféricos de Hg aumentaram de duas a cinco vezes a partir da era industrial (NIENCHESKI *et al.*, 2001; ANDERSON *et al.*, 2004). Assim, devido ao fato de apresentar um longo período de permanência na atmosfera, e por ser a contaminação das cadeias alimentares aquáticas pelo mercúrio bastante difundidas geograficamente, o mercúrio é visto como um problema global que desafia esforços internacionais, nacionais e locais.

Uma vez absorvido por organismos, os metais pesados são geralmente retidos por proteínas e então transportados pelo sangue até tecidos onde podem ser estocados, ou biotransformados. Porém, a concentração de metais encontrada em diferentes organismos expostos a um ambiente afetado por estes poluentes, depende também de fatores ambientais e biológicos do animal que vão interferir nos processos de biodisponibilidade (HEATH, 1995).

Quando a velocidade de absorção de um xenobionte, seja por exposição através da água ou do alimento, excede a velocidade de eliminação do mesmo, ocorre um acúmulo do composto, processo conhecido como bioconcentração ou bioacumulação. Isso no entanto vai depender de alguns fatores como: forma química do composto, concentração na água ou alimento, hábito alimentar, nicho ecológico, espécie envolvida, tempo de exposição e meia vida biológica nos tecidos (JONSSON, 1991). A bioconcentração ocorre mais intensamente em níveis tróficos superiores. O termo biomagnificação é reservado principalmente para processos onde ocorre uma bioacumulação associada aos diferentes níveis tróficos, sendo os que peixes podem estar sujeitos a ambos processos: bioconcentração diretamente da água ou alimento e biomagnificação através da cadeia alimentar (HEATH, 1995).

Informações importantes sobre o potencial tóxico dos metais pesados podem ser obtidas diretamente através dos ambientes contaminados e através de estudos de simulação em laboratório, estes diferindo quanto ao objetivo e metodologias de

avaliação. Estudos em toxicologia ambiental devem considerar alguns aspectos importantes: escolha do modelo de estudo (bioindicador), escolha dos parâmetros analisados (biomarcadores) e o tipo de desenho experimental (campo ou laboratório). Somente assim será possível contribuir com informações que possibilitem uma melhor compreensão e a solução dos problemas ambientais.

Numa visão mais ampla do problema, a geração de dados obtidos em experimentos sob condições controladas se validados em campo, possibilita contribuir de maneira significativa com informações sobre os níveis máximos permissíveis da presença dos diferentes contaminantes no ambiente natural.

Os peixes constituem um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental, pois se encontram em vários ambientes e apresentam ampla distribuição geográfica, participando ainda, de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar. Sendo assim, são considerados como excelentes modelos biológicos de estudo.

1.1 Metais pesados

Entre os contaminantes mais intensamente estudados em ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos estão os metais pesados (PALENZUELA *et al.*, 2004). Devido a sua toxicidade para os sistemas biológicos e sua persistência no ambiente, os metais são considerados potencialmente perigosos (KEHRIG *et al.*, 2002; COUNTER & BUCHANAN, 2004).

Os metais apresentam uma longa e bem conhecida intimidade com a história da humanidade, seja por uma beleza ou por características imediatamente úteis em cada período. Foram fundamentais na construção de ferramentas que permitiram grandes saltos tecnológicos, no entanto estiveram também presentes em processos de magia, nas artes e na ciência. Os metais pesados são, portanto, indubitavelmente, parceiros do homem nas suas grandes conquistas.

Mas apesar de tanta e tão extensa convivência, nem todos os registros são positivos. Esses fatos negativos não derivaram de malignidades inerentes aos metais, porém de usos inadequados que, por várias vezes, deles foram feitos.

Todos os tipos de metais são considerados potencialmente tóxicos, capazes, portanto de provocar efeitos biológicos adversos quando presentes em concentrações elevadas (DALLINGER & RAIMBOW, 1993). A presença de altas concentrações de metais pesados no ambiente constitui hoje um problema global devido à dimensão dos lançamentos de origem antropogênica e o seu contínuo aumento nos diferentes ecossistemas, atribuído em grande parte à industrialização e ao desenvolvimento urbano.

Para LELAND & KUWABARA (1985), quando falamos em metais, a expressão "metais traços" é freqüentemente utilizada, isso se refere ao fato de que muitos metais são requeridos para funções fisiológicas em organismos vivos. Dentre os metais considerados como nutrientes essenciais para o organismo estão: o Sódio, Potássio, Manganês, Ferro, Cobre, Zinco, Cálcio, etc. Outros como o Arsênico, Cádmio, Chumbo e Mercúrio, não têm função conhecida no metabolismo animal ou vegetal, prejudicando os organismos quando ocorrem em teores acima dos normais (BEVERIDGE *et al.*, 1997; MANAHAN, 2000).

A contaminação do ambiente aquático por metais pesados pode ser considerada crítica, devido aos potentes efeitos deletérios dentro da cadeia alimentar provocada por alguns deles. Além disso, temos os problemas de saúde pública, associados à contaminação da água ingerida e através da ingestão de alimentos provenientes destas regiões (WALKER *et al.*, 1989; WARREM & HAACK, 2001). Os altos índices de toxicidade de alguns metais para os organismos, mesmo em baixas concentrações, associados à sua relativa facilidade de entrar e permanecer na cadeia trófica por longos períodos reforça a importância dos estudos que determinem suas concentrações máximas permissíveis em ambientes aquáticos (AZCUE, 1987).

A tendência dos metais pesados em se acumular em tecidos de peixes e sua alta afinidade e interação com um grande número de ligantes e macromoléculas (VALLEE & ULMER, 1972; CLARKSON, 1986), faz destes elementos um dos grupos mais potentes de agentes neurotóxicos (SUTTERLM, 1974; HARA *et al.*, 1983). Para JOBLING, (1995) a toxicidade dos metais pesados decresce na seguinte ordem Hg, Cd, Cu, Zn, Ni, Pb, Cr, Al e Co. No entanto, esta seqüência está sujeita a modificações dependendo das condições físico-químicas do ambiente, que afetam

diretamente a especiação química destes elementos, como temperatura, pH e dureza da água (SUNDA *et al.*, 1990; JOBLING, 1995). A eliminação de metais pesados por organismos aquáticos também depende de diferentes fatores ambientais e biológicos.

Na água, nem todos os metais pesados são igualmente tóxicos ou disponíveis. Além disso, as associações de metais são dinâmicas e irreversíveis, refletindo mudanças nas condições físico-químicas do meio (WARREN & HAACK, 2001). O mercúrio é um dos metais que podem ser biologicamente metilizados nos ambientes naturais principalmente nos sedimentos (CAMPBELL *et al.*, 1988; NIENEHESKI *et al.*, 2001; ANDERSON *et al.*, 2004). A metilação de metais nos sedimentos através de reações abióticas ocorre pela transferência de grupos metil para os metais pesados. No entanto, esta reação é mais importante quando é biologicamente mediada, uma vez que é mais eficiente, aumentando significativamente a disponibilidade dos metais para a cadeia alimentar.

A demetilação dos metais no sedimento tem recebido pouca atenção se comparado com a metilação, no entanto é também importante, pois pode reduzir a biodisponibilidade do metal. A maioria das informações sobre demetilação, vem de estudos utilizando culturas de bactérias resistentes ao mercúrio, e pouco se sabe como isto ocorre no sedimento natural e com outros metais pesados (OLIVEIRA RIBEIRO, 1995).

Os agentes quelantes são muito importantes na imobilização de metais nos sedimentos. Fungos, bactérias e algas podem liberar uma variedade muito grande de moléculas orgânicas nos ambientes aquáticos que pode ligar-se a diferentes metais funcionando como agentes quelantes (CAMPBELL *et al.*, 1988). Raízes de plantas aquáticas também podem liberar substâncias capazes de se ligarem fortemente ao cádmio, cobre, chumbo e zinco (GADD, 1993; BURGSTALLER & SCHINNER, 1993).

Os efeitos que os metais podem causar aos organismos podem ser observados através do uso de bioindicadores, os quais são importantes no diagnóstico dos efeitos que estes elementos químicos podem causar aos sistemas biológicos.

1.2 Mercúrio: ocorrência, uso e fontes de exposição

O contato do homem com o mercúrio, remonta das civilizações orientais antigas, que já manipulavam o metal, tendo sido também encontrado no interior de tumbas egípcias. Nesta época, o mercúrio era utilizado como pigmento, na forma do mineral cinábrio, formado basicamente por sulfeto de mercúrio (HgS), um composto de coloração vermelha intensa, constituindo a forma mais estável do mercúrio na natureza.

Cinco séculos mais tarde o médico grego Dioscórides escreveu que o cinábrio era indicado para tratamento de doença dos olhos, porém perigoso quando ingerido. Mais tarde, no início da era cristã, já se sabia que compostos como o óxido de mercúrio (HgO) tinha propriedades que hoje definimos como germicida e fungicida. Também se produzia mercúrio metálico a partir do cinábrio, através de aquecimento a seco, em um processo denominado ustulação. Pouco depois, o mercúrio já era empregado para separar metais preciosos, como a prata e o ouro, de outros minerais aos quais aparecem associados na natureza, através da técnica de amalgamação na qual o mercúrio se liga ao metal precioso, isolando-o das impurezas.

Com o advento da Revolução Industrial e a difusão do uso do mercúrio em várias atividades humanas como agricultura, indústria eletrônica e medicina, observou-se um grande aumento nos níveis de mercúrio no ambiente em nível global. Durante séculos, o mercúrio foi ingrediente importante em numerosos medicamentos, como: diuréticos, anti-sépticos, anti-sifilíticos, laxantes, soluções conservadoras de lentes de contato, vacinas e contraceptivos. Hoje é usado principalmente como catalisador na produção eletrolítica do cloro e da soda cáustica na indústria de cloro-álcali. É também utilizado em baterias, em vários tipos de lâmpadas elétricas, incluindo as fluorescentes e as de descarga de alta densidade, em interruptores, nanômetros, barômetros, e outros tipos de instrumentos de pressão, medição e calibração usados em laboratórios analíticos, de pesquisas químicas, físicas e biológicas, em amálgamas dentários, em pigmentos, em explosivos, no tratamento de minérios de ouro e prata e para refino de metais, na produção de ácido acético e acetaldeído a partir de acetileno, na taxidermia, em

fotografia, na pintura e na produção de seda artificial (KLAASSEN, 1990; CHEMINFO, 2000; CLARKSON, 2002; COUNTER & BUCHANAN, 2004), o que acarreta em perdas significativas para o ambiente.

São vários os produtos mercuriais usados em formulações farmacêuticas onde cerca de 200 destes encontram-se registrados nos EUA. São utilizados principalmente, como conservantes em soluções nasais, oftálmicas, vacinas e produtos injetáveis. Entretanto, esse uso tende a diminuir com a substituição por outros conservantes (FDA, 1997) e com o banimento dos produtos mercuriais em vários países. No início de 2001, vários medicamentos desse tipo foram banidos do mercado brasileiro e substituídos por outros mais eficazes e que não contem o mercúrio (AZEVEDO, 2003).

O mercúrio deixou de ser usado, ou teve seu uso banido, como desinfetante em sementes de alimentos, como biocida, em pinturas como antidesfolhantes, em camada de revestimento em espelho, na produção de alguns tipos de vidros, no tratamento de feltro e como fungicida em papéis, devido aos seus efeitos nocivos em trabalhadores expostos e à população passível de exposição (WHO, 1989; SIMON *et al.*, 1990; DE VITO, 1995; CHEMINFO, 2000).

O uso do mercúrio no Brasil, em processos de mineração, pode ser estimado através de dados do Ministério de Minas e Energia, DNPM-DEM (2000), onde a produção nacional de ouro em 1999 foi de cerca de 41 toneladas, 17,4% menor que a verificada 1998. Outras fontes admitem que, no Brasil, no processo de produção de amálgama de ouro, o uso do mercúrio é grande, estimando-se que, no mínimo 50 a 70 toneladas de mercúrio metálico sejam lançadas no ambiente anualmente devido à atividade de garimpo, nos diversos locais de mineração do território brasileiro (PFEIFER *et al.*, 1990; QUEIROZ, 1995; MALM, 1998; SOUZA LIMA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002).

O símbolo moderno do mercúrio encontrado na tabela periódica, Hg, é derivado do nome grego **Hidrargyrium**, o qual significa prata líquida, sendo este o único metal no estado líquido à temperatura ambiente (HOFFMAN *et al.*, 1995). As formas químicas na qual o mercúrio pode ser encontrado naturalmente são: Mercúrio metálico (Hg^0); mercúrio monovalente (I) e mercúrio divalente (II), onde os átomos perdem um ou dois elétrons, respectivamente, formando o mercúrio mercurioso

(Hg_2^{++}) e o mercúrio mercúrico (Hg^{++}). Estes dois últimos, formam diversos compostos químicos orgânicos e inorgânicos. Os compostos formados a partir do mercúrio (II) são mais abundantes que aqueles formados a partir do mercúrio (I), e são encontrados na forma de cloretos, nitratos e sulfatos (AZEVEDO, 2003).

Os sais mais importantes industrialmente são o cloreto de mercúrio HgCl_2 , um sublimado corrosivo muito tóxico, cloreto mercurioso Hg_2Cl_2 , calomelano, ocasionalmente ainda usado na medicina, fulminato de mercúrio $\text{Hg}(\text{CNO})_2$, detonador utilizado em explosivos, e sulfeto de mercúrio HgS , de cor vermelha, usado como pigmento em tintas (HSDB, 2000).

Formam, também, uma classe de inegável importância que é a dos organomercuriais, ligados a pelo menos um átomo de carbono originando compostos do tipo RHgX RHgR' , onde R e R' representam compostos orgânicos e X uma variedade de ânions. É importante ressaltar que os compostos organomercuriais são os mais considerados, do ponto de vista toxicológico, por sua toxicidade. Os que causam maior preocupação são os ligados aos radicais alquila de cadeia curta, onde o mercúrio se liga aos grupos metila, etila e propila (WHO, 1989). Os compostos organomercuriais têm aparências distintas e odores que variam de acordo com os radicais alquilas aos quais estão ligados (NIOSH, 1997).

O termo genérico metilmercúrio (MeHg) é usado para representar os compostos monometilmercuriais. Em alguns casos, a identidade exata destes compostos não é conhecida, exceto que contem o cátion metilmercúrio, CH_3Hg^+ , associado tanto a um simples ânion como o cloreto, ou a moléculas de alto peso molecular, tais como proteínas, com cargas positivas ou negativas (WHO, 1990).

O mercúrio raramente é encontrado como elemento livre na natureza, mas encontra-se amplamente distribuído, porém em baixas concentrações, por toda a crosta terrestre (GOCHFELD, 2003; ANDERSON *et al.*, 2004). As fontes mais importantes são as do minério cinábrio (HgS), encontrado em rochas próximas de atividades vulcânicas recentes, em veios ou fraturas minerais e em áreas próximas de fontes de águas termais.

As emissões naturais mais significativas de mercúrio são a gaseificação da crosta terrestre, evaporação de corpos aquáticos e as emissões de vulcões (WHO, 1991). Admite-se que as emissões naturais sejam da ordem de 25.000 a 125.000

toneladas por ano. As emissões antrópicas se devem principalmente pela atividade das indústrias, sendo estas contribuintes em cerca de 55% da produção total de Hg (WHO, 1989).

Vale a pena lembrar também a importância da contribuição de emissões na queima de carvão, óleo e gases naturais, na produção de cimento, no tratamento de minérios de enxofre, na incineração de lixo e na disposição de rejeitos de processos metalúrgicos. Apesar de sua alta densidade, o mercúrio líquido tem uma elevada pressão de vapor. Assim, atividades que envolvem o manuseio e o transporte desta substância, automaticamente implicam numa perda para o ambiente. Esta contaminação é observada em ambientes distantes das fontes de emissão, tais como no gelo da Antártica e da Groelândia e nos oceanos, onde podem ser encontradas concentrações de mercúrio acima dos níveis considerados normais. Estas constatações comprovam a importância dos processos de transporte de mercúrio no ambiente (WHO, 1978,1991; QUEIROZ, 1995).

Segundo AZEVEDO (2003), uma parcela do mercúrio encontrado na água é de origem natural, embora possa parcialmente ser de origem atmosférica e ter sido gerada também por atividade antropogênica. Portanto, é difícil avaliar quantitativamente as contribuições relativas à atividade antropogênica e à natural em relação aos produtos mercuriais que sofrem lixiviação do solo para a água. A tabela 1 apresenta as formas de mercúrio mais comumente encontradas na natureza e as geradas por meio das atividades antropogênicas.

No Brasil, porém o garimpo de ouro ainda é a maior fonte de emissão, embora esta atividade tenha se reduzido muito na última década (MALM, 1998; MAURO *et al.*, 1999; GUIMARÃES *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002). As minas de Almadén, na Espanha, estão em operação desde 400 d.C. Além destas, existem outras de considerável expressão que ainda encontram-se ativas: Monte Amiata na Itália, várias minas na Rússia, México, América do Norte, Japão, Filipinas, Canadá, China, Turquia e na Irlanda (BIESTER & MULLER, 1999).

Através do estudo do ciclo global do mercúrio, verificou-se que este metal vem se bioacumulando através da cadeia trófica muito antes do surgimento do homem. O fato de que níveis de mercúrio foram muito altos nos primeiros anos da história da terra, onde o oxigênio ainda não tinha aparecido na atmosfera, sustenta

esta hipótese. Formas de vida deste tempo arcaico tiveram que se proteger do oxigênio que estava por vir e do mercúrio que caía através da chuva. Isto pode explicar a presença de proteínas e moléculas antioxidantes na maquinaria celular dos organismos atualmente como proteção ao oxigênio e ao mercúrio elementar e ao inorgânico, mas não ao metilmercúrio (CLARKSON, 1995).

Até o final dos anos 60, considerava-se que os compostos de mercúrio, e especialmente o mercúrio elementar liberado eram simplesmente assimilados pelo ambiente sem causar problemas. Mais tarde foi demonstrado que o mercúrio inorgânico podia ser metilado no sedimento de água doce, formando mono e dimetilmercúrio. Esta metilação era favorecida por certos organismos vivos. Aqueles experimentos forneceram a primeira evidência de que a conversão dos compostos de mercúrio podia envolver microorganismos aeróbicos (CLARKSON, 1997).

Inorgânicas	
-Metálico	Hg^0
-Sais mercurosos	Hg_2Cl_2
-Sais mercúricos	HgCl_2
Orgânicas	
-Compostos de alquilmercúrio	CH_3HgCl
-Compostos de arilmercúrio	$\text{C}_6\text{H}_5\text{HgCl}$
-Compostos de alcoxiarilmercúrio	$\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{HgCl}$

Fonte - QUEIROZ, 1995.

Tabela 1 - Formas orgânicas e inorgânicas do Mercúrio

1.3 Transformação do mercúrio no ambiente

O mercúrio sofre muitas transformações químicas na natureza, em particular no meio aquático. O mais relevante é o mercúrio inorgânico (íons Hg^{+2}) e radicais metil (CH_3), formando o composto organometálico CH_3Hg^+ , (MeHg), considerado a forma mais tóxica desse metal (GOCHFELD, 2003). A formação do metilmercúrio aumenta a dispersão do Hg no ambiente aquático. Tendo menor afinidade com as superfícies minerais do sedimento que o íon Hg^{+2} , o MeHg é liberado para a coluna

d'água e entra na cadeia alimentar (MAURO *et al.*, 1999). Nos organismos, liga-se a proteínas e passa a ser acumulado, atingindo altos níveis nos tecidos dos peixes predadores. Segundo os mesmos autores, mesmo peixes predadores oceânicos, como atuns, tubarões ou marlins, mesmo vivendo longe de áreas contaminadas, exibem níveis relativamente elevados de MeHg.

A formação biológica enzimática do metilmercúrio foi inicialmente descrita como ocorrendo em sedimentos orgânicos anaeróbicos. Os estudos iniciais indicavam que o MeHg era formado a partir de Hg^{+2} por microorganismos anaeróbicos dependendo da disponibilidade da metilcobalamina. A metilcobalamina é capaz de transferir o grupo metila para o íon Hg^{+2} , e pode estar disponível em quantidades significativas no ambiente, porque é uma coenzima produzida pelas bactérias tanto aeróbicas quanto anaeróbicas. Contudo, estudos mais recentes demonstram que a metilação do mercúrio ocorre principalmente como processo microbiano aeróbico (QUEIROZ, 1995; PELLETIER, 1995; BALDI, 1997).

O mercúrio também pode ser metilado no intestino e muco dos peixes, nos lodos de esgoto, no intestino de ratos e humanos, mas não no rúmem de bovinos. Certos microorganismos do solo também metilam o mercúrio (QUEIROZ, 1995).

A taxa de síntese do metilmercúrio é determinada, principalmente, pela concentração e forma química de Hg disponível no ecossistema aquático, assim como pela composição das espécies microbianas e o tamanho e atividade da população natural capaz de metilar. Esta capacidade pode ser observada em muitas espécies de bactérias (QUEIROZ, 1995).

Em qualquer ambiente aquático, somente uma pequena porção do mercúrio total existe como metilmercúrio, geralmente menos que 0,1%. A metilação ocorre, principalmente, nos dois centímetros superiores do sedimento, porque a maioria da população microbiana responsável pela síntese do CH_3Hg^+ esta localizada nesta camada (D'ITRI, 1972).

O potencial de metilação do mercúrio em sistemas aquáticos depende do tipo de comunidade bacteriana presente e da disponibilidade de Hg inorgânico. Esses fatores, por sua vez, estão ligados a aspectos físicos e químicos do ambiente, como temperatura, potencial de oxirredução, pH, condutividade elétrica e outros. Interações entre esses fatores podem aumentar ou reduzir a taxa de metilação.

A capacidade de converter os compostos de mercúrio inorgânico em metilmercúrio, não é restrita às bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Por exemplo, um fungo (*Neurospora crassa*) não depende da metilcobalamina para sintetizar aerobicamente o CH_3Hg^+ a partir de íons Hg^{+2} , isto é realizado por um ou mais passos na biosíntese da metionina (QUEIROZ, 1995).

Enquanto alguns microorganismos metilam os metais nos sistemas aquáticos, outros podem demetilá-los. Esta interconversão, metilação/demetilação, pode estabelecer um sistema ecologicamente dinâmico de reações competitivas que produzirá uma concentração equilibrada, entre os vários metais e metalóides e suas formas metiladas no ambiente. Contudo, a introdução de quantidades adicionais pelas atividades antropogênicas, pode romper este equilíbrio (D'ITRI, 1990 apud QUEIROZ, 1995).

A concentração de metilmercúrio encontrada nos peixes demonstra que o processo de demetilação natural não consegue degradar o CH_3Hg^+ na mesma velocidade com que ele é produzido nos sedimentos, na coluna d'água, ou no intestino dos peixes, e assimilado por estes (QUEIROZ, 1995).

Independente da origem, o mercúrio na forma orgânica ou inorgânica pode sofrer transformações no ambiente, o que torna sua distribuição ambiental bastante complexa. Em geral o ciclo biogeoquímico do mercúrio exibe um equilíbrio dinâmico, mas ações humanas podem introduzir elementos ou compostos mais rápido e em nível maior que os processos naturais, alterando os padrões dos ciclos e as condições às quais a flora e a fauna estão adaptadas (MAURO *et al.*, 1999).

Do ponto de vista toxicológico, é muito importante distinguir entre a forma inorgânica e orgânica do mercúrio devido às diferenças de absorção, distribuição corporal e efeito tóxico. Em peixes, praticamente todo o mercúrio apresenta-se na forma de metilmercúrio. Este passa rapidamente pela barreira hematoencefálica, e devido às características lipofílicas, tende a se acumular no tecido nervoso. O metilmercúrio é, portanto a forma química mais neurotóxica do mercúrio (JOIRIS *et al.*, 2000; GOCHFELD, 2003; ANDERSON *et al.*, 2004).

A interação entre o mercúrio e um tipo específico de proteínas, as metalotioneínas (proteínas de baixo peso molecular e ricas em aminoácidos cisteína), merecem destaque, uma vez que podem desempenhar um importante

papel principalmente na imobilização intracelular do mercúrio (maior na forma inorgânica que orgânica) (KLAVERKAMP *et al.*, 2000). As metalotioneínas são proteínas ligantes de metais que podem ser encontradas nos vertebrados, invertebrados e microorganismos (KAGI & KOGINA, 1987; KLAVERKAMP *et al.*, 2000). O aumento dos níveis de metalotioneínas em células, fluidos fisiológicos, seguidos da exposição a metais pesados, tem sido bastante estudadas nos últimos 30 anos na tentativa de estabelecer o potencial destas como biomonitor a exposição a tais metais (FOWLER, 1984; HENNING, 1986; KLAVERKAMP *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado que as induções da síntese de metalotioneínas em peixes por mercúrio, cádmio e zinco fornecem um valioso processo de monitoramento para avaliar a viabilidade biológica (biodisponibilidade) e o impacto desses metais nos ambientes aquáticos KLAVERKAMP *et al.* (2000).

1.4 Formas tóxicas do mercúrio e efeitos à saúde

Constituindo a sexto elemento químico mais tóxico em um universo de seis milhões, os efeitos do mercúrio sobre os organismos vivos ainda não foram totalmente desvendados pela ciência. Conhecer os reais danos à saúde dos organismos em diferentes níveis de organização biológica frente a uma exposição crônica ao metal, encontrar formas eficazes de recuperar as áreas já degradadas pelo poluente ou decifrar o seu ciclo global ou biogeoquímicos são algumas das lacunas a serem preenchidas.

O mercúrio exerce ações tóxicas importantes sobre os organismos vivos, principalmente através de ações sobre a maquinaria enzimática celular, onde o metal se liga com facilidade a proteínas, especialmente enzimas, graças à afinidade com os radicais sulfidrilas (SH) dessas moléculas. Tais ações, agudas e crônicas, são descritas principalmente sobre os rins (forma iônica) e sistema nervoso (forma orgânica) (TUBINO & MAGALHÃES, 1997) onde alterações nas funções das enzimas (VASSALLO *et al.*, 1996), na configuração das purinas, pirimidinas e ácidos nucleicos, além da interferência na integridade estrutural e nas propriedades físicas da membrana celular (BAATRUP *et al.*, 1990) constituem fatores importantes no seu mecanismo de toxicidade.

Para CLARKSON (1990b), as formas químicas do mercúrio que provocam alterações nos seres vivos são o mercúrio elementar (Hg^0), vapor ou líquido, não reativo; sais ou minerais mercuriais inorgânicos (cloreto de Hg) e mercuriais orgânicos (metilmercúrio). Todas estas formas de mercúrio se interconvertem no ambiente, como já foi visto, e o contato com qualquer dos tipos de mercuriais pode produzir toxicidade sistêmica (WHO, 1978).

Dentre as formas de mercúrio a elementar é a mais volátil, e pode ser captada pelas vias respiratórias devido as suas características de alta difusibilidade e solubilidade em lipídios (MAGOS *et al.*, 1987; GOCHFELD, 2003). Grande parte do vapor inalado permanece na corrente sangüínea e atravessa as barreiras hematoencefálica e placentária livremente. No entanto, a tolerância do homem ao vapor de mercúrio deve-se a alguns mecanismos celulares como a ação das enzimas catalases e Dismutases, onde ambas atuam para eliminar a molécula de peróxido de hidrogênio da célula. Nesta reação, o mercúrio é transformado em mercúrio inorgânico o qual é mais rapidamente eliminado pelos rins (CLARKSON, 1972; 1994)

Segundo VASSALLO *et al.* (1996), o mercúrio inorgânico, após ser absorvido, distribui-se de forma bastante heterogênea, sendo encontrado em níveis mais altos nos rins. A forma inorgânica do mercúrio ocupa praticamente todos os sítios sulfidrilas das proteínas de membrana, diferente da forma orgânica, que interage apenas com 20% do total (ROTHSTEIN, 1981), assim o efeito também pode ser diferente. Isto se deve a lipossolubilidade da forma orgânica, que pode ocupar sítios das proteínas localizadas mais internamente na membrana que a forma inorgânica (BOUDOU *et al.*, 1983; GOCHFELD, 2003). Esta forma de mercúrio modifica a estrutura das proteínas e dependendo da região da molécula em que isso ocorre, altera de forma irreversível a função estrutural ou enzimática da molécula, constituindo assim um efeito tóxico altamente específico. Sendo assim, o mercúrio inorgânico, menos lipossolúvel, concentra-se mais no plasma do que nos eritrócitos (USEPA, 1997)

A forma orgânica é encontrada nos compostos de mercúrio que possuem uma ligação covalente a um átomo de carbono sendo a forma de mercúrio que apresenta maior risco aos organismos devido a sua volatilidade e sua facilidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Trata-se de um grupo bastante heterogêneo, cuja

potência varia de um composto a outro. O mecanismo de neurotoxicidade do MeHg ainda não é totalmente conhecido. Seus efeitos são variados e irreversíveis: inibe a síntese protéica, altera a atividade enzimática e age como potente neurotoxina (MAURO *et al.*, 1999). São mais absorvidos através do trato gastrointestinal do que a forma inorgânica, porque possui maior solubilidade em lipídios e exerce ação corrosiva menos intensa sobre a mucosa do intestino (DILERMANO, 1983; GOCHFELD, 2003). Sabe-se, no entanto que o MeHg pode formar complexos com a cisteína, mimetizando estruturalmente uma metionina, a qual é um aminoácido neutro e atravessa a membrana biológica (CLARKSON, 1994; NEWLAND, 2002) Na forma orgânica, o mercúrio liga-se aos eritrócitos, onde sua depuração é de cerca de 80 dias. Da corrente circulatória atinge os demais tecidos sendo carregado para o cérebro e feto sem nenhuma barreira; músculo, rins onde uma pequena parte é eliminada pela urina; cabelo, onde é acumulado; e fígado onde volta ao intestino e é reabsorvido através do ciclo entero-hepático (CLARKSON, 1994). Sabe-se no entanto que a distribuição do metilmercúrio no organismo é lenta, levando cerca de cinco dias para atingir um equilíbrio (USEPA, 1997).

O metilmercúrio é transportado pelas células vermelhas (95%) e o restante, ligado a proteínas plasmáticas. A distribuição do Hg entre os eritrócitos depende da forma do metal, sendo que a razão Hg-eritrócitos/Hg-plasma é de 1 para o Hg inorgânico, de 2 para o Hg elementar e de 10 a 20 para o Hg orgânico, como o metilmercúrio (USEPA, 1997).

Dentre todos os organismos vivos, a espécie humana é a que apresenta maior ineficiência na defesa contra o efeito tóxico do metilmercúrio o qual produz diversas disfunções, principalmente musculares e nervosas, que podem levar a lesões irreversíveis ou fatais (BOISCHIO & HENSHEL, 2000; NIENCHESKI *et al.*, 2001; CARTA *et al.*, 2003; LINDBERG *et al.*, 2004). Pessoas expostas a esse metal apresentaram doenças crônicas degenerativas do sistema nervoso, como Parkinsonismo mercurial, doença de Alzheimer e esclerose múltipla, pois o cérebro é o local onde se encontra uma alta concentração de proteínas, tornando-se o principal alvo. Essa contaminação tem efeitos duradouros, já que o metilmercúrio permanece no organismo por longo período de tempo (CLARKSON, 2002). Segundo CLARKSON (1990a), a meia vida biológica do metilmercúrio no homem é em torno

de 70 dias e um adulto precisaria de mais ou menos um ano para eliminar todo o mercúrio proveniente de uma única dose (cinco meias vidas).

Em exposições especificamente relacionadas ao metilmercúrio, o principal órgão alvo é o SNC em todas as espécies estudadas, inclusive no homem (CARTA *et al.*, 2003). A neurotoxicidade do metilmercúrio é bem evidente no desenvolvimento embrionário e fetal, sendo a exposição intra-uterina muito eficaz. No caso de Minamata, onde gestantes expostas ao metilmercúrio através da ingestão de peixes contaminados, os efeitos neurológicos foram bem evidentes, comprovados por casos de microcefalia e retardo mental (WHO, 1990; AXTELL *et al.*, 2000).

Os primeiros indícios de intoxicação causada por mercúrio datam ainda do século XVI, em minas de cinábrio. O "mercurialismo", caracterizado por tremores, parecia ser consequência da inalação constante do vapor de mercúrio pelos mineiros. Mesmo quando se descobriu que o metal podia ser nocivo à saúde em outras circunstâncias, nenhuma restrição ao seu uso foi adotada. A toxicidade do elemento só ficou evidente, em especial para a opinião pública, com o incidente da Baía de Minamata, no Japão, nos anos 50, quando foi identificado o primeiro caso de lesão no sistema nervoso central, em moradores de vilas próximas à cidade de Minamata. Os doentes eram, em sua maioria, pescadores ou consumidores de peixes capturados na baía que abastecia a cidade. Mais de 800 pessoas morreram, inclusive com casos de enfermidade neurológica congênita, conhecida como "doença de Minamata" (TUBINO & MAGALHÃES, 1997). A causa disto foi a descarga de dejetos industriais na baía, o qual continha compostos de mercúrio orgânico usado como catalisador na produção de plástico (CLARKSON, 2002). Este composto em sua forma metilada foi lançado no ambiente entrando na cadeia alimentar e acumulando-se nos peixes, consumidos pela população local (VASSALLO *et al.*, 1996). O impacto desta contaminação, inicialmente, foi pouco compreendido, pois na época a capacidade do mercúrio em ultrapassar as barreiras placentárias hematoencefálica não era muito conhecida. De acordo com SAKAMOTO *et al.* (2000), os principais sintomas da doença de Minamata incluem, descontrole dos membros, perda de equilíbrio, redução da visão, da fala, do olfato e da audição, além de distúrbios mentais, danos cerebrais crônicos, retardo mental,

distúrbios de desenvolvimento, danos hepáticos, tremores, convulsões, hipertensão e distúrbios metabólicos.

Hunter e Russell descreveram a inalação e intoxicação por metilmercúrio em quatro trabalhadores de uma indústria produtora de fungicidas mercuriais. A autópsia de um dos trabalhadores revelou acentuada lesão neuronal e atrofia cerebral com perda cortical. Assim, esse tipo de intoxicação por mercúrio orgânico passou a ser conhecido pela Síndrome de Hunter-Russell (SWENSSON & ULFARSSON, 1963).

Em 1972, no Iraque, compostos mercuriais foram usados na agricultura como fungicidas. Pessoas foram intoxicadas e muitas morreram como consequência da ingestão do mercúrio pelos grãos tratados com mercúrio orgânico, utilizadas na fabricação do pão caseiro. Também na metade dos anos 50 evidências de danos ambientais surgiram a partir de grãos tratados na Suíça, onde pássaros predadores estavam desenvolvendo desordens neurológicas (CLARKSON, 2002).

Devido ao efeito negativo do mercúrio no meio ambiente amplamente documentado, e o contínuo aumento deste no ecossistema, é desejável que as emissões de mercúrio sejam duramente reguladas e diminuídas através de leis mais severas de proteção ambiental (LINDQVIST, 1994). LINDBERG (1998), na publicação dos artigos apresentados na 4ª Conferência Internacional sobre o Mercúrio como um poluente ubíquo, realizada em Hamburgo em 1996, discute a crescente preocupação com este contaminante. Particularmente durante a última década do século XX, cientistas, legisladores, políticos e o público em geral se conscientizaram da poluição ambiental causada pelo mercúrio. Sugere-se que as emissões antropogênicas permitiram o aumento da contaminação de Hg em escala local, regional e global.

1.5 Fontes de contaminação ambiental pelo mercúrio no Brasil

No Brasil, a intoxicação por mercúrio ocorre com maior frequência que em outros países, devido ao seu amplo emprego nas áreas de garimpo, principalmente na região do Rio Tapajós e Madeira na Amazônia onde é usado para separar o ouro das impurezas (amalgamação). O Hg forma amálgama com ouro, prata, cádmio e latão, sendo que esta característica é responsável por uma das causas de

contaminação ambiental desse composto (HSDB, 2000). De acordo com NRIAGU et al. (1992), mais de 650.000 pessoas estiveram envolvidas na atividade garimpeira na Amazônia, resultando em uma descarga anual de 90 a 120 toneladas de mercúrio dentro do ecossistema local. Nesta época o Brasil foi o principal produtor de ouro, sendo que 90% dessa produção era realizada de maneira ilegal e clandestina (MALM, 1998). PFEIFFER & LACERDA (1988) e LACERDA *et al.*, (1989), sugerem que 45% deste mercúrio foi lançado nos rios e 55% na atmosfera.

A corrida do ouro na Amazônia acarretou a contaminação por mercúrio na região em cerca de 1.000 toneladas, apenas no lado brasileiro, nos últimos 10 anos. Aproximadamente 2g de mercúrio são usados na produção de 1g de ouro, dos quais 50% são introduzidos nos rios por meio de suspensões em efluentes. Alguns estudos de pesquisadores brasileiros demonstram que ocorre grave contaminação dos sedimentos, dos rios e águas próximos de zonas de mineração, além da evidência de contaminação dos peixes carnívoros da região, que são consumidos pela população ribeirinha (OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2000; BOISCHIO & HENSHEL, 2000; SANTOS *et al.*, 2002). Também se observa, nesta região, elevada exposição humana ao mercúrio elementar, entre os mineiros e comerciantes de ouro, resultante da queima do amálgama de Au/Hg. (PFEIFFER *et al.*, 1990).

De acordo com MEECH *et al.* (1997); MALM (1998); DOREA (2003), a poluição da Amazônia pelo mercúrio representa um grave problema ambiental, pois 70 a 170 toneladas de Hg são lançadas anualmente no meio ambiente devidos às atividades informais de mineração do ouro, além dos incêndios em que a vegetação queimada constitui igualmente uma fonte primária de emissões do metal.

Existem duas formas de contaminação por mercúrio na região amazônica que podem afetar a saúde humana: primeiro a exposição ocupacional através da inalação direta do vapor de mercúrio durante a queima do amálgama, e segundo pelo consumo de peixes contaminados através da liberação e bioacumulação de mercúrio em ambientes aquáticos (BARBOSA *et al.*, 1995; AKAGI *et al.*, 1996; MALM, 1998; SOUZA LIMA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002).

A poluição ambiental por mercúrio que ocorre na Amazônia é diferente da que acontece no Japão e no Iraque. Nestes locais, o efluente industrial já continha o mercúrio sob forma metilada (AKAGI *et al.*, 1995). Na Amazônia o metal é lançado

no meio ambiente como mercúrio elementar líquido ou vapor. A forma elementar líquida é praticamente não reativa; o mercúrio se dispersa no ambiente, entra em um complexo ciclo atmosférico e praticamente não se incorpora à cadeia alimentar local. Já a forma de vapor, após oxidação na atmosfera, retorna sob forma iônica (Hg^{+2}) pela precipitação atmosférica. Esta última é altamente reativa, podendo ser metilada, principalmente em lagos de várzea, reservatórios hidroelétricos e rios.

Sabe-se hoje que 90% da população ribeirinha da Amazônia esta contaminada por mercúrio, sendo 17% em estado alarmante. Entre os peixes, a maioria das espécies carnívoras estudadas apresentam algum grau de contaminação (JARDIM & FADINI, 2001).

As características ecológicas da região amazônica bem como a saliência do ciclo do mercúrio na floresta tropical, aumenta a complexidade dos estudos sobre a contaminação por mercúrio e também dificulta avaliação da exposição e os riscos a diferentes populações da região (HANCON *et al.*, 1997). As características levemente ácidas e a grande atividade bacteriana encontrada nos sedimentos facilitam a oxidação do mercúrio da forma elementar para a forma iônica, favorecendo uma metilação mais intensa nestes tipos de ecossistema (PFEIFFER & LACERDA, 1988; AKAGI *et al.*, 1995).

Vários fatores influenciam a exposição da população ribeirinha ao mercúrio como dieta, incluindo a frequência na ingestão de peixes, preferência por certas espécies, tamanho e posição trófica do peixe consumido (PARADIS *et al.*, 1997; BOISCHIO & HENSHEL, 2000; SANTOS *et al.*, 2002). Com isso existe um aumento na preocupação com populações ribeirinhas, especialmente grupos indígenas que se alimentam basicamente de peixes, sendo consumido até três vezes ao dia (BARBOSA *et al.*, 1998; SOUZA LIMA *et al.*, 2000; BOISCHIO & HENSHEL, 2000; DOERA, 2003).

Embora em algumas regiões da Amazônia a extração do ouro possa em certos casos explicar as contaminações por mercúrio, essa hipótese deve ser descartada na Bacia do Rio Negro, onde não existem garimpos. Segundo ROULET & LUCOTTE (1998), nesta região foram realizadas análises que apontaram que os solos locais são naturalmente contaminados, tendo entre três a cinco vezes mais mercúrio que o registrado em outros. Ainda, segundo os mesmos autores, na

Amazônia o solo tem mais de 30 mil anos e não passaram por um período glacial, como no Canadá, onde o gelo cobriu a terra e formou uma camada de proteção contra o mercúrio proveniente dos vulcões. No solo, o metal pode ter tido origem também nas queimadas e outras formas como a devastação das florestas, ficando neste caso a terra desprotegida, fazendo com que as chuvas que caem na Amazônia durante seis meses levem o mercúrio para os rios, começando o ciclo que leva o metal a contaminar microorganismos que servem de alimento aos peixes, que por sua vez são o principal alimento de milhares de pessoas que vivem as margens dos rios da Amazônia.

Para JARDIM & FADINI (2001), este ecossistema é extremamente dinâmico, com altas concentrações naturais do metal, o que exige um cuidado todo especial no manejo e na conservação ambiental. Assim as atividades de extração do ouro devem ser inibidas na região, pois levariam ao lançamento de quantidades adicionais de mercúrio em um ecossistema já bastante contaminado, além disso, a atividade do garimpo está sempre acompanhada de desmatamento, perturbações nas barrancas e assoreamento de rios, o que intensifica o aporte, nas águas já impactadas da região pelo mercúrio proveniente dos solos.

1.6 Contaminação ambiental em peixes

A absorção do mercúrio presente na água por organismos aquáticos, é influenciada pela concentração desse elemento, pela taxa metabólica e pela eficiência de absorção (disponibilidade), determinada pelas características do ambiente aquático. Este último fator é o menos entendido e talvez seja a condição mais importante que governa a absorção do mercúrio pelos peixes em condições naturais

Os sedimentos de rios, lagos e do mar poluídos com mercúrio, são perigosos porque o mercúrio confinado pode permanecer ativo para a metilação por cerca de 100 anos, mesmo quando a fonte de poluição é eliminada. A persistência do metilmercúrio nos peixes é relativamente alta porque ele é metabolizado muito lentamente. A meia-vida do metilmercúrio em peixes ocorre em função da espécie, variando geralmente de um a três anos. A forte ligação do metilmercúrio com os

peixes não é destruída pelo cozimento ou fritura. A meia vida dos compostos fenilmercúricos e a do mercúrio inorgânico são geralmente menores que a do metilmercúrio (QUEIROZ, 1995).

A toxicidade do mercúrio aumenta com a temperatura e diminui com a dureza da água e é menos acentuada em sistemas estáticos, como lagos, do que em rios, com fluxo constante de água (BOENING, 2000).

Tanto o mercúrio orgânico quanto o inorgânico são absorvidos diretamente da água como dos alimentos ou da ingestão dos sedimentos (DRISCOLL *et al.*, 1994; MALM *et al.*, 1995; 1998; SOUZA LIMA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002; GOCHFELD, 2003), sendo que a ingestão de alimentos contaminados é uma das rotas mais importantes de acúmulo de mercúrio em peixes (GONDSTEIN *et al.*, 1996; NIENCHESKI *et al.*, 2001; KEHRIG *et al.*, 2002; GOCHFELD, 2003). No entanto, o metilmercúrio acumula-se mais eficientemente do que o mercúrio inorgânico na maioria dos organismos aquáticos. Esse processo de acumulação provoca a concentração de mercúrio em quantidades cada vez maiores nos animais que ocupam níveis tróficos superiores da cadeia alimentar. Isto tem sido observado através de seus hábitos alimentares, onde peixes piscívoros, com posição elevada na cadeia alimentar, freqüentemente acumulam altos níveis de mercúrio, quando comparados a peixes onívoros e planctívoros (FRANCESCONI & LANANTON, 1992; GOLDSTEIN *et al.*, 1996; BOISCHIO & HENSHEL, 2000; NIENCHESKI *et al.*, 2001; KEHRIG *et al.*, 2002; ANDERSON *et al.*, 2004). Porém, a concentração de mercúrio em tecidos também pode aumentar com a idade, peso, produção microbiana, concentração e biodisponibilidade do mercúrio no ecossistema (ZHOU & WONG, 2000; ASCHNER, 2002).

Estudos conduzidos por LACERDA *et al.* (1994), demonstraram que as concentrações de mercúrio total no músculo de 12 espécies de peixes coletadas na região mineradora de Carajás, no sul do Pará, estavam relacionados com o hábito alimentar do peixe. Os carnívoros apresentavam concentrações de mercúrio maiores que os herbívoros e onívoros. Os peixes carnívoros maiores apresentavam maior concentrações que os menores e o metilmercúrio corresponde à cerca de 91,7% do mercúrio total nos peixes analisados.

Outro estudo realizado por MAURICE-BOURGOIN *et al.* (2000), em peixes da região de mineração da bacia do rio Madeira, mostrou que os peixes piscívoros da região do rio Beni apresentaram concentrações de 0,33 a 2,30 µg/g, enquanto nos onívoros e naqueles que se alimentam de lama estes teores variam de 0,02 a 0,19 µg/g, sendo que o mercúrio acumulado pelos peixes carnívoros encontrava-se principalmente na forma orgânica de metilmercúrio e representou 73 a 98% do total analisado.

PFEIFFER *et al.* (1989) observaram que, na região de mineração de Rondônia, as concentrações nas águas de rios tributários de florestas variam de 0,1 a 8,6 µg/L, enquanto, no sedimento, atingiam concentrações de até 19.800 µg/L. Nas partes comestíveis de peixes desses rios, a concentração de mercúrio atingia até 2.700 µg/g de peso seco, ou seja, acima do recomendado pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) para consumo humano (1.000 µg.Kg).

A distribuição do mercúrio em peixes resulta do movimento do metal, a partir das diversas vias de absorção (brânquias, pele e trato digestivo). Uma vez vencida a barreira biológica, as fases seguintes incluem basicamente o transporte para o sangue e órgãos. No entanto, as interações entre o mercúrio e as membranas biológicas, vão depender das características físico-químicas do meio como mencionado anteriormente (BOUDON *et al.*, 1983; DIRCOLL *et al.*, 1994).

OLIVEIRA RIBEIRO *et al.* (1999), em experimento com *Salvelinus alpinus*, demonstrou que o movimento do metilmercúrio entre os compartimentos do corpo é surpreendentemente baixo, levando 27 dias para sua completa transferência do intestino para o sangue e 48 dias para restante do corpo. Isto provavelmente ocorra pela limitação de transferência de MeHg dos eritrócitos, para o plasma e tecidos, devido à baixa concentração plasmática de ligantes sulfidríla.

Como dito anteriormente a parede intestinal dos peixes funciona como uma barreira efetiva ao mercúrio inorgânico, mas é permeável ao metilmercúrio, o qual acumula principalmente no tecido muscular e nervoso (AKAGI, 1995; RICHARDSON *et al.*, 1995). Acima de 95% do metilmercúrio ingerido pelos peixes é absorvido pelo trato gastrointestinal, entretanto, o local exato da absorção não é totalmente conhecido. OLIVEIRA RIBEIRO *et al.* (2002) mostram que existem sítios específicos onde se concentram quantidades maiores de MeHg para o processo de

absorção. Isto sugere uma preferência do MeHg por determinadas regiões do epitélio intestinal. Trabalhos com auto-radiografia do intestino de *S. alpinus* mostraram que o MeHg parece se concentrar em alguns pontos do epitélio intestinal antes de ser absorvido. Possivelmente tais pontos de concentração do MeHg identificados pela técnica de auto-radiografia, poderiam representar sítios de absorção da molécula orgânica de mercúrio. Segundo CERNICHIARI *et al.* (1995), após 30 horas, cerca de 5% do metilmercúrio absorvido é encontrado nas células do sangue e 20% no cérebro. A concentração encontrada nas células sangüíneas é vinte vezes maior que a concentração encontrada no plasma.

Os efeitos tóxicos do mercúrio variam de acordo com a espécie considerada, o tempo e o modo de exposição, o desenvolvimento de tolerância fisiológica, os teores de metal e com fatores ambientais locais. A tolerância fisiológica ao metal pode ser adquirida pelo indivíduo ou controlada por expressão gênica hereditária (PAIN, 1995).

PELLETIER & AUDET (1995) verificaram que peixes que ingeriram mercúrio na forma orgânica, via trófica, mostraram maior acúmulo nos tecidos do tubo digestivo, fígado e sangue nas primeiras horas de exposição e posteriormente no músculo e tecido nervoso. Segundo os mesmos autores o rim também apresenta concentrações altas, mas estas estão sempre menores quando comparadas com a contaminação pelo HgCl_2 dissolvido na água. O músculo tem sido indicado para estimar o nível de contaminação de mercúrio em peixes de ambientes impactados, devido à preferência do metilmercúrio por este tecido (AKAGI, 1995; RICHARDSON *et al.*, 1995).

Peixes que foram cronicamente expostos ao metilmercúrio exibiram uma típica série de sintomas, incluindo redução na sensibilidade visual, coordenação motora anormal e variações no comportamento. Isto se correlaciona com uma distinta distribuição regional de metilmercúrio no cérebro, principalmente nas áreas relacionadas com o campo visual e motor (EVANS *et al.*, 1975; SHAW *et al.*, 1975; WEIS & WEIS, 1998). Para HAWRYSHYN & MACKAY (1979), os diferentes tecidos dos animais possuem capacidades variadas de absorver e eliminar o metilmercúrio apresentando diferentes danos patológicos.

Para FJELD *et al.* (1998), o metilmercúrio é um perigoso neurotóxico, para embriões, pois este interfere no desenvolvimento do SNC, promove danos na formação dos microtúbulos de neurônios e astrócitos, sugerindo que o efeito neurotóxico do mercúrio pode interferir na locomoção de peixes contaminados, e no comportamento alimentar. Estudos realizados por estes autores, com peixes expostos ao metilmercúrio durante a embriogênese, mostraram como consequência um prejuízo permanente relacionado à sua alimentação e habilidade competitiva.

Peixes de localidades suscetíveis à contaminação que recebem deposição atmosférica de mercúrio podem acumular metilmercúrio em suas gônadas, resultando na redução desta atividade e comprometendo o sucesso reprodutivo da espécie (FRIEDMANN *et al.*, 1996).

Para o mercúrio inorgânico dissolvido na água, ocorre maior concentração nos rins, seguido das brânquias, fígado e baço (OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 1996). Nas brânquias, se observa alterações morfológicas nas lamelas respiratórias, diminuindo a capacidade de trocas gasosas com o meio. Acredita-se que a hipoxemia seja a principal consequência da exposição ao mercúrio dissolvido na água. De acordo com HEATH (1995), a combinação de hipoxemia e outras disfunções como a falta de regulação iônica, podem causar a morte do animal.

A eliminação do metilmercúrio de organismos aquáticos e em peixes é lenta, podendo levar meses ou anos (BEYER *et al.*, 1996). A eliminação de mercúrio inorgânico é rápida e assim a maior parte é retida como metilmercúrio (WHO, 1989). A meia-vida biológica do mercúrio em peixes é de aproximadamente dois a três anos (USEPA, 1997)

1.7 Bioindicador

Os bioindicadores são conhecidos como espécies sentinelas e são utilizados como os primeiros indicadores de efeito do estresse causado por contaminantes (ADAMS, 2002).

Ao escolher um bioindicador, deve-se observar algumas características importantes, de acordo com o estudo que será desenvolvido. Um bioindicador ideal deve sobreviver em ambientes saudáveis, mas também apresentar resistência

relativa ao contaminante que esta exposto. Outros aspectos que podem facilitar o desenvolvimento de um estudo é a abundância dessa espécie no ambiente e a facilidade em adaptar-se aos ensaios laboratoriais (AKAISHI, 2003).

Neste estudo foi utilizada a espécie *Hoplias malabaricus* (Traíra), a qual é abundante no ambiente aquático dulcícola da América do Sul, ocupa níveis tróficos superiores da cadeia alimentar aquática e adaptam-se bem as condições laboratoriais. Além disso, existem hoje poucas espécies tropicais ou subtropicais brasileiras que são utilizadas ou que se apresentem como um modelo de estudo nesta área. Assim, faz-se necessário à introdução de uma espécie que represente nossos ecossistemas dulcícolas neste tipo de investigação.

1.7.1 Caracterização do bioindicador *Hoplias malabaricus*

Os peixes são importantes recursos vivos, seja pelo seu potencial comercial já que em vários países são a principal fonte de proteína da população, seja pelo aspecto ecológico, não menos importante para os ecossistemas aquáticos. Vários trabalhos utilizam estes vertebrados para avaliar efeitos tóxicos de diversos contaminantes dentre eles os organofosforados, carbamatos e metais pesados (SILVA FILHO *et al.*, 2000).

SANTOS (1981), descreve a traíra (Characiformes, Erythrinidae) como um peixe com o corpo cilíndrico com ligeira compressão lateral. A cor varia do negro na parte dorsal, ao pardacento na lateral que vai clareando até o ventre perfeitamente branco, notam-se manchas escuras e irregulares pelo corpo. A cabeça é achatada e a boca larga com maxilar inferior saliente (Figura 1). Possuem dentes fortes, principalmente quatro incisivos. Pode alcançar até 50 centímetros de comprimento. As nadadeiras são reforçadas por raios flexíveis sendo a caudal arredondada. Tem constantemente grande secreção de muco por todo o corpo, muco este que transuda através dos numerosos poros que estão localizados por baixo das escamas, notando-se que os da linha lateral expõem maior quantidade dele; assim a traíra é conhecida como o peixe de escamas mais lisas de nossos rios.

A traíra é uma espécie com ampla distribuição geográfica, que abrange todas as bacias hidrográficas da América do Sul, com exceção da área transandina e dos

rios da Patagônia, apresentando diferentes áreas de endemismo (FOWLER, 1950). Segundo HENSLEY & MOODY (1975), se os critérios para o sucesso de uma espécie for abundância e distribuição ampla, *H. malabaricus* pode ser considerada bem sucedida devido a sua grande plasticidade ecológica. Durante os primeiros anos de seu desenvolvimento são onívoras alimentando-se de microcrustáceos, algas e insetos aquáticos, na fase adulta tornam-se essencialmente carnívoras, alimentando-se preferencialmente de peixes de pequeno porte como os lambaris (*Astyanax* sp.) (MAGALHÃES, 1931). É considerada um predador noturno, que se alimenta através de predação e emboscada (ALMEIDA & HAHN, 1999; PAIVA, 1972).

Devido ao fato da traíra ocupar níveis tróficos superiores da cadeia alimentar e de que vários trabalhos com esta espécie mostram uma intensa bioacumulação de metais pesados, esta tem se mostrado um excelente bioindicador de poluição ambiental nesses ecossistemas.

Esta espécie conta com uma resistência física privilegiada, capaz de afrontar variações climáticas das regiões que passa a habitar vencendo o frio e calor intenso. A traíra pode sobreviver em ambientes pouco oxigenado o que explica sua grande capacidade de dispersão e ajuste (FERNANDES *et al.*, 1993; SUNDIN *et al.*, 1999) além de apresentarem grande resistência aos períodos de privação de alimento (PAIVA 1972; 1974; MACHADO *et al.*, 1989; RIOS, 2001; RIOS *et al.*, 2002), no entanto, poucas informações sobre respostas metabólicas envolvidas neste processo são encontradas na literatura (RIOS, 2001; RIOS *et al.*, 2002).

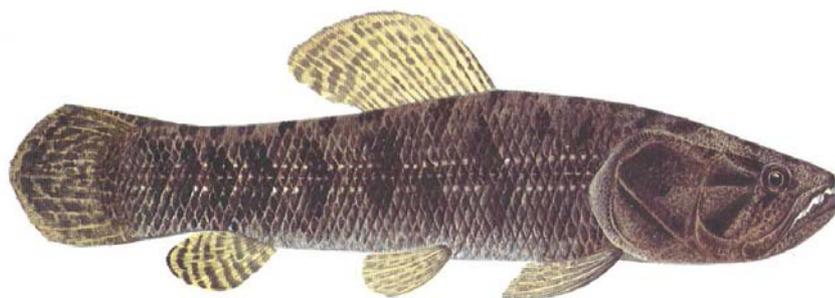


Figura 1 - Representação de um exemplar de traíra - *Hoplias malabaricus* (BRITZKI *et al.*, 1999).

1.8 Biomarcadores

Um biomarcador pode ser uma resposta bioquímica, fisiológica ou um parâmetro morfológico alterado, como consequência da exposição de um organismo a um xenobionte (MELANCON, 1995). Os biomarcadores são sensíveis aos agentes estressores e podem rapidamente ajudar a identificar os mecanismos básicos da relação causal entre o estressor e seus efeitos (ADAMS, 2002; STEGEMAN *et al.*, 1992; BAINY, 1993).

O estudo de toxicologia ambiental ideal, seja ele um bioensaio ou um biomonitoramento, seria aquele que utilizasse um conjunto de biomarcadores tendo dessa forma uma visão mais ampla dos efeitos tóxicos de contaminantes no organismo estudado (HINTON *et al.*, 1992).

1.8.1 Colinesterases

Nos vertebrados existem dois grupos homólogos de colinesterases (ChEs), que correspondem a dois genes distintos: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE), também conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase não específica. As duas enzimas podem ser distinguidas por suas afinidades através de vários inibidores seletivos (MASSOULIÉ *et al.*, 1993). AChE e BChE são reguladas separadamente e podem diferir em suas respostas ao ambiente e fatores biológicos. A AChE é essencial para a neurotransmissão colinérgica, entretanto o papel fisiológico da BChE permanece obscuro (STURM *et al.*, 1999).

Neste trabalho, nenhuma distinção foi feita entre os dois tipos de colinesterases, mas existem evidências de que o músculo de peixes possui principalmente AChE (HABIG *et al.*, 1988; LUNDIN, 1962; LEIBEL, 1988; STURM *et al.*, 1999). Assim, como a AChE esta envolvida em funções críticas neurais e neuromusculares, assume-se que ela seja a mais importante das esterases não específicas (PAYNE *et al.*, 1996). Segundo o mesmo autor, ainda assim, isto não pode ser estabelecido com total garantia, até que a função das esterases seja elucidada completamente.

A Acetilcolina (ACh) é possivelmente a substância neurotransmissora mais bem conhecida nas sinapses químicas. A enzima acetilcolinesterase está sempre presente e é responsável pela hidrólise e portanto, remoção do neurotransmissor. À medida que diminui a quantidade de neurotransmissor, o potencial pós-sináptico diminui (SHIMIDT-NIELSEN, 1996).

A principal função da AChE é a hidrólise da acetilcolina (ACh), o mediador das sinapses colinérgicas no sistema nervoso, prevenindo contínuas passagens de impulsos, o que é vital para um normal funcionamento do sistema sensorial e neuromuscular. Na transmissão sináptica colinérgica é essencial que a ACh seja degradada rapidamente antes da chegada de um novo impulso elétrico, sendo tal reação mediada pela AChE (STENESH, 1998). A AChE catalisa a hidrólise da ACh que é então transformada em colina e acetato, com a liberação de um próton. A hidrólise ocorre tão logo o neurotransmissor tenha cumprido seu papel, ou seja, ligar-se ao receptor nicotínico da membrana pós-sináptica permitindo a abertura de canais de íons Na^+ , e a conseqüente despolarização da membrana, o que irá proporcionar um potencial de ação, propagando o impulso. Quando a atividade de AChE é inibida de alguma forma, há bloqueio na transmissão de impulsos nervosos, paralisando as funções vitais devido à sobreposição dos impulsos nervosos, causados pela permanência dos canais de Na^+ abertos (STENESH, 1998).

Durante muito tempo a inibição das colinesterases foi usada como biomarcador específico para organofosforados e carbamatos, pois estes são inibidores específicos do sítio de ligação da AChE e muito já se conhece sobre seus efeitos (GALGANI & BOCQUENÉ, 1990; GUILHERMINO *et al.*, 2000).

Nas últimas décadas tem sido relatada a inibição das colinesterases em várias espécies por outros contaminantes ambientais que não organofosforados e carbamatos (GUILHERMINO *et al.*, 2000). Segundo os mesmos autores, o grupo dos metais foi provavelmente a primeira classe de poluentes ambientais incluída como agentes anti-colinesterásicos, sendo que o potencial de alguns metais como Mercúrio, Cobre, Zinco, Cádmio e Chumbo em diminuir a atividade desta enzima em peixes e invertebrados têm sido mostrada em vários estudos, tanto em condições *in vivo* quanto *in vitro* (GILL *et al.*, 1990; PAYNE *et al.*, 1996; GUILHERMINO *et al.*, 1998; RABITTO *et al.*, 2004).

Segundo SILVA FILHO *et al.* (2000), embora a AChE seja uma enzima de um único substrato, sua eficiência de catálise é uma das mais altas, o que torna a reação tão rápida que a velocidade total é bastante influenciada pela difusão dos reagentes e produtos. Essas características levaram à escolha da AChE como uma enzima biomarcadora em programas de vigilância de efeitos de contaminantes, sendo considerada um dos mais antigos biomarcadores ambientais (PAYNE *et al.*, 1996). Atualmente alguns trabalhos têm utilizado a inibição da atividade das ChE's como um biomarcador de contaminação em peixes (RABITTO, 2004).

Além de interferir na atividade das ChE's, o mercúrio também parece exercer um outro tipo de efeito neurotóxico. Há evidências fisiológicas de que cátions divalentes como o mercúrio atue como bloqueador de canais de cálcio, impedindo o influxo deste cátion em terminais nervosos, o que inibe a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica (MANALIS & COOPER, 1975; COOPER & STEINBERG, 1977). Isso ocorre porque o Ca^{++} é requerido para a fusão de vesículas intracelulares na membrana pré-sináptica, com a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, quando um potencial de ação chega nos terminais nervosos (COOPER & STEINBERG, 1977).

1.8.2 Parâmetros hematológicos

Em ecotoxicologia, a aplicação de diferentes biomarcadores para investigar o efeito de contaminantes *in vivo* é um requisito para entender seus mecanismos e também indiretamente avaliar a adaptação dos organismos a condições de estresse. Estudos hematológicos são freqüentemente aceitos e considerados como de rotina no diagnóstico de doenças em mamíferos (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2000) e também em aquicultura para avaliar a relação entre dieta e níveis de nutrientes, porém poucas investigações têm sido realizadas para avaliar o efeito de contaminantes em peixes de espécies neotropicais (AFFONSO *et al.*, 2002). A ausência de estudos sobre a caracterização de células sanguíneas e outros valores hematológicos em diferentes espécies de peixes, provavelmente seja a maior barreira para se usar esta ferramenta na investigação do efeito de contaminantes em peixes. A falta de métodos e nomenclatura padronizada, assim como diferenças nas espécies, idade, sexo,

qualidade da água e métodos de captura podem constituir variáveis e dificultar a interpretação dos dados. Por esta razão, é difícil comparar resultados com diferentes espécies e diferentes estudos (KLINGER *et al.*, 1996).

O conhecimento da composição do sangue é de fundamental importância na avaliação das condições fisiológicas do peixe, pois, há variações morfológicas e quantitativas dos elementos sanguíneos frente a condições endógenas e exógenas (SOIVIO & OIKARI, 1976). Porém, segundo RANZANI-PAIVA *et al.* (2000), a identificação das células sanguíneas em peixes deve ser considerada com reserva, devido ao fato de que as células indiferenciadas ou anormais serem comumente encontradas na corrente sanguínea, mesmo estando o peixe em condições normais de saúde.

Alguns autores observaram que existem relações entre os parâmetros hematológicos e a disponibilidade de metais pesados na água (DE WILDE & HOUSTON, 1967; MOLNAR & TAMASSY, 1970). Sendo que as características dos ambientes em que os peixes vivem, podem afetar o processo de formação de células sanguíneas (ROTHMANN *et al.*, 2000). ALBERT & ANDERSON (1998), sugerem o uso de parâmetros hematológicos como biomarcadores de exposição ao mercúrio.

RANZANI-PAIVA *et al.* (2000); RIOS (2001) têm descrito alguns valores hematológicos para *Hoplias malabaricus*, porém nenhum destes descreve o efeito de metais pesados na hematologia desta espécie.

1.8.3 Histopatologia

A histopatologia é uma ferramenta útil que pode demonstrar efeitos decorrentes da exposição a estressores nos indivíduos, representando um nível intermediário de organização biológica. As lesões detectadas em células, tecidos ou órgãos representam uma integração dos efeitos cumulativos dos estressores em nível fisiológico e bioquímico e potencialmente em níveis mais altos de organização biológica (MYERS & FOURNIE, 2002).

A histopatologia, juntamente com os parâmetros bioquímicos, permite analisar as respostas fisiológicas dos indivíduos, assim como estabelecer o grau de

toxicidade dos contaminantes (AKAISHI, 2003). Recentemente vem ocorrendo o enriquecimento e a implementação da literatura relacionada ao uso de biomarcadores histopatológicos de estresse ambiental. Isto tem aumentado os argumentos quanto ao uso deste biomarcador como indicador de adversidades, efeitos crônicos subletais e injúrias para vertebrados aquáticos (especialmente peixes) em ambientes biomonitorados ou mesmo em experimentos em laboratórios (MYERS & FOURNIE, 2002).

De acordo com HINTON & LAUREM (1990), existem muitas razões para selecionar o fígado como um importante órgão em estudos de toxicologia. O fígado é a maior glândula em qualquer vertebrado e é o primeiro órgão a atuar na biotransformação de xenobiontes e excreção de alguns metais pesados, atua na estocagem de carboidratos (glicogênio) e, especialmente em ciclostomata e peixes, acumula lipídeos. Além disso, produz grande parte do vitelo transferido aos óvulos e no período embrionário e de peixes adultos, pode ter função hematopoiética, libera substâncias envolvidas na coagulação sanguínea, processa ou estoca vitaminas e está envolvido com o metabolismo de hormônios esteróides (HEATH, 1995; POUGH et al., 1999). Produz a bile que é coletada por um sistema de ductos e liberada no trato digestivo, auxiliando na digestão extracelular (POUGH *et al.*, 1999).

Nos teleósteos, o rim localiza-se dorsalmente, junto à coluna vertebral e é dividido em rim anterior, que contém na grande maioria dos peixes, tecido hematopoiético e rim posterior que possui as unidades filtrantes e os diversos túbulos (HEATH, 1995). Segundo o mesmo autor, em algumas espécies de peixes e anfíbios, a estrutura renal é um pouco mais complexa, com néfrons apresentando segmentação bem definida. A estrutura morfológica do rim dos teleósteos em geral, é caracterizada por apresentar néfrons com corpúsculos renais (glomérulos e cápsula de Bowman).

Nos vertebrados terrestres, o rim é o único órgão responsável pela manutenção da homeostase dos fluídos corporais. Nos peixes, este órgão é auxiliado nesta tarefa pelas brânquias e outros tecidos como o esôfago, intestino e epitélio opercular. Nas várias classes de vertebrados, encontramos diversos tipos de rins, adaptados ao ambiente onde o animal vive (HEATH, 1995).

Na maioria dos peixes, o lugar predominante da hematopoiese está localizado no rim anterior. A maior parte deste órgão é composta por células formadoras do sangue, suportado por células reticulares e fibras do tecido conjuntivo (LEENHUER, 1969). Também são encontradas neste órgão células indiferenciadas e células de defesa. No tecido hematopoiético encontram-se os melanóforos, os quais podem se apresentar como centros de melano-macrófagos (MMCs), localizados difusamente pelo tecido (ROBERTS, 1975). De acordo com o mesmo autor estes centros de melano-macrófagos podem apresentar grau de pigmentação variada, dependendo da espécie, idade e estado de saúde do peixe.

Nos peixes teleósteos não existe uma glândula adrenal típica, tal como ocorre em outros vertebrados. Nestes os tecidos interrenal e cromafin estão presentes na região proximal do rim (MATTY, 1985). Nos teleósteos, a distribuição e a associação destes dois tecidos é variável, as células interrenais acham-se dispostas ao redor dos ramos das veias cardiais posteriores do rim cefálico e as cromafins, entremeadas com as interrenais (MATTY, 1985). A glândula ou tecido interrenal dos peixes, secreta glicocorticóides, cujo principal representante é o cortisol, com ações relevantes durante todos os tipos de estresses (DONALDSON, 1981; BALM *et al.*, 1995). As células cromafins sintetizam por sua vez as catecolaminas (JONSSON & HANSSON, 1984; VERMA & MISRA, 1992), além de outras substâncias, como o peptídeo natriurético atrial e o neuropeptídeo Y (WOLFENBERGER *et al.*, 1995). A adrenalina e noroadrenalina nos peixes, da mesma forma que em outros vertebrados, tem ação sobre o metabolismo dos carboidratos, promovendo a glicogenólise-hepática e o aumento dos níveis de glicose no sangue. Sobre o metabolismo lipídico, atuam acentuando a quebra das gorduras, proporcionando assim, substratos energéticos (MATTY, 1985). DIXIT & AGRAWALA (1975) sugerem mudanças na morfologia das células cromafins, bem como na síntese das catecolaminas pelas mesmas, em função da sazonalidade, maturidade sexual e fase do ciclo reprodutivo (FARIAS *et al.*, 1989). Estudos mostram que a morfologia das células cromafins e tecido interrenal é freqüentemente variável, mesmo quando se examinam espécies filogeneticamente próximas (HOOLI & NADKARNI, 1975).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Este estudo teve como objetivo analisar o efeito tóxico do metilmercúrio em traíra (*Hoplias malabaricus*, Bloch, 1794), visando conhecer o potencial tóxico deste composto sobre alguns mecanismos biológicos, através de exposição trófica e subcrônica da espécie em condições experimentais.

2.2 Objetivos específicos:

√ Descrever eventuais alterações hematológicas de células e componentes do sangue devido a presença deste contaminante.

√ Analisar o efeito neurotóxico do metilmercúrio através da determinação da atividade colinesterásica no músculo axial da traíra.

√ Analisar o acúmulo de mercúrio total em músculo axial e fígado.

√ Avaliar, através de análises histopatológicas, o efeito do metilmercúrio no rim e fígado da traíra, após exposição subcrônica e trófica, utilizando técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental – bioensaios

O estudo teve início a partir da coleta de 18 exemplares de Traíra, capturados na estação de piscicultura de Toledo – PR (Setembro de 2002) e transportados para o Laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular, onde cada indivíduo foi colocado em um aquário de 30L, contendo água filtrada em filtro de resina e carvão ativado e aeração constante realizada através de um sistema de bombas de ar. A temperatura foi controlada e mantida através de aquecedores controlados por termostatos a uma temperatura média de 23°C. Um sistema de *timer* permitiu manter um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro.

Os aquários foram mantidos limpos através de sifonagem regular do fundo para retirada de fezes e resíduos e troca de dois terços da água (20 L) com limpeza manual das paredes dos aquários dois dias depois de cada alimentação. Filtros internos de água foram utilizados e trocados durante a limpeza dos aquários. Essas medidas visaram minimizar a adição de variáveis que pudessem interferir nos resultados.

Antes do início do experimento, os exemplares foram pesados e divididos em 2 grupos de nove animais cada um. Um grupo foi utilizado como controle e o outro foi exposto ao MeHg via alimento. Após serem pesados, a dose a ser injetada em cada presa foi calculada baseando no peso de cada exemplar.

A contaminação trófica e subcrônica foi realizada através de exemplares vivos de Lambaris (*Astyanax* sp.), os quais receberam intraperitonealmente um volume solução aquosa de MeHg correspondendo a uma dose de 0,075 µg/g de traíra. A contaminação trófica foi realizada durante um período de 70 dias, correspondendo a 14 doses, aplicados após período de 120 horas de jejum. Os animais controle foram alimentados com a mesma espécie (*Astyanax* sp.) os quais receberam injeção intraperitoneal de água destilada. A dose testada de metilmercúrio foi baseada em concentrações do organometal encontradas em espécies de forrageiras de lambaris

provenientes de ambientes impactados por este contaminante (OLIVEIRA RIBEIRO, 1995).

Após 70 dias de exposição ao MeHg, cada exemplar foi anestesiado com MS222 0,02% (ácido etil-éter-3-amino-benzóico, Sigma®) e dissecado para retirada do material biológico utilizado nas análises. Foram coletadas amostras de sangue (através de punção caudal) e imediatamente utilizadas para as análises de hematologia. Amostras de músculo axial foram congeladas a -20°C para posterior análises da atividade colinesterásica e para a quantificação de mercúrio total em músculo e fígado. Amostras de fígado e de rim anterior e posterior foram fixadas em Alfac por 16 horas para Microscopia de Luz e em Karnovsky por 2 horas, para Microscopia Eletrônica de Transmissão. O material fixado foi processado através de metodologias de rotina, cujos protocolos encontram-se em anexo.

3.2 Hematologia

3.2.1 Obtenção e análise de extensões sangüíneas

Logo após a coleta, foi colocada uma gota de sangue em uma lâmina, distendendo-a com o auxílio de uma lâmina limpa. Após a distensão pronta e seca, utilizou-se a coloração de May-Grünwald-Giemsa (CARVALHO, 1994) (protocolo em anexo).

As extensões sanguíneas foram utilizadas na contagem diferencial de leucócitos, contagem de trombócitos e para a análise de morfometria dos eritrócitos sob microscopia de luz (protocolo em anexo).

3.2.2 Contagem de células do sangue

Foi utilizado o método manual com auxílio da Câmara de Neubauer, onde foram contados os eritrócitos e leucócitos totais de acordo com a metodologia descrita por CARVALHO (1994) (protocolo em anexo).

3.2.3 Hemoglobinometria

Para a determinação da concentração de hemoglobina foi utilizado o método colorimétrico descrito por HOUSTON (1990), o qual baseia-se na conversão da hemoglobina em cianometa-hemoglobina, passando do estado ferroso para o férrico observado pela mudança de coloração (protocolo em anexo).

3.2.4 Determinação do hematócrito

Para a determinação do hematócrito foi utilizado o método do micro-hematócrito proposto por CARVALHO (1994) (protocolo em anexo).

3.2.5 Determinação dos índices hematimétricos

A partir da contagem dos eritrócitos ($Er - 10^6$ células. mm^{-3}), determinação da concentração de hemoglobina ($Hb - g.dL^{-1}$), valor do hematócrito (%) calculou-se os seguintes Índices Hematimétricos: Volume Corpuscular Médio ($VCM - \mu m^3$), Hemoglobina Corpuscular Média ($HCM - pg.\mu L^{-1}$) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média ($CHCM - g.dL^{-1}$). Os Índices foram obtidos de acordo com as seguintes equações descritas por CARVALHO (1994):

$$VCM = (Ht / Er).10$$

$$HCM = (Hb / Er).10$$

$$CHCM = (Hb / Ht).100$$

3.2.6 Morfometria dos eritrócitos

A captura de imagens das extensões sanguíneas (12 campos por lâmina) ocorreu no microscópio BX51 acoplado a uma câmera através do programa Image-Pro Express. A morfometria dos eritrócitos foi determinada através do programa de análise de imagens *UTHSCSA ImageTool*, sendo analisados aproximadamente 200 eritrócitos por exemplar.

Especificações das características analisadas:

Área: superfície ocupada pela célula

Elongação: equivale ao comprimento do eixo menor pelo eixo maior, gerando valores entre zero e um.

Esfericidade: calculada como $(4 \times \pi \times \text{área})/\text{perímetro}$ gerando valores entre zero e um.

3.2.7 Fragilidade osmótica dos eritrócitos

Avaliou-se o comportamento dos eritrócitos em meios de tonicidades diferentes, observando a ocorrência de hemólise nestas células. A metodologia utilizada foi proposta por (CARVALHO, 1994) (protocolo em anexo).

3.2.8 Análise estatística

Para todas as análises hematológicas, houve a preocupação de identificar a influência da variável peso nas respostas das outras variáveis em estudo, e para tanto foi utilizada uma análise de correlação para obtenção do coeficiente de correlação entre a variável peso e a variável de interesse (covariável). Identificando a existência de uma correlação entre estas variáveis os dados foram submetidos a uma análise de covariância (ANCOVA), onde depois de incluída a variável peso, pode-se medir a influência desta variável. Esta análise foi realizada através do programa estatístico R. Em nenhuma das variáveis foi identificada a influência da variável peso nos efeitos das variáveis principais e portanto a análise se desenvolveu com a aplicação do teste t de Student para comparar os resultados dos peixes contaminados com os grupo controle. Para este teste utilizou-se o programa estatístico GraphPad Instat V.3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) e a normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os dados da fragilidade osmótica foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal Wallis e realizado o ajuste de um modelo de regressão o qual descreve o comportamento da porcentagem de hemólise ocorrida em função da concentração de NaCl.

3.3 Atividade colinesterásica no músculo

Amostras de músculo axial (200 a 300 mg) foram obtidas através de incisão próxima à linha lateral, na altura da nadadeira dorsal. O fragmento foi colocado em eppendorf de 2 mL em banho de gelo e, em seguida, congelados à -20°C até a análise.

Para as análises, as amostras de músculo foram descongeladas em banho de gelo moído e em seguida homogeneizadas em 3 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,5, conforme STURM *et al.* (1999). Os homogeneizados foram transferidos para eppendorf de 2 mL e centrifugados por 10 min a 4°C e a 10.000g. Os sobrendantes foram utilizados para determinação da atividade colinesterásica, segundo o método de ELLMANN *et al.* (1961), modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1998), cujo princípio é o desenvolvimento da reação colorida entre o reagente de cor DTNB e tiocolina. Na microplaca de leitura em espectrofotômetro, foi adicionado 200 µL de DTNB (5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoato) a 0,75 mM, 50 µL de proteína diluída 1:8 e 50 µL de iodeto de acetilticolina a 9 mM sobre cada alíquota.

Todas as absorbâncias consideradas para cada amostra de músculo, inclusive na quantificação protéica, foram às médias de no mínimo três valores. Foi usado o espectrofotômetro TECAN SUNSHINE para as leituras. A média dos valores de absorbância foi utilizada para o cálculo da atividade específica e o resultado da atividade colinesterásica foi expresso em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Para quantificação protéica (proteína total), foi utilizado o método de BRADFORD (1976), adaptado por SILVA DE ASSIS (1998). Alíquotas (10 µL) de amostras diluída (1:20) em tampão fosfato (0,1M, pH 7,5) foram pipetados em uma microplaca. Em seguida, foi adicionado 250 µL de reagente de Bradford diluído (Bio Rad®). A absorbância das amostras foi verificada a 650 nm. Os valores finais da quantificação colorimétrica foram obtidos em miligramas de proteína por mililitros de amostra, utilizando-se uma curva padrão pré-estabelecida com diferentes concentrações conhecidas de soro de albumina bovina (BSA).

3.3.1 Análise estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico R. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro Wilks e a Homocedasticidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Como o pressuposto da Homocedasticidade não foi atendido, foi feita uma correção da escala dos dados originais através da transformação logarítmica BOX-COX. Em seguida aplicou-se o teste t para comparar os grupos. Para esta variável também foi observada a influência da covariável peso nos resultados.

3.4 Análise química analítica em músculo e fígado

Uma parte de tecido foi removida de cada animal e individualmente congelada para posterior análise de mercúrio total nestes tecidos. As amostras foram lidas em espectrofotômetro de absorvância atômica ICP-EAS da Varian - modelo liberty II com um acessório de geração de vapor a frio (VGA 77). O procedimento de extração química de mercúrio total em amostras de tecido de peixe utilizada, foi descrita por Bastos et al. (1998). As análises foram desenvolvidas no Centro de Ciências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – RJ no laboratório de Ciências Ambientais. (Protocolo em anexo)

3.4.1 Análise estatística

A concentração total de metilmercúrio foi analisada estatisticamente apenas nas amostras de músculo, pois o resultado apresentado para fígado corresponde à concentração de um pool de animais. Utilizou-se o programa estatístico GraphPad InStat V.3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, foi aplicado o teste t de Student para comparar os resultados.

3.5 Avaliação histopatológica das lesões

As alterações histopatológicas observadas no fígado e rim anterior de todos os exemplares utilizados neste trabalho foram avaliadas de acordo com o método descrito por BERNET *et al.* (1999). Estas foram consideradas de acordo com os seus respectivos fatores de importância (Tabela 2), onde: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível; (2) importância moderada, reversível em muitos casos e (3) importância marcante, geralmente irreversível, levando a diminuição das funções do órgão. De acordo com o grau de ocorrência, foram atribuídos valores para as alterações observadas em cada tratamento, sendo: (0) Inalterado, (2) Ocorrência Ocasional, (4) Ocorrência Moderada e (6) Ocorrência severa (lesão difusa). O Índice de lesão (IL) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IL = \sum_{pr} \sum_{alt} (a \times w)$$

Onde : pr = padrão de reação, alt = alteração, a = valor atribuído à alteração e w = fator de importância.

Padrão de Reação	Unidade Funcional	Alteração	Fator de importância
Alterações regressivas	Fígado e Rim A.	Necrose	3
Inflamação	Fígado e Rim A.	Ativação do sistema retículo-endotelial (CMM)	1
	Fígado	Infiltração leucocitária	2

Tabela 2 - Alterações histopatológicas analisadas em Fígado e Rim anterior com seus respectivos Fatores de importância (modificado a partir de Bernet *et al.*, 1999).

3.5.1 Análise estatística

Utilizou-se o programa estatístico GraphPad InStat V.3.0. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, foi aplicado o teste t de Student para comparar os resultados de rim e o teste não paramétrico de Mann Whitney para fígado.

3.6 Análise quantitativa dos centros de melanosmacrófagos e melanosmacrófagos livres

Os centros de melanosmacrófagos e melanosmacrófagos livres foram contados através de um sistema-teste quadriculado acoplado a uma das oculares do microscópio, cuja área era de 1mm^2 onde cada quadrado media $0,01\text{mm}^2$. Foram analisadas 15 campos escolhidos aleatoriamente em lâminas de rim anterior de todos os indivíduos utilizados no estudo, coradas em H.E. através de microscopia de luz. O número de melanosmacrófagos livres foi considerado como sendo aqueles que continham de 1 a 4 células pigmentadas e os centros de melanosmacrófagos os que continham um número igual ou superior a 5 células pigmentadas. Os resultados da contagem dos melanosmacrófagos foram apresentados por mm^2 (RABITTO, 2004).

3.6.1 Análise estatística

O número de melanosmacrófagos foi analisado estatisticamente pelo teste t Student's no Programa GraphPad InStat. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

4 RESULTADOS

Não houve mortalidade de *Hoplias malabaricus* durante o bioensaio de exposição subcrônica, e os indivíduos testados permaneceram aparentemente saudáveis até o final do experimento.

4.1 Análises Hematológicas:

A contagem das células do sangue dos indivíduos expostos ao metilmercúrio revelou um aumento no número total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos em relação ao grupo controle. Houve também aumento no valor do hematócrito e hemoglobina. A contagem diferencial de leucócitos revelou um aumento significativo no número de neutrófilos, porém redução no número de linfócitos e manutenção no número de monócitos nos indivíduos contaminados. Das constantes corpusculares, apenas o VCM apresentou elevação. A análise da morfometria dos eritrócitos demonstrou que o parâmetro área celular, alongação e a esfericidade mantiveram-se inalterados em relação ao grupo controle. Resultados expressos na Tabela 3.

Com os dados apresentados na Figura 2, para a fragilidade osmótica dos eritrócitos é possível concluir que em nenhuma das concentrações testadas há evidências estatísticas de que a hemólise do grupo controle difere da hemólise do grupo tratado, sendo que a porcentagem de hemólise ocorrida em função da concentração de NaCl, segue um modelo exponencial.

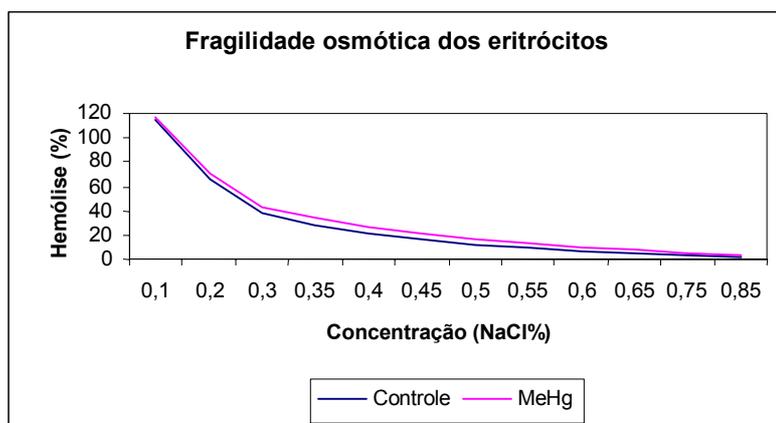


Figura 2 - Fragilidade osmótica dos eritrócitos de *Hoplias malabaricus* após exposição trófica e subcrônica ao metilmercúrio.

	Controle	MeHg
Eritrócitos	1,63 ± 0,06	1,91 ± 0,06*
Leucócitos	3,96 ± 0,35	6,40 ± 0,22***
Trombócitos	0,53 ± 0,09	1,06 ± 0,12***
Hematócrito	25,33 ± 1,45	36,22 ± 0,87***
Hemoglobina	5,07 ± 0,15	6,02 ± 0,13***
Neutrófilos	19,33 ± 2,61	32,22 ± 2,53***
Linfócitos	75,61 ± 2,18	61,88 ± 4,55*
Monócitos	7,22 ± 1,01	5,88 ± 1,11
VCM	155,89 ± 4,83	185,78 ± 2,63***
HCM	31,89 ± 0,83	31,44 ± 0,90
CHCM	17,80 ± 0,53	17,25 ± 0,49
Área	46,29 ± 0,27	46,34 ± 0,23
Elongação	1,43 ± 0,008	1,45 ± 0,007
Esfericidade	0,91 ± 0,002	0,91 ± 0,001

Tabela 3 – Valores Hematológicos de *Hoplias malabaricus* (Média ± erro padrão da média). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. Número de eritrócitos (10^6 células.mm⁻³); número de leucócitos (10^4 células.mm⁻³); número de trombócitos (10^3 células.mm⁻³); hematócrito (%); hemoglobina (g.dL⁻¹); neutrófilos, linfócitos e monócitos (%); VCM (Volume Corpuscular Médio (μm^3)); HCM (Hemoglobina Corpuscular Média (pg. μl^{-1})); CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (mg.100g /dL⁻¹)); área (μm^2); alongação e esfericidade (unidades adimensionais).

4.2 Atividade Colinesterásica

A atividade colinesterásica é um importante biomarcador de exposição e foi utilizada neste trabalho para verificar o efeito neurotóxico do metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* após exposição trófica e subcrônica. Os resultados estão expressos no gráfico da Figura 3, onde é observada uma inibição significativa ($p < 0,05$) da atividade colinesterásica nos indivíduos expostos ao metilmercúrio.

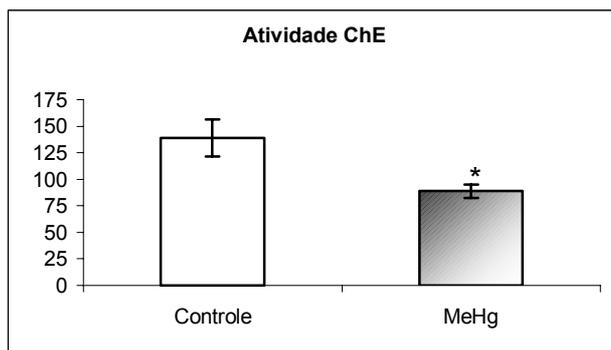


Figura 3 - Atividade colinesterásica (η mol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína) no músculo axial de *Hoplias malabaricus* após exposição trófica e subcrônica ao metilmercúrio (média \pm erro da média).

4.3 Análise química da concentração total de Metilmercúrio

Os resultados apresentados na tabela 4 demonstram que depois de 70 dias de exposição ao xenobionte, os tecidos analisados apresentam uma tendência de concentrar mais mercúrio em relação aos controles.

Concentração de MeHg		
	Controle	MeHg
Músculo	6,01	10,69
Fígado	< 0,67	1,45

Tabela 4 - Análise químico analítica em músculo e fígado de *Hoplias malabaricus*, exposta ao xenobionte. Os valores estão expressos em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso úmido, sendo 0,67 o limite de detecção do método.

4.4 Contagem dos centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos Livres

Os resultados da contagem dos centros de melanomacrófagos (CMM) e melanomacrófagos livres (ML) no rim anterior de *Hoplias malabaricus*, demonstram que os CMMs estão presentes em maior número ($p < 0,05$) nos indivíduos expostos ao metilmercúrio, enquanto que os MLs mantiveram número semelhante nos dois grupos (Figura 4).

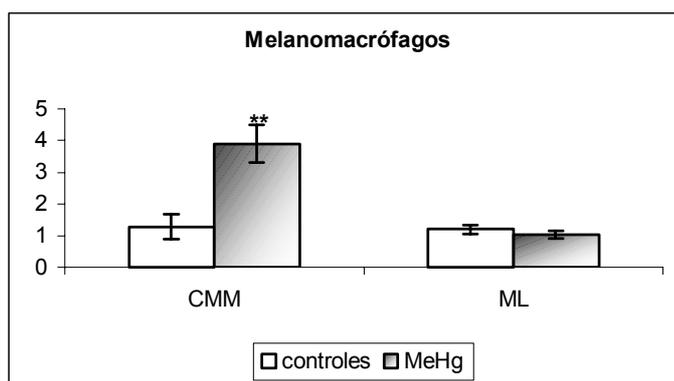


Figura 4 - Análise quantitativa dos centros de melanomacrófagos (CMM/mm²) e melanomacrófagos livres (ML/mm²) em rim anterior de *Hoplias malabaricus*.

4.5 Análises morfológicas

4.5.1 Organização estrutural do fígado de *Hoplias malabaricus*

Os cortes histológicos de fígado do grupo controle de *Hoplias malabaricus*, corados com hematoxilina/eosina e observados em microscopia de luz, mostraram constituição normal, havendo predomínio de hepatócitos. Estas células são grandes, poliédricas com núcleos arredondados, cromatina dispersa e nucléolos evidentes (Figura 7A;7B). Na traíra, é possível observar nitidamente que o maior armazenamento de glicogênio ocorre nas células da periferia do órgão (Figura 8A;8B). nas demais células, provavelmente há acúmulo de lipídios, que também, é uma importante fonte de reserva na traíra (RIOS, 2001).

O citoplasma é fortemente eosinófilo devido a numerosas mitocôndrias, com uma fina granulação basofílica devido a grande quantidade de ribossomos livres e retículo endoplasmático granular (Figura 11B). Quanto à sua organização, os hepatócitos apresentam-se paralelamente arranjados em torno de vasos sinusóides (Figura 7A), formando fileiras ao longo dos mesmos. Os sinusóides originam-se da margem do lóbulo e seguem entre as placas de hepatócitos para convergir para a vênula hepática terminal. As células endoteliais que revestem os sinusóides (Figura 10A) são facilmente distinguidas dos hepatócitos por seu núcleo condensado, achatado, fusiforme e com citoplasma pouco corado. O parênquima hepático

apresenta vasos de diferentes tamanhos distribuídos por toda sua extensão. (Figura 7C).

Os ramos terminais da artéria hepática e veia porta hepática estão localizados nos ângulos formados por lóbulos vizinhos em um espaço chamado, espaço porta (Figura 8E). Do espaço porta, o sangue converge para uma vênula hepática terminal (vênula centrolobular) de cada lóbulo através de sinusóides que passam entre lâminas de hepatócitos (Figura 7B). As vênulas hepáticas terminais drenam para a veia hepática. Os ductos biliares são identificados com facilidade (Figura 7A). Estes se apresentam de tamanho variável, revestidos por epitélio cúbico ou cilíndrico e geralmente estão associados a veias distribuídas pelo parênquima hepático. Na figura 8D, é possível observar a disposição do tecido conjuntivo nesta estrutura.

Os indivíduos do grupo exposto ao MeHg (Figura 7G) apresentaram hepatócitos com baixa acidofilia e contornos celulares fortemente corados. No entanto esta característica variou entre os indivíduos do mesmo grupo. Esta coloração na periferia dos hepatócitos deve-se à presença do retículo endoplasmático granular (REG) o qual distribui-se geralmente ao longo das membranas e ao redor do núcleo, corando fortemente os contornos celulares, característica comum no tecido desta espécie e de outros teleósteos já estudados.

Depois dos 70 dias de exposição ao mercúrio, o índice de lesão calculado para cada indivíduo (Figura 5) apresentou-se mais elevado nos indivíduos expostos que no grupo controle, refletindo o conjunto das alterações observadas no tecido. Foram encontradas áreas com tecido alterado (Figura 8C), dentre estas algumas áreas com características necróticas (Figura 7D; 10C). Estas áreas geralmente estão acompanhadas de infiltração leucocitária e por centros de melanomacrófagos (Figura 7D; 7E), no entanto alguns indivíduos também demonstraram infiltração leucocitária (Figura 7F) e centros de melanosmacrófagos isoladamente (Figura 7G).

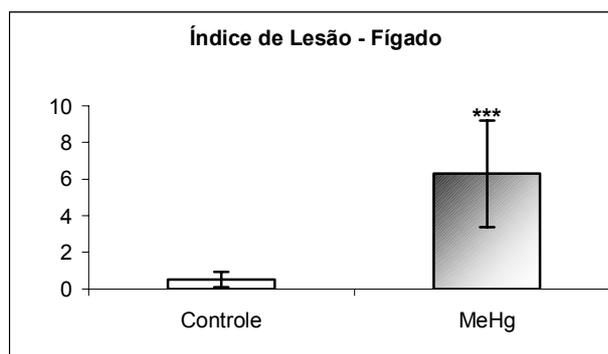


Figura 5 - Índice de lesão (BERNET et al., 1999) no fígado de *Hoplias malabaricus*, após exposição ao metilmercúrio (média \pm erro da média).

4.5.2 Organização estrutural do rim posterior de *Hoplias malabaricus*

Através dos cortes histológicos obtidos de Rim posterior, observou-se que na traíra este é composto por túbulos e ductos coletores, glomérulos bem desenvolvidos e distribuídos no parênquima renal (Figura 9A). Em meio a estas estruturas, observamos células sanguíneas preenchendo os espaços do parênquima e alguns centros de melano-macrófagos no parênquima renal.

Nenhuma alteração morfológica foi observada no rim posterior dos indivíduos expostos ao MeHg. A morfologia dos túbulos, glomérulos, cápsula de Bowman e espaço glomerular foram analisados e apresentam-se sem alterações evidentes (Figura 9B).

4.5.3 Organização estrutural do rim anterior de *Hoplias malabaricus*

No rim anterior de indivíduos do grupo controle, observou-se que o parênquima possui um aspecto heterogêneo, o qual é composto por diferentes tipos celulares. Pequenos grupos de eritrócitos são vistos em pequenos capilares, caracterizando um tecido altamente irrigado. Estes capilares estão em meio a uma grande diversidade de leucócitos e células indiferenciadas (Figura 9C). Observa-se também a presença de centros de melano-macrófagos (Figura 9E). Dispostas entre as células do parênquima, encontram-se as células interrenais ao redor de veias

cardinais, formando duas ou três camadas de células, onde o núcleo é central e o nucléolo evidente (Figura 9E). As células cromafins são encontradas entre as células interrenais (Figura 9C) ou entre as células do tecido hemocitopoiético, próximo as interrenais. Sua acidofilia é bastante alta em relação a estas células, permitindo desta forma sua localização com facilidade.

O tecido interrenal e as células cromafins dos indivíduos do grupo exposto ao metilmercúrio, não apresentaram alterações evidentes em relação aos controles, porém depois da exposição ao mercúrio, o índice de lesão calculado para cada indivíduo (Figura 6) apresentou-se mais elevado nos indivíduos expostos que no grupo controle, refletindo o conjunto das alterações observadas neste tecido.

Áreas de necrose foram identificadas no rim anterior (Figura 9D; 9F; 10B), estas áreas estão dispersas no tecido e apresentam centros de melano-macrófagos e melano-macrófagos livres (Figura 9D; 10B), além de leucócitos.

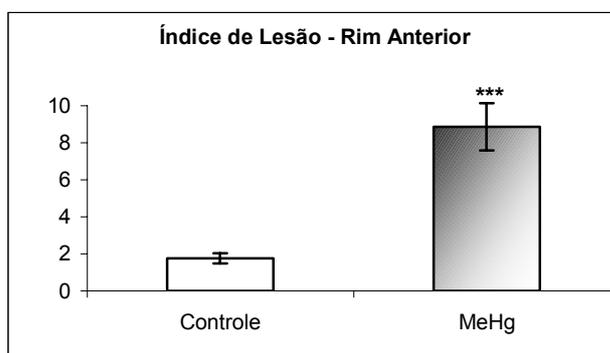


Figura 6 - Índice de lesão (BERNET et al., 1999) em rim anterior de *Hoplias malabaricus*, após exposição ao metilmercúrio (média ± erro da média).

4.6 Análises ultraestruturais

4.6.1 Organização ultraestrutural do fígado de *Hoplias malabaricus*

As observações ultraestruturais revelam que tanto os indivíduos do grupo controle quanto do grupo contaminado apresentam estruturas básicas dos hepatócitos. Estas células têm formato aproximadamente hexagonal, núcleo único

que tende ser esférico e central, eucromatina clara e homogênea e heterocromatina bastante reduzida, confirmando a alta atividade metabólica desta célula. No grupo controle, a ultraestrutura da interface entre dois hepatócitos (Figura 11B), revela o estreito espaço intercelular entre os hepatócitos. É evidenciada também a nítida associação do retículo endoplasmático granular com a membrana plasmática do hepatócito. Entre as lamelas do REG encontram-se distribuídas várias mitocôndrias de diferentes tamanhos e formas (Figura 11A; 11B). Agregados de grânulos de glicogênio são observados espalhados no citoplasma (Figura 11B). Outra característica dos hepatócitos de traíra é a formação de canalículos biliares que se organizam a partir de dois a quatro hepatócitos (Figura 11E). Observa-se a superfície apical dos hepatócitos voltada para o canalículo biliar, que apresenta vários microvilos digitiformes em seção transversal e/ou longitudinal. A estrutura do canalículo é mantida por desmossomos que selam a região baso-lateral superior dos hepatócitos (Figura 11E).

A ultraestrutura da região perinuclear dos hepatócitos das traíras controles (Figura 11A) apresenta um único nucléolo eletrodense e eucromatina abundante, a heterocromatina apresenta uma distribuição maior na periferia da organela. São observadas regiões equivalentes aos complexos protéicos que formam os poros nucleares (figura 11A). Próximo ao núcleo encontra-se mitocôndrias e o REG. Na interface do fígado com o sangue é observado o espaço de Disse (Figura 11C; 11D), região onde os hepatócitos entram em contato com as células endoteliais. Nesta região a superfície dos hepatócitos apresenta microvilos (Figura 11D) e as células endoteliais fenestras (Figura 11C), o que otimiza as trocas entre o parênquima hepático e a luz do sinusóide. Mitocôndrias e REG frequentemente estão presentes no citosol voltado ao espaço de Disse. Vesículas com material eletrodense são observados no citoplasma (Figura 11F).

A ultraestrutura dos indivíduos expostos ao Metilmercúrio também evidencia a associação do retículo endoplasmático rugoso com a membrana plasmática dos hepatócitos e deste com as várias mitocôndrias encontradas no parênquima (Figura 12B), porém nestes indivíduos observa-se uma tendência de diminuição do número de organelas no citoplasma destas células, seguido de uma desorganização do retículo, o qual apresenta-se muitas vezes concentrado em regiões específicas da

célula, caracterizando uma completa desorganização celular. Alterações morfológicas dos núcleos dos hepatócitos foram recorrentes como perda de esfericidade (Figura 12C). Ocorre também aumento de vesículas lipídicas espalhadas pelo citoplasma (Figura 12F).

Outro fato importante é que podemos observar eritrócitos e glóbulos brancos invadindo o tecido hepático por diapedese (Figura 12E; 12G). Este fato pode estar relacionado à intensa migração destas células para o parênquima, possivelmente devido a uma resposta inflamatória recorrente da presença do contaminante.

No espaço de Disse (Figura 13A) é possível observar uma tendência de redução dos microvilos dos hepatócitos contaminados com MeHg (Figura 13C), necroses (Figura 12H; 13B) e vacuolização das células endoteliais (Figura 13B; 13D), demonstrando que o tecido apresenta-se bastante afetado pela presença do contaminante nas células próximas aos sinusóides.

4.6.2 Organização ultraestrutural do rim anterior de *Hoplias malabaricus*

As observações ultraestruturais do rim anterior das traíras controles e contaminadas, revelam que o parênquima como já observado na microscopia de luz, possui um aspecto heterogêneo, o qual é composto por diferentes tipos celulares (Figura 14A). Apresenta leucócitos do tipo eosinófilos (Figura 14B), neutrófilos (Figura 14E), linfócitos (Figura 14A), além de trombócitos (Figura 14B), eritrócitos (Figura 14D; 14E; 15C) e uma grande quantidade de células indiferenciadas (Figura 15A; 15B).

As análises ultraestruturais do rim anterior dos indivíduos expostos ao Metilmercúrio revelam que o parênquima sofreu algum dano. Uma alteração evidente é que as células aparecem mais espalhadas no parênquima (Figura 15A; 15B), presença de algumas áreas de necrose (Figura 15D; 15G) e um aumento das áreas fagocíticas (Figura 15H). Observa-se ainda a presença de algumas células atípicas não encontradas no material do grupo controle como: células ou estruturas eletrodensas mostrando a presença de várias “vesículas” ou projeções citoplasmáticas de formato vesicular e células grandes apresentando regiões

regulares de heterocromatina, confundindo-se com células em processo de morte celular (Figuras 15E;15F).

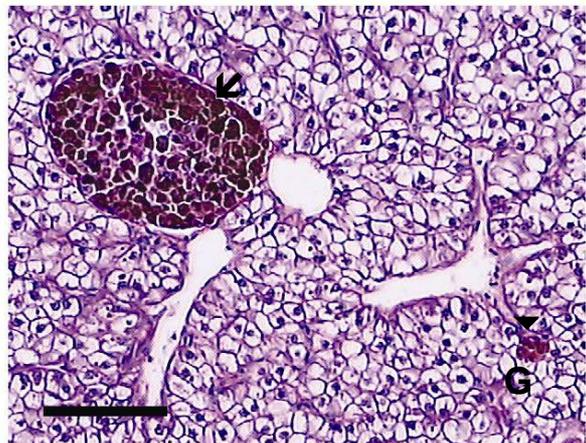
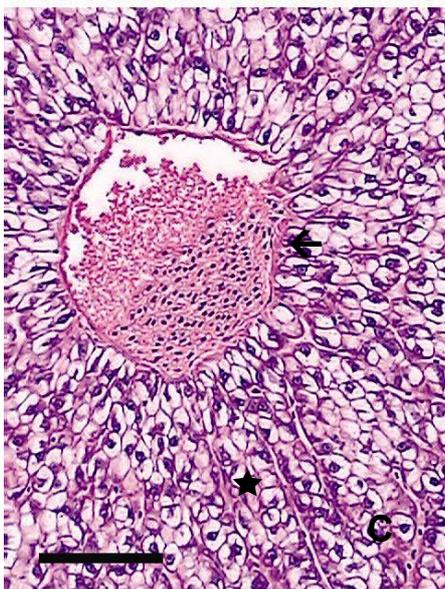
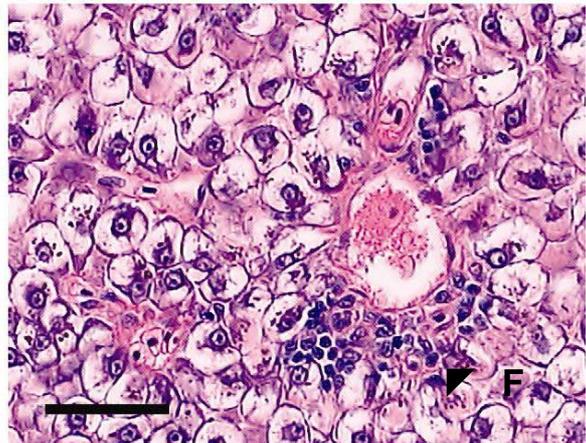
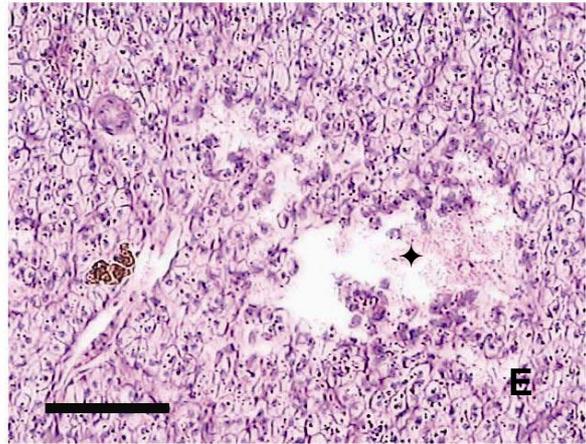
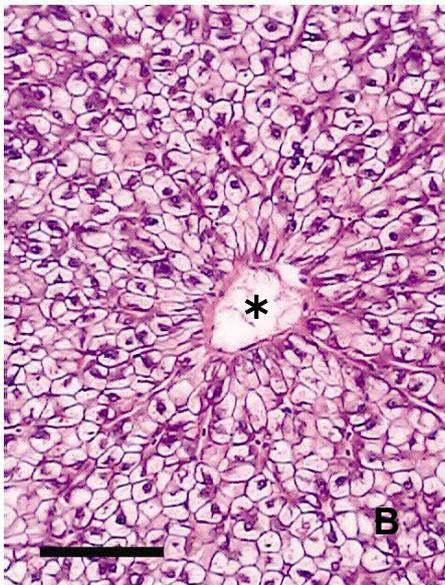
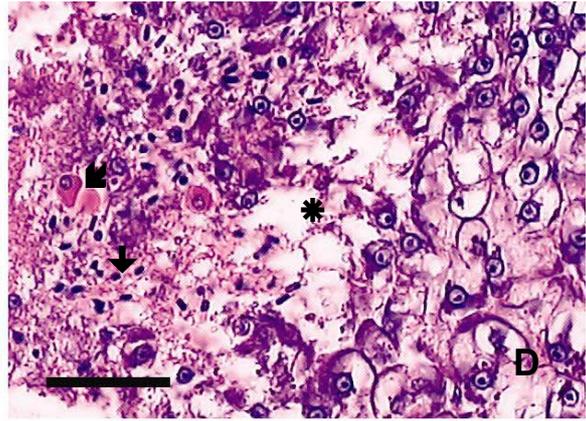
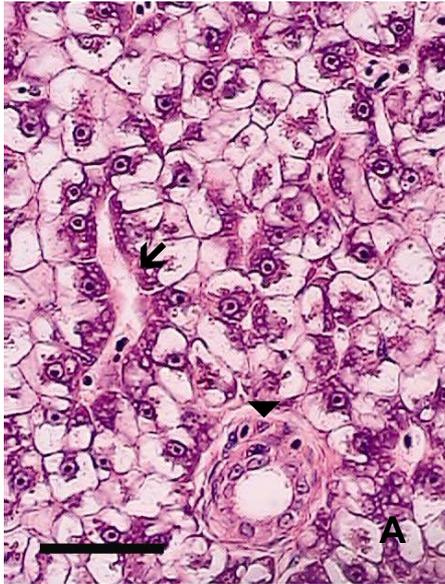


Figura 7 - Organização estrutural do fígado de *Hoplias malabaricus*. A (controle) - sinusóide (↙), ducto biliar (▼); B (controle) – veia centro lobular (*); C (controle) - parênquima hepático (★), vaso (←); D (MeHg) - área de necrose (*), leucócitos (↓), eritrócitos (↙); E (MeHg) – necrose (◆); F (MeHg) – infiltração leucocitária (▀); G (MeHg) – Centro de melano-macrófago (↙), melano-macrófagos livre (▼). Escalas A ; D e F- 100µm, B; C; E e G - 50 µm. Coloração H.E.

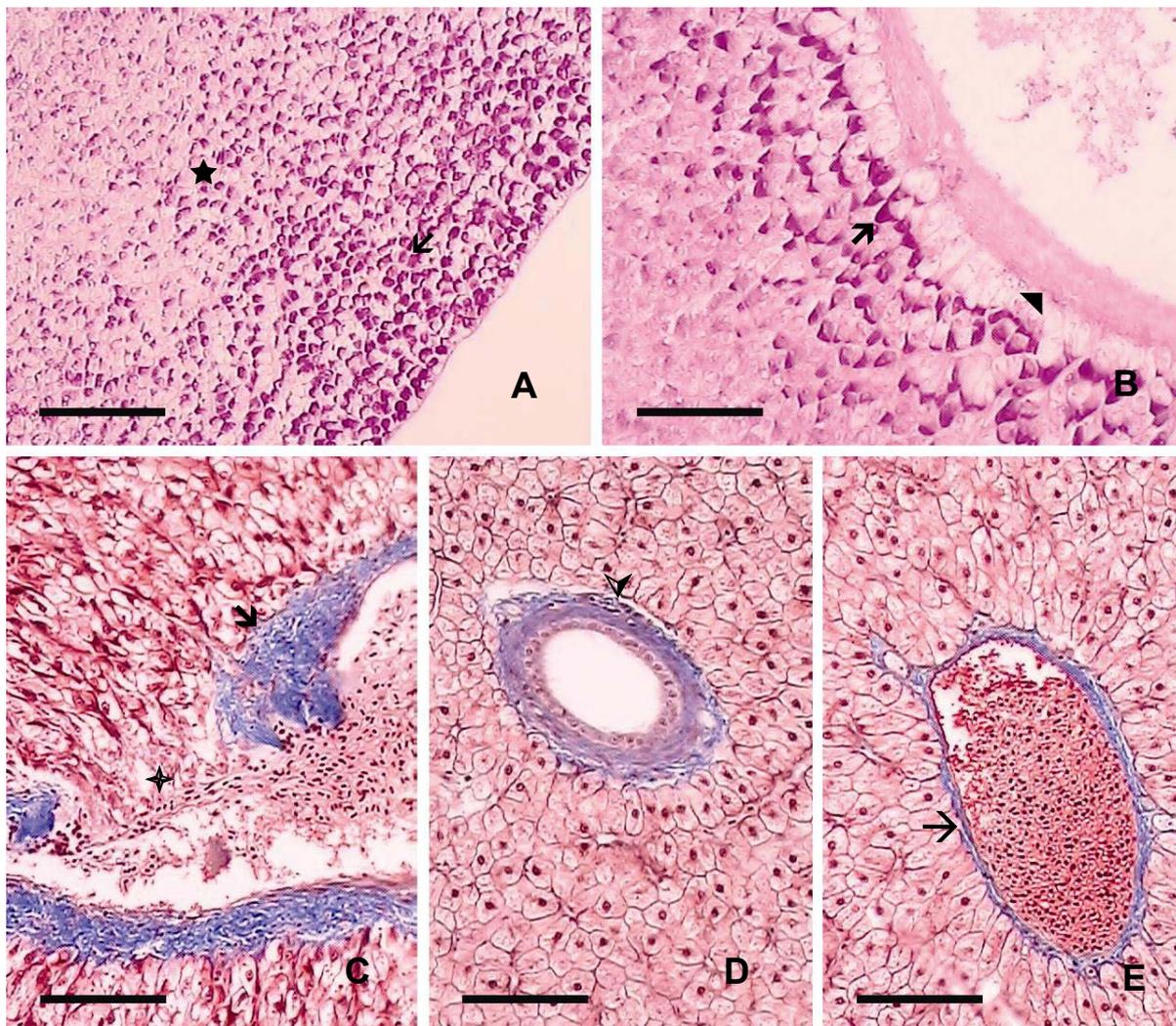


Figura 8 - Organização estrutural do fígado de *Hoplias malabaricus*. A (controle) – hepatócitos com acúmulo de glicogênio (↵), parênquima hepático (★); B (MeHg) - glicogênio (↗), vaso (▼). Escalas: A – 100 µm, B- 50 µm. Coloração PAS. C (MeHg) – área com tecido alterado (✦), tecido conjuntivo (▼); D (controle) – ducto biliar com evidência de tecido conjuntivo (▼); E (controle) – espaço porta (→). Escalas: C, D e E – 50 µm. Coloração: Tricrômico de Mallory.

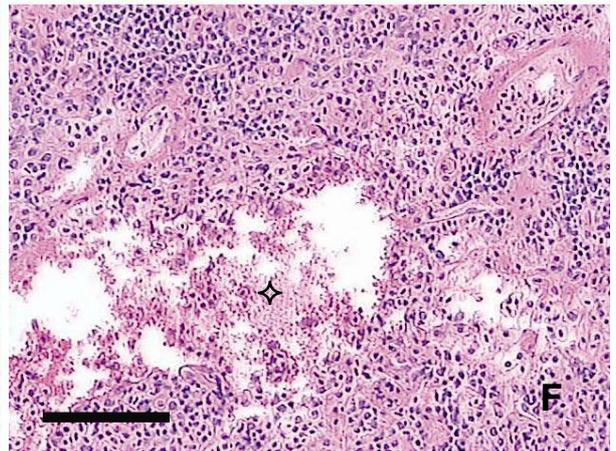
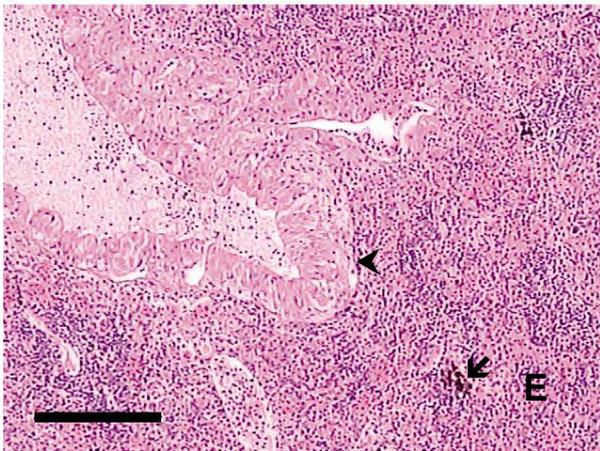
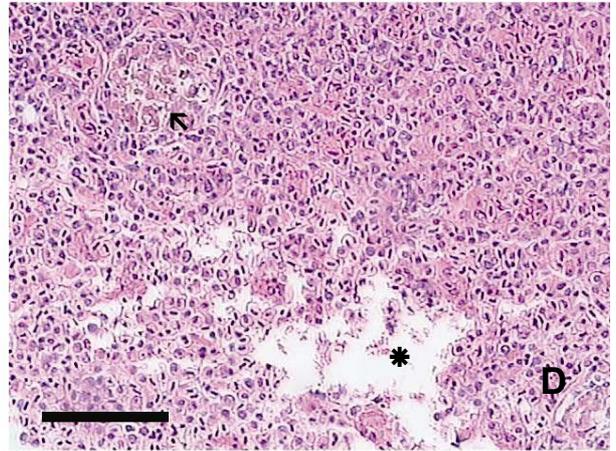
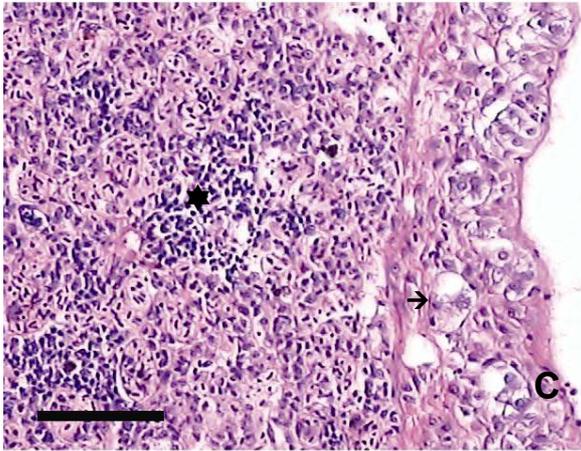
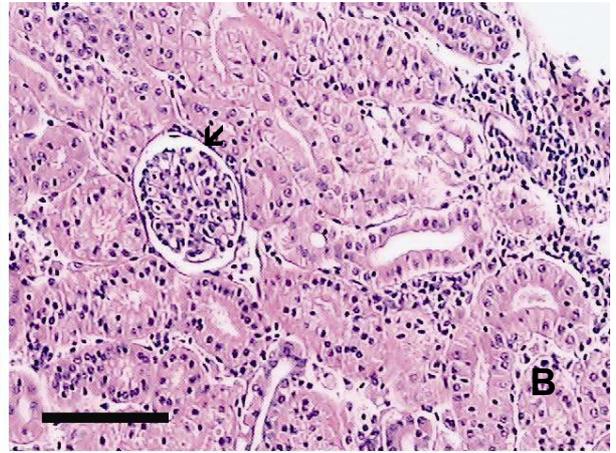
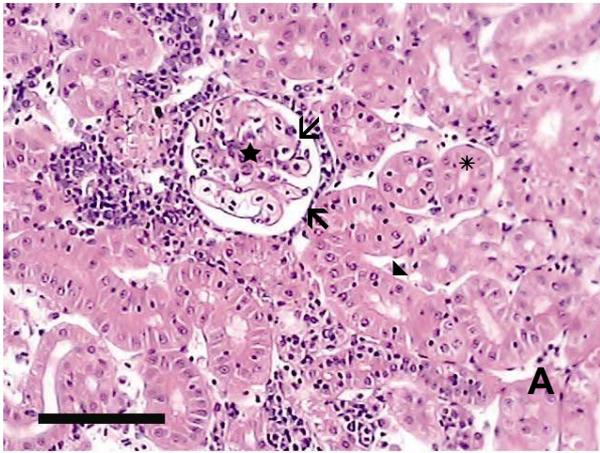


Figura 9 - Organização estrutural do rim posterior de *Hoplias malabaricus*. A (controle) – glomérulo (☞), espaço glomerular (⌞), cápsula de Bowman (★), ducto coletor (*), túbulo (▲); B (MeHg) – glomérulo (☞). Escalas: A e B – 50 µm. Coloração: H.E.

Organização estrutural do rim anterior de *Hoplias malabaricus*. C (controle) – parênquima renal (★), células cromafins (→); D (MeHg) – centro de melano-macrófago (☞), área de necrose (*); E (controle) - arranjo das células interrenais, dispostas ao redor de uma veia (◀), centro de melano-macrófagos (☞); F (MeHg) – presença de várias áreas de necrose ditribuídas pelo tecido (◇). Escalas: C, D e F – 50 µm, E – 100 µm. Coloração: H.E.

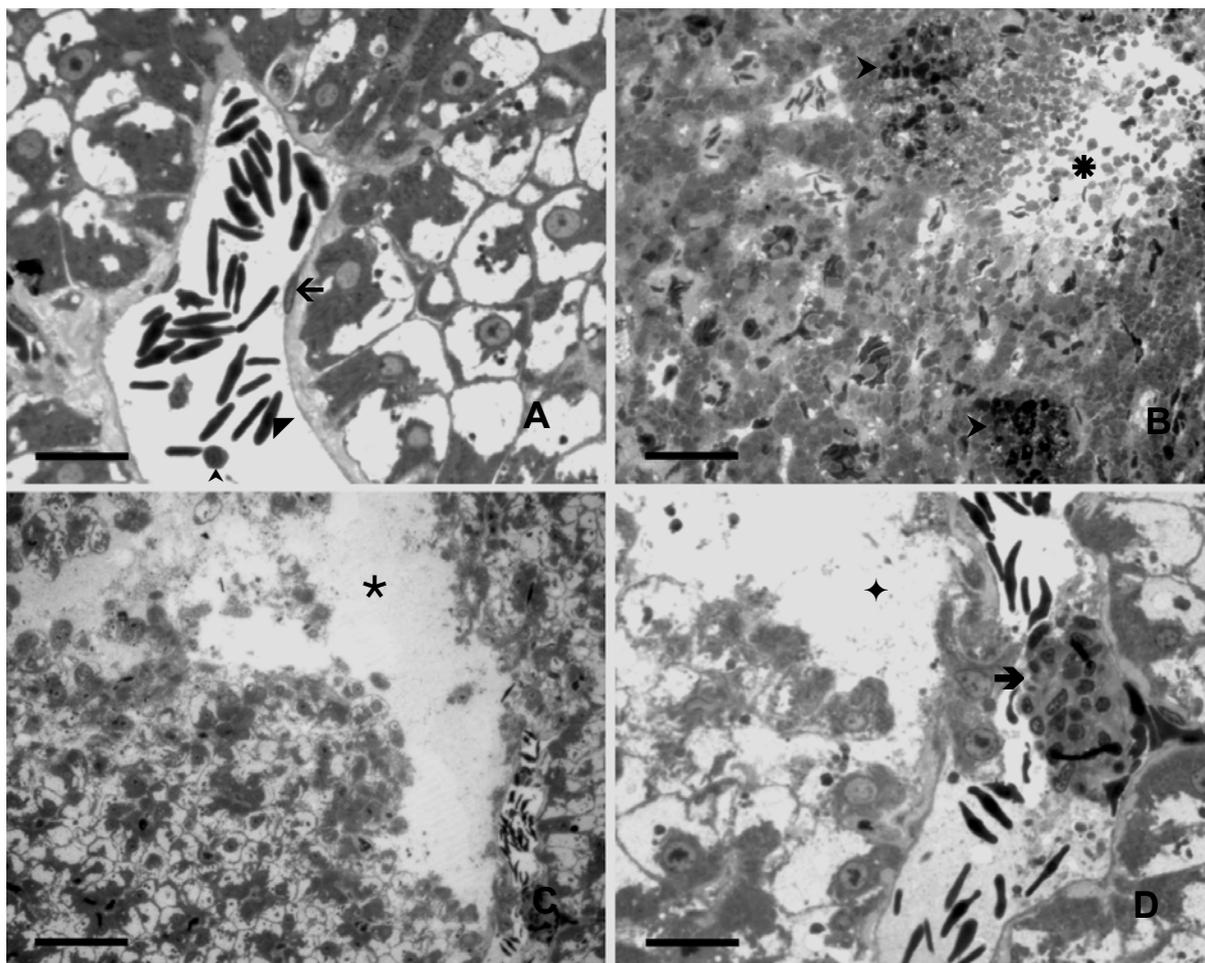


Figura 10 - Organização estrutural de fígado de *Hoplias malabaricus*. A (controle) - célula endotelial (←), eritrócitos (▶), leucócito (▲); C (MeHg) - necrose (★); D (MeHg) – centro de melano macrófago (→) próximo à área de necrose (◆). Escalas: A e D – 160 µm, C – 50 µm. Coloração: Azul de toluidina borificada.

Organização estrutural do rim anterior de *Hoplias malabaricus*. B (MeHg) – área necrosada (★), centros de melano-macrófagos (▶). Escala: 50 µm. Coloração: Azul de toluidina borificada.

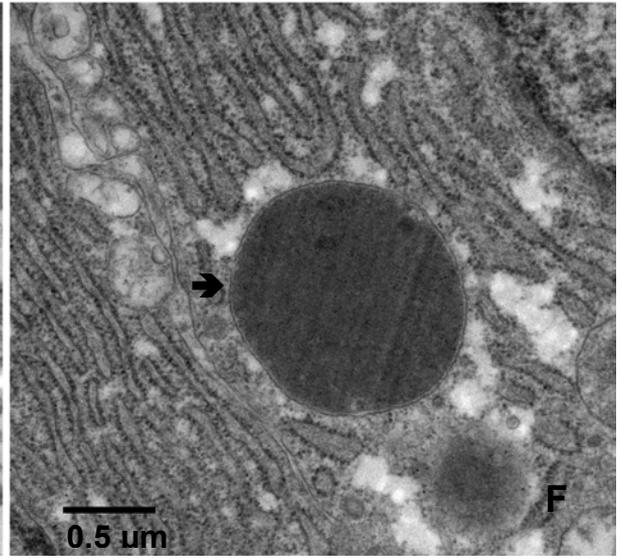
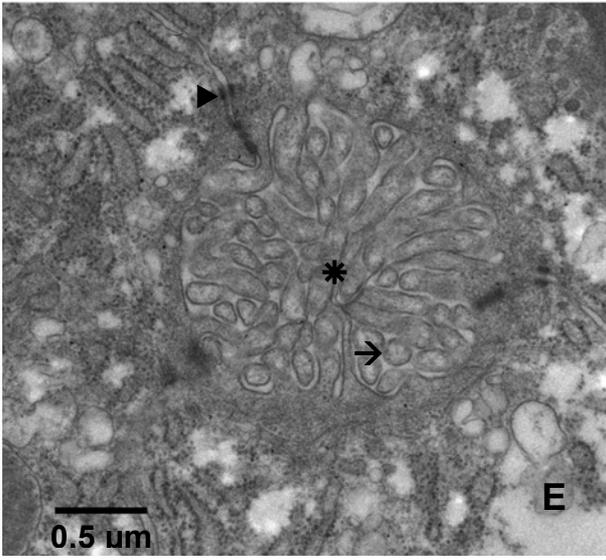
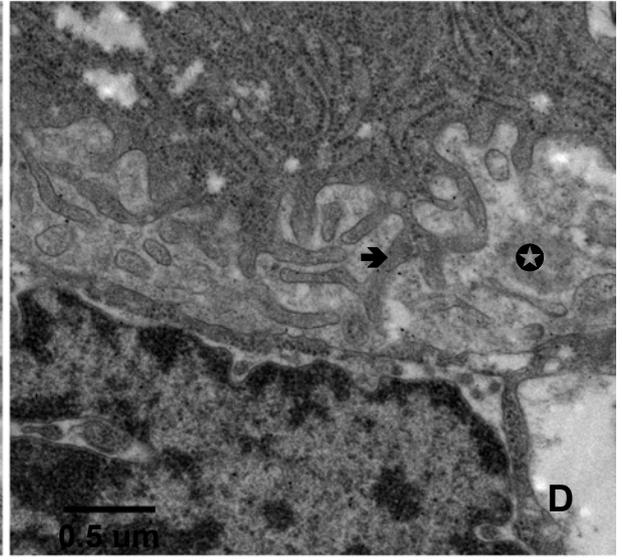
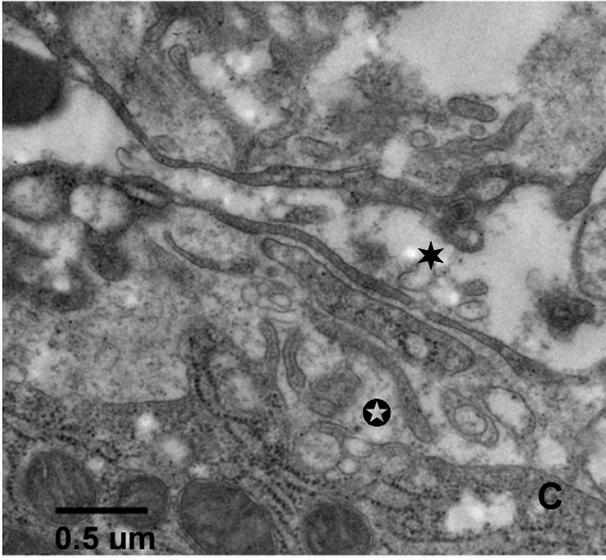
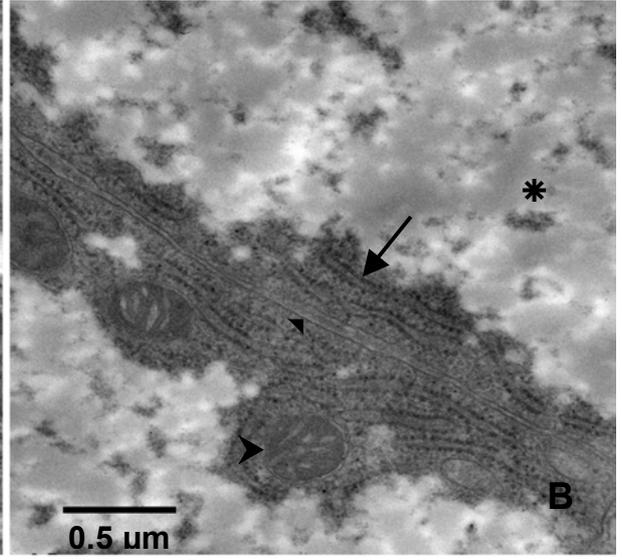
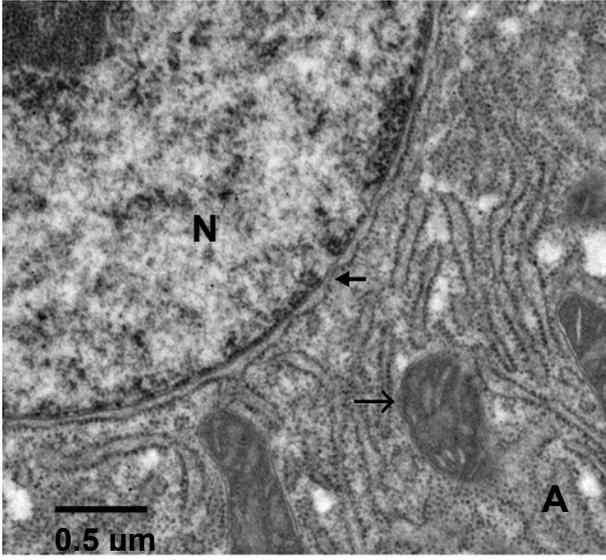


Figura 11 - Organização ultraestrutural do Fígado de *Hoplias malabaricus*. Controles. A – núcleo (N), poros nucleares (←), mitocôndria (→); B – membrana do hepatócito (▼), retículo endoplasmático granular (▶), mitocôndria (▶), glicogênio (*); C – espaço de Disse (⊕), luz do sinusóide (*); D – espaço de Disse (⊕), prolongamentos dos hepatócitos (➔); E – canalículo biliar (*), microvilos digitiformes do canalículo (→), desmossomos (▶); F – vesícula citoplasmática contendo material eletrodenso desconhecido (➔).

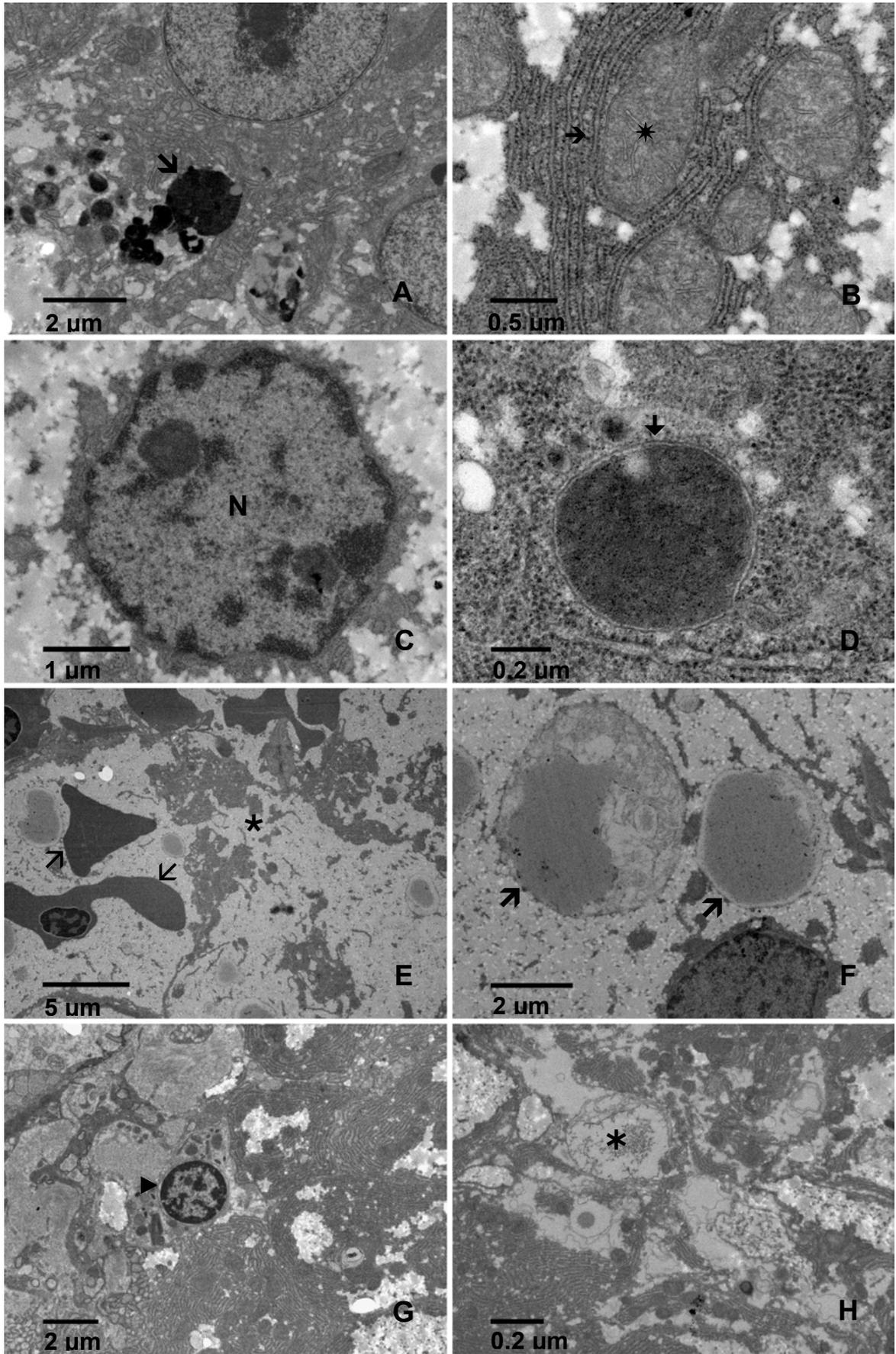


Figura 12 - Organização ultraestrutural do fígado de *Hoplias malabaricus*. MeHg. A – estrutura eletrodensa desconhecida (⚡); B – retículo endoplasmático granular (→), mitocôndria envolta por retículo (*); C – núcleo com perda da tendência à esfericidade (N); D - vesículas eletrodensas (⚡); E – hepatócitos em necrose (*), eritrócito invadindo o tecido do fígado por diapedese (↗); F – vesículas lipídicas (↗); G – leucócito invadindo o parênquima hepático (▶). H – área de necrose (*).

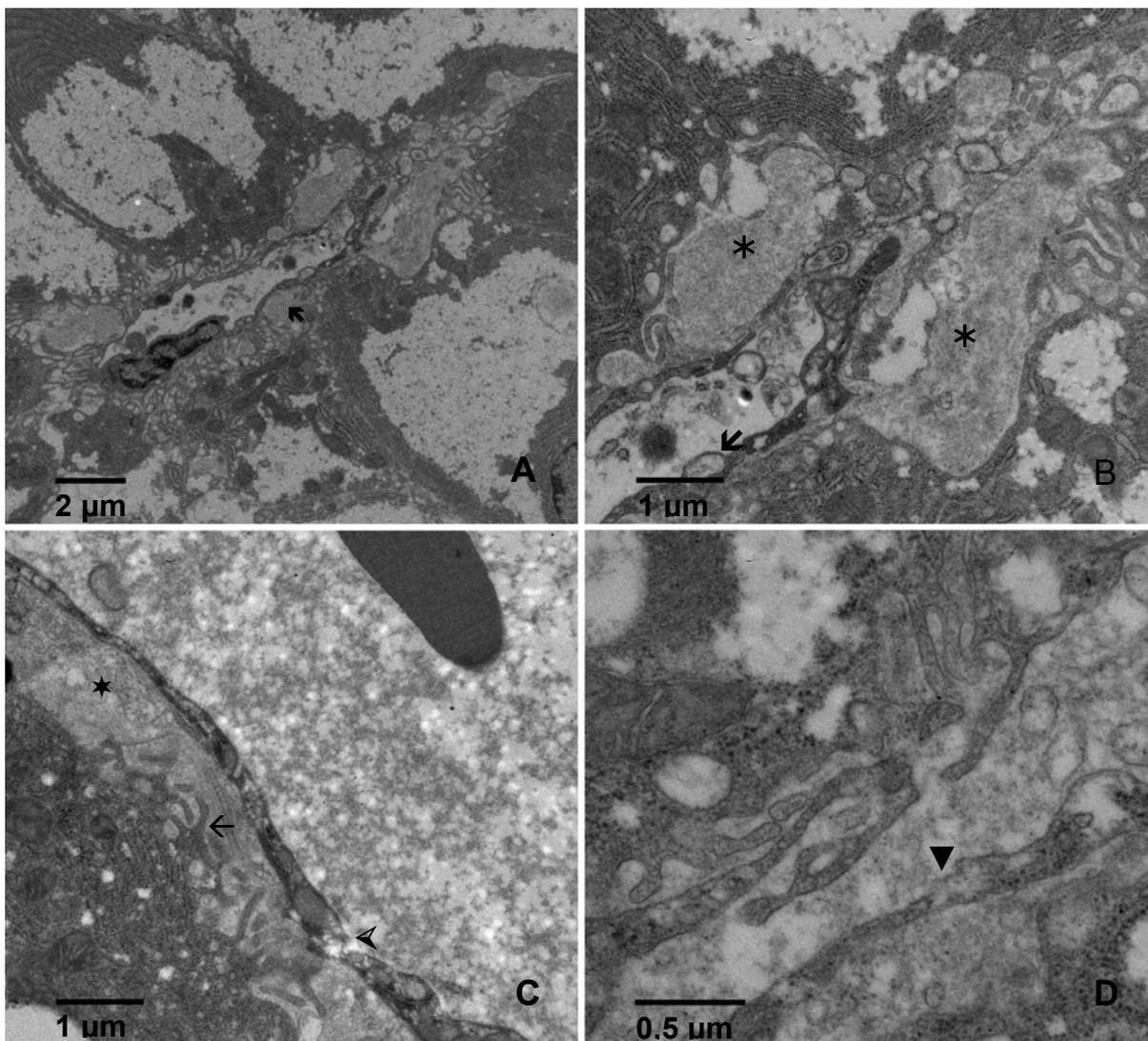


Figura 13 - Organização ultraestrutural do fígado de *Hoplias malabaricus*. MeHg. A – estreito espaço intercelular entre os hepatócitos e as células endoteliais - Espaço de Disse (↗); B – áreas de necrose no espaço de Disse(*), vacuolização das células endoteliais (↘); C – rompimento das células endoteliais (↘), espaço de Disse (*) projeções dos hepatócitos (←); D célula endotelial vacuolizada (▼).

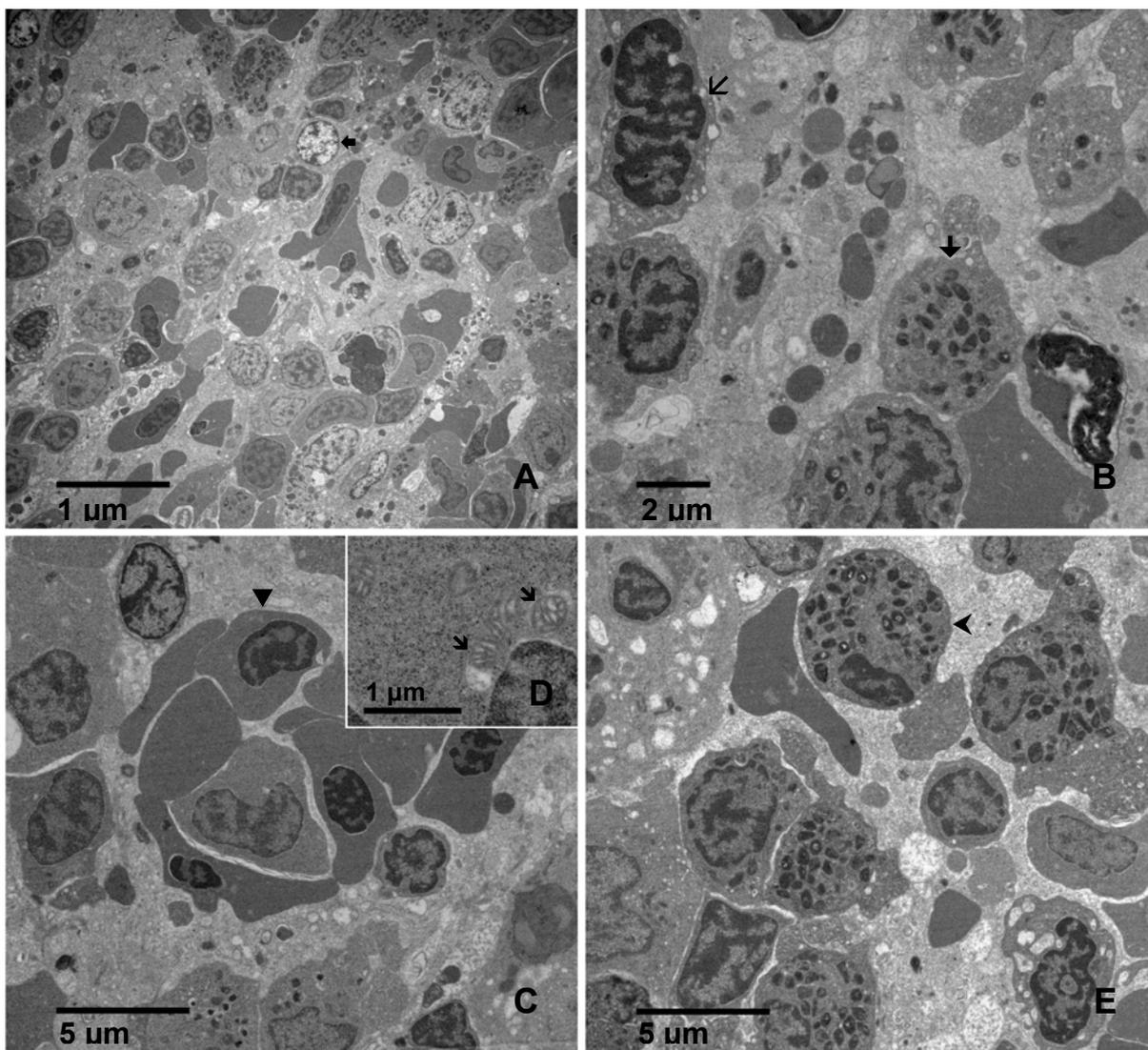


Figura 14 - Organização ultraestrutural do rim anterior de *Hoplias malabaricus*. Controles. Observar a diversidade de células – A linfócito (◄); B - trombócito (◄), eosinófilo (◄); C – grupo de eritrócitos (◄); D – detalhe de mitocôndria de eritrócito em diferenciação (◄); E – neutrófilo (◄).

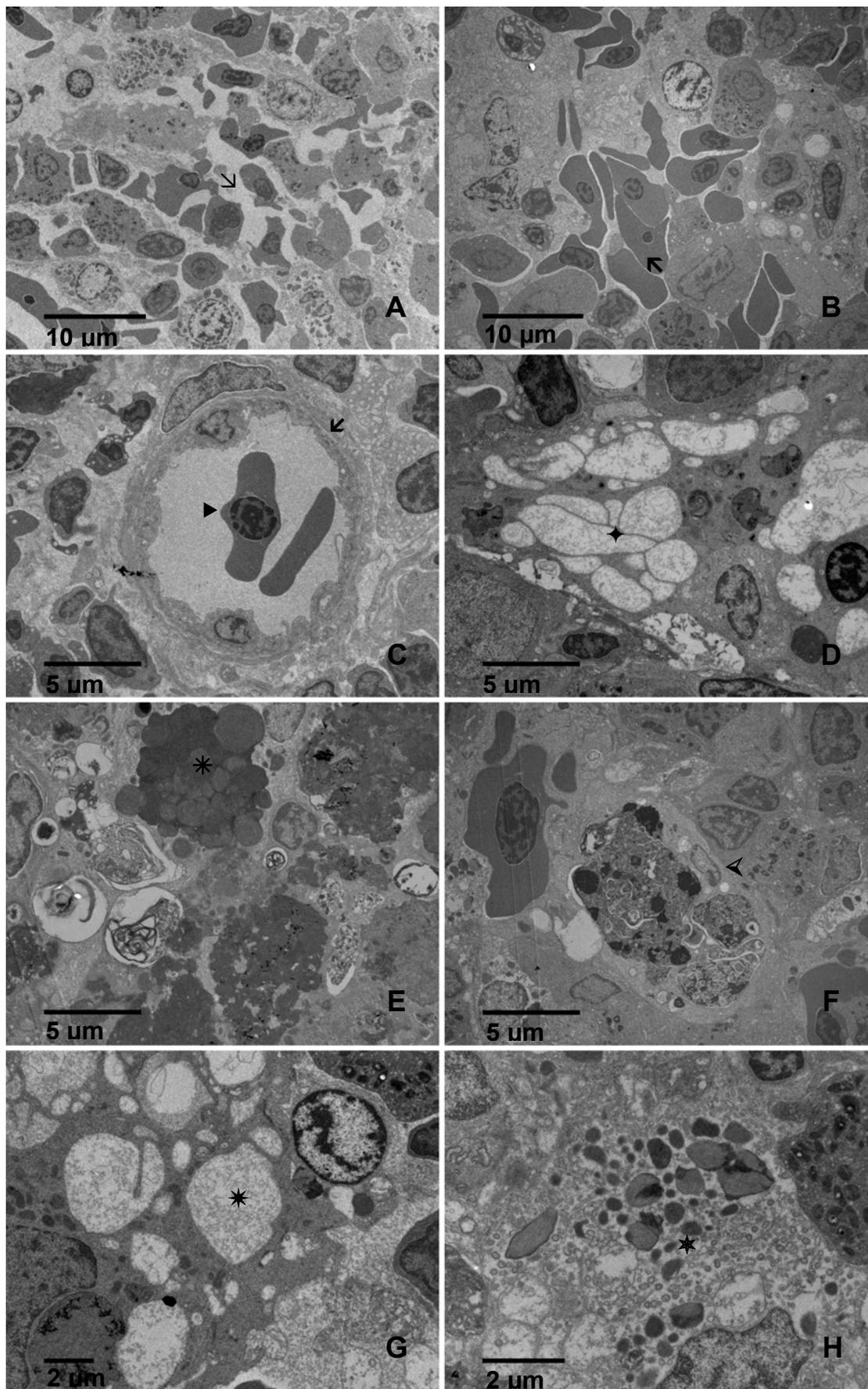


Figura 15 - Organização ultraestrutural do rim anterior de *Hoplias malabaricus*. MeHg. A – nítida separação entre as células (∟); B – grupo de eritrócitos(⬛); C- vaso sanguíneo (⬛), eritrócito (▶); D – área de necrose (✦); E – célula alterada e não identificada (*); F – região de alta atividade fagocítica (◀); G – área de necrose (*); H – área de alta atividade fagocítica (★).

5 DISCUSSÃO

A relação causa/efeito entre a presença de xenobiontes e lesões em peixes é difícil de ser estabelecida nos estudos toxicológicos, pois envolvem muitas variáveis ambientais e evolutivas (ICES, 1986). A interação entre a pesquisa de laboratório e a aplicação prática, relacionando os biomarcadores com os altos níveis de organização biológica, representam um desafio para os estudos de toxicologia ambiental atual e futuros (WESTER *et al.*, 1994; MOORE, 2002).

O metilmercúrio é absorvido e bioacumulado pelos peixes através da cadeia alimentar e/ou diretamente através da água ao longo do seu ciclo de vida. Assim peixes predadores apresentam uma concentração maior que aqueles de níveis tróficos inferiores (ASCHNER, 2002). De acordo com o mesmo autor, 75 a 95% de todo o mercúrio encontrado nos tecidos dos peixes encontra-se na forma de metilmercúrio. Assim, informações sobre os hábitos alimentares dos peixes são fatores importantes a serem avaliados nos processos de bioacumulação e concentração de mercúrio (BRADO *et al.*, 2000).

Muitos dados sobre o acúmulo de mercúrio em peixes de climas temperados têm sido relatados, porém dados sobre peixes de climas tropicais ainda são escassos e no Brasil concentra-se em algumas regiões onde este metal é mais amplamente utilizado, como a região norte do país na extração do ouro. Sendo assim, no Brasil muitos autores têm utilizado o músculo de peixes para verificar o nível de mercúrio encontrado nesses animais, inclusive em *Hoplias malabricus* (PFEIFFER *et al.*, 1989; BRADO *et al.*, 2000). Em estudos realizados por BRADO *et al.* (1999), para verificar a concentração de metilmercúrio em peixes consumidos pela população indígena do Pará, este observou que a traíra é a segunda espécie de peixe mais consumida, ficando também com o segundo lugar na concentração de metilmercúrio ($0.322 \mu\text{g.g}^{-1}$).

Os resultados da concentração de mercúrio em músculo e fígado demonstram que há uma tendência de aumento na concentração de metilmercúrio em ambos os tecidos analisados. Porém, esta não apresentou valores significativos em relação aos indivíduos do grupo controle. Isto pode estar relacionado com o tempo de exposição ao metilmercúrio utilizado neste trabalho, uma vez que o tempo e a dose

podem não ter sido suficientes para se observar um acúmulo significativo nestes animais. Os resultados de bioacumulação aqui apresentados mostram que as concentrações encontradas nos exemplares expostos estão muito abaixo do limite máximo estabelecido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para consumo humano.

A função das células sanguíneas em peixes ainda não está completamente elucidada, os trabalhos encontrados na literatura, na grande maioria, referem-se a peixes de clima temperado. Desta forma os resultados nem sempre podem ser comparados aos de nossas espécies (RANZANI-PAIVA, 1995, RANZANI-PAIVVA *et al.*, 2000). Assim sugere-se que futuros estudos devam ser realizados antes de utilizar este parâmetro para avaliar o efeito de poluentes na saúde dos peixes nativos do território brasileiro.

Uma das dificuldades no estabelecimento do estado hematológico em populações naturais de peixes tem sido a escassez de referências seguras das condições sanguíneas “normais”. AFFONSO *et al.* (2002), relata o uso de parâmetros hematológicos como um biomarcador aceitável nos estudos da saúde de peixes. Entretanto, sugere que a hematologia deve ser usada em conjunto com outros biomarcadores, com o objetivo de verificar e melhorar a adaptabilidade das respostas em peixes.

Por outro lado, o conhecimento da composição do sangue é de fundamental importância na avaliação da condição fisiológica dos peixes, pois, ocorre uma variação morfológica e quantitativa dos elementos sanguíneos frente às condições endógenas, como: sexo (RANZANI-PAIVA & GODINHO, 1983), estágio de maturação gonadal (MANAJAN & DHEER, 1979), idade (BOYAR, 1962), peso e comprimento (PITOMBEIRA *et al.*, 1968), estado nutricional (SPECKNER *et al.*, 1989; COLE *et al.*, 2000; RIOS, 2001), doenças (MANAHAM, 1991) e atividade muscular (HEATH, 1987); ou frente a condições exógenas, como: temperatura (PANDEY, 1977; PICKERING, 1996), concentrações de CO₂ e O₂ dissolvidos (AMADIO, 1985), presença de amônia (COLE *et al.*, 2000), ciclo sazonal (MANAJAN & DHEER, 1979), estresse (SOIVIO *et al.*, 1976) e poluentes (AFFONSO *et al.*, 2002). AFFONSO *et al.* (2002), adiciona que o sistema endócrino controla o sistema imunológico nos peixes, lembrando que o estudo de danos hematológicos

encontrados sem a investigação de outros parâmetros poderia não ser representativo.

Ainda assim, as variações do quadro hemático podem depender também das condições ecológicas das espécies. Neste aspecto, os ecólogos têm-se voltado, cada vez mais para investigações fisiológicas, no sentido de melhor compreender como os organismos estão adaptados aos seus ambientes (RANZANI-PAIVA & GODINHO 1983).

Em peixes, assim como em outros vertebrados, as células do sangue possuem importantes funções no controle de doenças infecciosas, e sendo assim, alterações observadas no sangue periférico de diversos grupos animais têm sido bastante úteis no diagnóstico de certas doenças. Além disso, segundo AFFONSO *et al.* (2002), peixes expostos a xenobiontes podem apresentar também alterações nos valores hematológicos.

Segundo RANZANI-PAIVA & GODINHO (1983); RANZANI-PAIVA *et al.* (1987), os eritrócitos da traíra assemelham-se aos de outros teleósteos de água doce. Embora tenham sido observadas células imaturas (eritroblastos) no sangue periférico desta espécie, as análises realizadas no presente estudo revelaram que os eritrócitos circulantes de *H. malabaricus* são em sua maioria maduros. Segundo DACIE & LEWIS (1963), a contagem do número de eritrócitos é bastante usada em pesquisas hematológicas, mas dificilmente é feita sem erro.

Para BALLATORI (1991), no sangue, o mercúrio inorgânico tem distribuição igual entre células e plasma, já o MeHg acumula-se preferencialmente nas células. Essa alta afinidade do MeHg pelas células do sangue tem sido observada em outras espécies de peixes (CLARKSON, 1972; FRIBERG & VOSTAL, 1972), sendo os eritrócitos os elementos responsáveis pela concentração do metal neste tecido (FRIBERG & VOSTAL, 1972). No entanto, MANAHAM (1991), confirma estes dados também para outros metais demonstrando que o sangue pode ser um grande sítio de acúmulo de metais tóxicos no organismo. GIBLIN & MASSARO (1975), observaram que na truta, e em outras espécies de teleósteos, os eritrócitos acumulam MeHg rapidamente e em altas concentrações. Isto sugere que o acúmulo aparentemente seja mediado pela alta concentração de grupos sulfidrila presente nestas células. Há de considerar ainda que a entrada do MeHg nas células pode

também estar sendo facilitada pelas características químicas do composto, o qual apresenta propriedades lipossolúveis e pode ser facilmente carregado. Os mesmos autores sugerem ainda que a concentração do mercúrio encontrada nos eritrócitos de diferentes espécies poderia ser determinada pelo número de grupos sulfidrilas por molécula de hemoglobina. A hemoglobina da truta possui quatro grupos sulfidrilas por molécula pelos quais o MeHg tem alta afinidade. Já a hemoglobina de humanos, cavalos e coelhos apresentam apenas duas. Assim, os eritrócitos de diferentes espécies exibem variações de afinidade pelo mercúrio. Isto pode explicar as diferenças de toxicidade do mercúrio encontrada entre espécies (GIBLIN & MASSARO, 1975). Na truta portanto, a molécula de hemoglobina aparentemente funciona como a principal proteína transportadora de metilmercúrio, transportando cerca de 90% deste organometal e também transferindo MeHg para grupos SH localizados em outras células (GIBLIN & MASSARO, 1975). No entanto, ao contrário do que se imagina, a ligação do MeHg com a hemoglobina não neutraliza sua toxicidade, e sim aumenta seus efeitos tóxicos, uma vez que facilita a distribuição do xenobionte para os tecidos, visto que esta ligação MeHg-hemoglobina é reversível (GIBLIN & MASSARO, 1975).

Tais observações sugerem que uma parte do mercúrio liberado pode não ser excretado imediatamente, e sim retido pela hemoglobina e redistribuído novamente para os tecidos, o que acaba resultando em um longo tempo de permanência do MeHg no organismo (FRIBERG & VOSTAL, 1972; GIBLIN & MASSARO, 1975).

Nenhuma relação foi encontrada na literatura referente à ligação Hemoglobina-MeHg e alterações no transporte de oxigênio. No entanto, considerando que a ligação do mercúrio à hemoglobina possa prejudicar de alguma forma a função da molécula, a presença do metal na corrente sanguínea dos peixes expostos ao metilmercúrio poderia conseqüentemente induzir o aparecimento de mais eritrócitos, na tentativa de suprir o provável prejuízo no transporte de oxigênio para as células e tecidos. Segundo AFFONSO *et al.* (2002), o aumento no número de eritrócitos ocorre devido a um aumento na necessidade do sangue transportar oxigênio ou como resultado da contração esplênica, resposta comum ao estresse (HEATH, 1987; MOURA *et al.*, 1997). Estudos realizados por ALLEN (1994) com *Oreochromis aureus* durante intoxicação com mercúrio, mostra uma significativa

elevação do número de eritrócitos e de leucócitos depois de 24 horas de exposição. Mas como citadas anteriormente algumas variações são encontradas devido a fatores endógenos ou exógenos. Segundo RANZANI-PAIVA *et al.* (2000), altos valores no número de eritrócitos são características de peixes migratórios. Estes dados, no entanto não corresponde aos encontrados na traíra, espécie de hábitos sedentários, que apresenta valores relativamente altos quando comparados com peixes de outras espécies. No entanto a traíra é uma espécie que se locomove muito rapidamente no momento que sai a procura da presa, o que poderia confirmar parcialmente a hipótese de RANZANI-PAIVA *et al.* (2000). Outra hipótese é o fato desta espécie viver em locais onde a concentração de oxigênio é muito baixa e possuir uma grande área de superfície branquial.

RANZANI-PAIVA & GODINHO (1983), relacionaram o valor médio de eritrócitos com o estágio de maturação gonadal. Esta média é mais elevada entre os indivíduos jovens, diminuindo em direção aos estágios de maturação gonadal mais avançados, observando ainda, um menor número entre indivíduos esgotados. A variação da média do número de eritrócitos foi mais constante entre os machos nos diferentes estágios de maturação gonadal. Já entre as fêmeas notou-se um declínio bastante acentuado do jovem para o esgotado. Provavelmente, como relatam MANAJAN & DHEER (1979), isso se deve a maior atividade das fêmeas na época da desova. Neste experimento o parâmetro de estágio de maturação gonadal não foi levado em consideração, porém não se descarta a hipótese de que este possa ter influenciado nas respostas hematológicas da traíra no presente experimento, entretanto apenas estudos futuros com esta espécie poderiam esclarecer melhor esta questão.

RANZANI-PAIVA (1995), observou uma pequena tendência de elevação no Hematócrito, taxa de hemoglobina e número de eritrócitos com o aumento do tamanho dos exemplares estudados por este autor. AMADIO (1985), admite que os valores de eritrócitos aumentem na medida em que o peixe cresce, para atender a uma crescente necessidade metabólica, estabilizando-se quando os peixes são mais velhos e menos ativos. Observa-se que, apesar do aumento da atividade geral, com o crescimento do peixe há um ajuste no sentido de manter a homeostase do organismo.

O significativo aumento no número de eritrócitos das traíras contaminadas com metilmercúrio, conseqüentemente causou um aumento no valor do hematócrito. ALLEN (1994), também observou um hematócrito ligeiramente superior nos indivíduos expostos ao mercúrio inorgânico por uma semana sem que, no entanto, houvesse diferença entre eles. Embora o VCM indique um aumento no tamanho dos eritrócitos, o estudo de morfometria destas células não indicou alterações no seu tamanho (área) e forma (elongação e esfericidade). Analisando os demais dados, é possível concluir que o VCM está indicando um falso valor, possivelmente devido a uma variação relativa no número de eritrócitos que pode ter prejudicado o cálculo do referido índice. Um aumento real do VCM, sem aumento do HCM, certamente provocaria uma diminuição do CHCM, a qual não foi observada. Para AFFONSO et al. (2002), o aumento do VCM observado nos indivíduos expostos ao MeHg, provavelmente ocorreu devido ao mecanismo prolongado de reposição dos eritrócitos, resultando em uma ampla quantidade de eritrócitos velhos e grandes, refletindo um alto VCM. CARVALHO (1994) recomenda a comparação da morfologia dos eritrócitos na extensão sangüínea com os resultados dos índices hematimétricos, pois os considera como dados complementares.

Segundo RANZANI-PAIVA & GODINHO (1983), os índices hematimétricos também podem ser afetados pelo sexo, idade e peso do animal. Dos três índices o que apresenta um resultado mais preciso é o CHCM, que é calculado a partir da taxa de hemoglobina e hematócrito. Os outros índices VCM e HCM devem ser interpretados com algum cuidado, pois são ambos calculados a partir do número de eritrócitos, que como já foi discutido acima pode apresentar erros na sua estimativa. De acordo com WINTROBE (1934), o valor do VCM é sempre mais elevado nos peixes que nos mamíferos, devido ao maior tamanho dos glóbulos vermelhos, explicáveis pela presença de núcleo nos mesmos.

Uma vez que não houve alteração no tamanho dos eritrócitos (área), nem tampouco na quantidade de hemoglobina por célula (HCM), a elevação na concentração de hemoglobina por mL observada neste estudo pode ser um reflexo da diminuição no volume do plasma devido ao aumento do hematócrito. Provavelmente o organismo reagiu liberando mais eritrócitos no sangue periférico para que o transporte de oxigênio não fosse prejudicado. Essa liberação pode ter

ocorrido por contração esplênica (que ocorre de imediato), como dito anteriormente ou por eritropoiese (fenômeno que leva algumas semanas), sendo possível neste caso já que o experimento teve duração de 70 dias.

Em carpa (*Cyprinus carpio*) exposta ao Cobalto, FROVOLA, (1960) observou um aumento no número de eritrócitos e na concentração de hemoglobina, enquanto que o número de leucócitos diminuiu. O mesmo resultado foi observado em peixes expostos ao mercúrio inorgânico por 15 dias (PANDEY, 1977). Segundo KORZHUEV *et al.* (1982), para *Salmo salar*, há uma tendência clara de elevação de hemoglobina com o curso da ontogênese. Como regra os peixes jovens tem de 1,5 a duas vezes menos hemoglobina que os adultos, porque necessitam de um grande suprimento de energia durante a reprodução.

RANZANI-PAIVA & GODINHO (1983), em análises realizadas em diferentes estágios de maturação gonadal, mostraram que há um aumento da média da taxa de hemoglobina em peixes na época de reprodução, diminuindo nos estágios esgotado e repouso, ocasião na qual os peixes se encontram em menor atividade. Observação semelhante foi feita por PANDEY (1977), para *Heteropneustes fossilis*. Já, MANAJAN & DHEER (1979), verificaram que a taxa de hemoglobina das fêmeas de *Channa punctatus*, diminui na época da reprodução, permanecendo baixa durante esse período e apresentando valores mais altos após a desova.

Neste estudo, apenas o peso do peixe foi utilizado como uma covariável nas análises estatísticas, mostrando este não influenciar nos resultados. As outras variáveis como sexo, estágio de maturação e comprimento do animal não foram correlacionadas. Fisiologicamente, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a traíra foi capaz de se adaptar à situação de um provável estresse, ou seja, se o transporte de oxigênio estava prejudicado ela foi capaz de normalizá-lo. Não é possível dizer, no entanto, que a função de transporte foi completamente restabelecida, mas é provável que sim. Assim, supõe-se que no aspecto transporte de gases (principal função dos eritrócitos) o mercúrio não tenha causado prejuízo aos indivíduos expostos. O fato de não ter sido observado efeito na fragilidade osmótica dos eritrócitos dos indivíduos expostos ao MeHg (que avalia o estado fisiológico dos mesmos), reforça a idéia de que a atividade destas células continua normal, e que provavelmente não devem ter ocorrido alterações iônicas importantes

no plasma. Porém, isso só poderia ser confirmado através de estudos de osmorregulação.

A investigação morfológica usando análises de imagens é um novo parâmetro que permite a visualização de alguns detalhes não visíveis com as técnicas de microscopia clássicas. Este método é usado para estudos comparativos de alguns aspectos morfológicos de eritrócitos, para melhor entender o efeito de contaminantes em peixes. Segundo ALLAN *et al.* (1982), a forma dos eritrócitos pode ser modificada se a concentração intracelular de cálcio aumentar ou se a concentração intracelular de ATP diminuir (NIKINMAA & HUESTIS 1984). Ambos os danos podem ser causados pelo cádmio, com inibição da bomba de cálcio em eritrócitos humanos, como descreve VERBOST *et al.* (1989), e com a redução de ATP em eritrócitos de truta arco-íris (BUSHNELL *et al.*, 1985). Danos na forma dos eritrócitos de peixes também podem ser causados por chumbo, onde pequenas irregularidades são formadas na superfície da célula (SORDYL, 1990), seguida de vacuolizações citoplasmáticas (BUCKLEY *et al.*, 1976). Entretanto nenhuma referência específica foi encontrada na literatura sobre o uso de análise de imagens como um indicativo do efeito tóxico do mercúrio.

FILIPAK NETO (2001), observou que em traíras expostas ao chumbo ($21\mu\text{g.g}^{-1}$) este contaminante levou a um aumento da área, alongação e esfericidade celular. Segundo o mesmo autor, o aumento da área celular pode estar relacionado a um aumento metabólico provocado pela presença deste xenobionte. Já o aumento na alongação e esfericidade, a principio, não apresenta significado biológico, a não ser mudanças do formato celular as quais podem ser o reflexo de outras alterações como o arranjo de proteínas que determinam seu formato.

A fisiologia dos leucócitos e os mecanismos de controle do funcionamento do sistema leucocitário em peixes são semelhantes ao dos vertebrados superiores (VOLKOV, 1978). Diferentemente dos eritrócitos, os leucócitos não têm função no interior da corrente sanguínea, mas a utilizam como meio de transporte de uma para outra região do corpo (GANTNER & HIATT, 1997). De acordo com PUCHKOV (1964), o número de leucócitos nos peixes varia muito, dependendo da idade, estação do ano e maturação gonadal, sendo que diversos autores têm encontrado

variações hematológicas correlacionadas com o ciclo reprodutivo em muitas espécies (MANAJAN & DHEER 1979; RANZANI-PAIVA 1981).

Para WEDEMEYER *et al.* (1990), alterações observadas no número de leucócitos são reconhecidas como um indicador sensível ao estresse e da saúde sendo que uma elevação no número de leucócitos sinaliza para a presença de infecções. Concordando com o descrito acima, os resultados referentes aos leucócitos sugerem que o MeHg afetou a saúde de *H. malabaricus* após a exposição.

Eosinófilos e basófilos não são encontrados com frequência no sangue de peixes. O relato esporádico de um ou outro tipo de leucócito pode ser atribuído à pequena porcentagem desses tipos celulares podendo muitas vezes passar despercebido (RANZANI-PAIVA, 1995). Neste estudo não foram observados eosinófilos e basófilos em indivíduos tanto do grupo controle como do grupo teste.

No sangue aqui analisado, os neutrófilos foram os únicos granulócitos observados e, assim como o verificado por FORESTI *et al.* (1977), é o segundo tipo de leucócitos mais encontrados na traíra e são bastante freqüentes no sangue periférico de peixes. A elevação no número de leucócitos observada na traíra reflete o aumento do número de neutrófilos, pois houve redução no número de linfócitos e manutenção no número monócitos. JANINI & JANINI FILHO (1990) sugerem que a elevada neutrofilia ocorra em casos de intoxicação. Em mamíferos, estes mesmos autores, comentam que o aumento de neutrófilos pode ser causado por envenenamento por vários agentes químicos ou drogas.

MAHAJAN & DHEER (1979), sugerem que os neutrófilos são os leucócitos mais importantes nos peixes e mostram grande sensibilidade a modificações do meio em que vivem. Deste modo sua caracterização e identificação são importantes na avaliação das alterações do estado fisiológico em peixes. Segundo RANZANI-PAIVA (1995), os neutrófilos apresentam uma faixa de variação muito grande, sendo que tais variações podem constituir uma resposta aos fatores ambientais, como a presença do mercúrio, por exemplo. Para GARCIA-NAVARRO & PACHALY (1994), um aumento no número de neutrófilos circulantes pode ocorrer por envenenamento por mercúrio. O rim dos teleósteos contém um número muito grande de neutrófilos,

sendo possível que estes sejam liberados para a circulação sob estímulo apropriado (RANZANI-PAIVA, 1995).

A fagocitose realizada pelos neutrófilos de peixes ainda não foi completamente elucidada. No entanto, segundo MaCARTHUR *et al.* (1985), a rápida mobilização dos polimorfonucleares e dos mononucleares para o local da injúria serve para minimizar a expansão de doenças e iniciar a resposta imune. Para YASUTAKE & WALES (1983); TAKASHIMA & HIBIYA (1995), os neutrófilos ocorrem em baixa porcentagem em peixes relativamente saudáveis, mas aumentam em número com a ocorrência de lesões hepáticas. Pode-se sugerir que as lesões hepáticas causadas pelo MeHg devem ser a principal causa para um aumento no número de neutrófilos nos indivíduos expostos ao organometal.

Os monócitos na traíra são pouco freqüentes, representando aproximadamente 10% dos leucócitos (RANZANI-PAIVA & EIRAS, 1992). Para alguns autores estas células apresentam uma moderada propriedade fagocítica, representando os principais fagócitos em peixes (THUVANSER *et al.* 1987; DOGGETT *et al.*, 1987). Metais pesados como o chumbo, podem causar necrose em muitos tecidos e aumento dos centros de melanomacrófagos (RABITTO *et al.*, 2004). Os macrófagos necessários para remover os tecidos danificados possivelmente são oriundos de monócitos estocados em determinados órgãos. Os resultados do presente estudo não indicam uma ampla produção de novos monócitos, uma vez que o número destes granulócitos no sangue periférico das traíras contaminadas com metilmercúrio manteve-se em taxas semelhantes ao grupo controle.

Dependendo da espécie e das características do ambiente, os linfócitos podem ser o primeiro ou o segundo tipo de leucócitos de maior freqüência no sangue de peixes (RANZANI-PAIVA & EIRAS 1992). Neste estudo, os linfócitos foram os leucócitos mais abundantes no sangue periférico da traíra, conforme previamente observado em outros estudos (PITOMBEIRA, 1972; RIBEIRO 1978; RANZANI-PAIVA & EIRAS, 1992; RANZANI-PAIVA *et al.*, 1997; RIOS, 2001).

Uma vez que os linfócitos constituem as principais células de defesa em peixes, a linfocitopenia da traíra, certamente trará prejuízos à resposta imune destes organismos, tornando-os mais suscetíveis a doenças (WEDEMEYER *et al.*, 1990). A

imunossupressão em peixes foi também relatada para a exposição de tributilestanho (TBT) no peixe neotropical *Astyanax bimaculatus* (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002).

Neste trabalho, o número de trombócitos foi semelhante ao observado em *Hoplias malabaricus* por FORESTI *et al.* (1977), sendo que a forma fusiforme observada nestas células é considerada típica para teleósteos (RANZANI-PAIVA & EIRAS 1992). As traíras expostas ao metilmercúrio apresentaram um aumento no número de trombócitos. Isso pode estar relacionado com a necessidade de aumento na taxa de coagulação do sangue desses indivíduos, provocada possivelmente pela necrose observada em alguns tecidos ou lesões nos próprios vasos sanguíneos. Exposição aguda ao mercúrio inorgânico por 24-48 horas mostram causar trombocitose, com um aumento de 42% do número de trombócitos (SORENSES, 1991), caracterizando um aspecto da intoxicação aguda pelo mercúrio.

O uso de biomarcadores bioquímicos é uma ótima ferramenta nos estudos de toxicologia ambiental. Através destes, é possível detectar os efeitos tóxicos de contaminantes nos níveis básicos de organização biológica, mesmo que tais xenobiontes estejam em uma baixa concentração no ambiente, devido a grande sensibilidade destes biomarcadores (STEGEMAN *et al.*, 1992). A associação de alguns biomarcadores altamente específicos com outros menos específicos, possibilita uma integração e um melhor resultado das respostas do organismo frente o contaminante. Portanto, o uso conjunto de diferentes tipos de biomarcadores constitui uma valiosa estratégia no estudo do impacto de contaminantes sobre os sistemas naturais (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002).

Poucos estudos sobre a atividade de enzimas e as respostas celulares associadas têm sido realizados em peixes de água doce brasileiros, principalmente em relação ao efeito de contaminantes. Estudos com a espécie *Astyanax bimaculatus* exposta ao TBT, foi um dos poucos trabalhos que utilizou a atividade das colinesterase (ChE) em peixes tropicais e relacionou-a com a exposição de contaminantes. Em organismos aquáticos, existe uma relativa diversidade de propriedades bioquímicas e distribuição das colinesterases, bem como na sua sensibilidade a agentes anticolinesterásicos (HABIG *et al.*, 1998; BOCQUENÉ *et al.*, 1990, FLAMARON *et al.*, 2002). Vários estudos têm utilizado a inibição da atividade destas enzimas no diagnóstico do efeito de pesticidas organofosforados e

carbamatos, ou de metais pesados em peixes (GALGANI & BOCQUENÉ 1990; BEYERS & SIKOSKI, 1994; PAYNE *et al.*, 1996; GUILHERMINO *et al.*, 1998; RABITTO, 2004). Em adição a estes agentes anticolinesterásicos, o mercúrio tem também mostrado ser causa de inibição (GILL, *et al.*, 1990; GUILHERMINO *et al.*, 1996; CAJARAVILLE *et al.*, 2000), mas, apesar disso, o mecanismo envolvido na inibição colinesterásica por metais pesados é ainda pouco conhecido.

Os resultados obtidos na determinação da atividade enzimática demonstraram que o metilmercúrio afetou a atividade colinesterásica durante a exposição subcrônica e trófica sob baixas doses, diminuindo a atividade catalítica desta enzima na traíra. A hipótese mais aceita para esta inibição é a de que o mercúrio possa ligar-se a grupos específicos desta proteína, alterando seu sítio ativo (VIARENGO 1989; SIMKISS *et al.*, 1993). O primeiro passo na formação do complexo acetilcolina-AChE parece ser o estabelecimento de uma ligação eletrostática entre a carga positiva do nitrogênio quaternário da colina do acetil e o sítio aniônico da AChE (GALLO & LAWRYK, 1991). Assim, se o sítio aniônico da enzima for ocupado pelo mercúrio, a acetilcolina não será capaz de ligar-se adequadamente a enzima e esta não será degradada. Concordando com isto, diferenças no potencial de inibição da AChE entre metais pode ser esclarecida por propriedades, como: tamanho iônico, capacidade de formação do composto, eletronegatividade e potencial de redução (GUILHERMINO *et al.*, 1998; GRIPPO & HEATH, 2003).

A inibição da acetilcolinesterase impede a hidrólise da acetilcolina. O acúmulo deste neurotransmissor provoca hiperexcitação dos neurônios pós-sinápticos ou dos órgãos dependentes da ação de receptores nicotínicos e muscarínicos da acetilcolina, principalmente os músculos. Os efeitos tóxicos envolvem os sistemas parassimpático, simpático, motor e nervoso central (GRIPPO & HEATH, 2003).

ATCHISON *et al.* (1996), quando descreve os efeitos dos metais no comportamento de peixes, conclui que a exposição a estes compostos neurotóxicos produz danos comportamentais, os quais podem dificultar a sobrevivência do indivíduo. Neste aspecto, um grande número de estudos tem demonstrado a dificuldade de fuga predatória em organismos expostos a metais (SULLIVAN *et al.*, 1978; KRAUS & KRAUS 1986; LITTLE *et al.*, 1993). Isto deixa claro que metais

pesados podem afetar o desempenho natatório e comprometer a habilidade desses organismos de escapar dos predadores ou de procurar sua presa. O desempenho natatório é um comportamento que além de implicações ecológicas como a fuga predatória é também importante na manutenção da posição do indivíduo na água. Foi descrito que peixes expostos a MeHg apresentaram uma diminuição na recepção quimiosensorial com prováveis conseqüências no comportamento alimentar, reprodutivo e defesa (BABCOCK, 1985). Dificuldades de locomoção de captura da presa também foram observadas em larvas de *Fundulus heteroclitus* expostas ao MeHg quando ainda embriões (WEIS & WEIS 1995a; 1995b). Isso vem demonstrar de forma mais direta a interferência desse metal na sobrevivência dos organismos aquáticos associada ao potencial neurotóxico do organometal.

O comportamento locomotor em peixes expostos ao Cobre foi estudado por SCAFE et al. (1982), sendo que algumas espécies mostraram hipoatividade, e outras hiperatividade. Segundo este autor, o grau de alteração no comportamento locomotor de peixes expostos a metais pesados depende principalmente do tempo de exposição ao metal. Muitos estudos envolvendo a neurotoxicidade do MeHg têm dado importância à latência dos sintomas neurológicos (BERLIN et al., 1973; EVANS et al., 1997). A duração desta fase depende da frequência de administração do MeHg, quantidade da dose e tamanho do organismo utilizado.

A inibição da atividade colinesterásica em músculo de *H. malabaricus* mostra a grande susceptibilidade desta espécie ao metilmercúrio. RABITTO et al. (2004), estudaram a atividade das ChE em músculo de *Hoplias malabaricus*, expostos ao tributilestano (TBT) e chumbo (Pb^{++}), e demonstraram que, para o organometal TBT, o músculo não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle, porém para o contaminante Pb^{++} as análises estatísticas revelaram uma diminuição significativa na atividade enzimática.

Existe uma preocupação com a padronização do peso, do comprimento dos indivíduos e das condições ambientais, a fim de diminuir estas variáveis e assim poder apresentar resultados mais precisos. FLAMMARION et al. (2002), sugere a utilização de bioensaios para o completo entendimento da atividade das colinesterases e para validação das metodologias da relação atividade/peso, já que o uso do bioensaio é uma forma de diminuir as variáveis que podem ocorrer. No

entanto, uma vez utilizado este biomarcador sugere-se a utilização de uma série de outros biomarcadores a fim de auxiliar o entendimento do impacto de contaminantes sobre os organismos vivos em ambientes contaminados (FLAMARION *et al.*, 2002).

O uso da histopatologia como biomarcador no estudo da toxicidade de contaminantes contribui para a determinação de danos primários e permite avaliar as conseqüências para as funções vitais dos organismos expostos, como por exemplo crescimento e reprodução (ADAMS, 2002). Além disso, o estudo histopatológico pode ainda colaborar com o diagnóstico da saúde do indivíduo, objetivando a identificação da presença de danos irreversíveis ao organismo o que poderia levar à morte dos mesmos ou colocar em risco a extinção da espécie. De acordo com HINTON *et al.* (1992), a histopatologia é um dos mais rápidos e eficientes métodos para detectar o nível dos efeitos tóxicos em órgãos e tecidos. Entretanto, os efeitos histopatológicos, quando utilizados de forma isolada, não são suficientes para um diagnóstico preciso sobre a ação de contaminantes tóxicos, fazendo-se necessário à associação com outros biomarcadores presentes em outros níveis de organização biológica. Apesar da importância destes estudos, existem poucos dados sobre o efeito de metais e outros agentes tóxicos em peixes nativos brasileiros (COSTA, 2001).

O estudo dos tecidos em peixes tem sido utilizado por diversos autores na identificação e avaliação dos efeitos tóxicos de contaminantes, especialmente o fígado (CHLIAMOVICH & KUHN, 1977; SCHIEWE *et al.*, 1991; SCHWAIGER *et al.*, 1992; JOHNSON *et al.*, 1993; KHAN *et al.*, 1994, HONGXIA *et al.*, 1998; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 1996; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002; COSTA 2001; RABITTO, 2004). TEH *et al.* (1997), em particular detectaram alterações no fígado de peixes de água doce quando expostos a diferentes contaminantes potencialmente tóxicos. Em estudos com *Salvelinus alpinus* após exposição trófica, OLIVEIRA RIBEIRO *et al.* (1999) verificaram que depois do músculo, o fígado foi o tecido que mais bioacumulou MeHg, seguido pelas brânquias, baço e cérebro. No entanto, para REZENDE & LACERDA, (1986) e CHAPMAN *et al.* (1996), a toxicidade de cada metal é bastante variável e dependerá das características de cada elemento, como: biodisponibilidade, concentração e forma química.

A microscopia de luz mostrou uma tendência à diminuição da acidofilia dos hepatócitos nos indivíduos expostos ao contaminante, o que foi também observado por OLIVEIRA RIBEIRO et al. (2002) em *S. alpinus* exposto troficamente ao MeHg na mesma concentração. A presença de áreas de necrose observadas no fígado de indivíduos expostos ao MeHg, pode ser apoiada pelas observações de SIMENOVA (1999), em que o autor relaciona o fator de necrose tumoral como elemento importante em condições de toxicidade, sugerindo necroses e apoptoses em tecidos alvos. Segundo MANAHAM (1991), a presença de necrose, é uma consequência de um conjunto de distúrbios causados por substâncias tóxicas como inibição enzimática, alteração na membrana celular, distúrbios na síntese de proteínas e no metabolismo de carboidratos. No fígado, agentes tóxicos de diferente natureza química, freqüentemente causam necroses focais, isto devido à concentração de xenobióticos durante o processo de detoxificação desempenhada por este órgão (ROBERTS, 1989).

O fator de necrose tumoral pode ser secretado também por macrófagos residentes no tecido lesado, o qual estimula a infiltração de leucócitos (neutrófilos) na mesma área (SIMEONOVA, 1999). Neste caso, pode-se explicar a presença de um número alto de neutrófilos encontrados nos peixes expostos ao MeHg, podendo este quadro estar relacionado com as lesões observadas no fígado e rim analisados neste trabalho. HINTON (1994) descreve que a presença de células de defesa no parênquima hepático de peixes é muito comum.

Em casos de lesões celulares, diferentes tipos de leucócitos são atraídos para o local, dependendo da natureza do agente agressor. Porém, de uma forma geral, suas funções são neutralizar e destruir a fonte agressora e realizar a limpeza do tecido, retirando o agente agressor e células mortas, além de induzir a recuperação do tecido lesado. Esta infiltração é caracterizada pela presença de um ou mais tipos de leucócitos entre as células de um ou mais tecidos do órgão em questão (ROBERTS, 1989).

Áreas com lesões necróticas foram observadas em todos os indivíduos analisados no tecido hepático de *Fundulus heteroclitus*, os quais vivem em uma região contaminada por mercúrio e outros metais pesados. O fígado destes indivíduos também apresentou aumento de infiltração leucocitária e do número de

centros de melano-macrófagos (SCHMALZ *et al.*, 2002) sendo esses efeitos atribuídos à exposição ao mercúrio. Áreas de necrose também foram observadas por OLIVEIRA RIBEIRO *et al.* (2002), em *Salvelinus alpinus* exposto ao MeHg via trófica por 30 dias, e em *Trichomycterus brasilienses* (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 1996), exposto ao mercúrio inorgânico dissolvido na água.

A necrose não é um processo natural em células saudáveis, nas quais a remoção celular dos tecidos se dá por apoptose, um processo morfológicamente distinto (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995). A evidência de múltiplas áreas de necroses observadas no fígado expostas a doses de metilmercúrio confirma a grande capacidade tóxica desta forma e química do mercúrio quando oralmente administrado. Assim as alterações encontradas no fígado são grandes e podem ser utilizadas como uma forte evidência do potencial tóxico do MeHg em traíra. Entretanto os mecanismos envolvidos para estas alterações à presença do metilmercúrio são ainda pouco conhecida.

As áreas de necrose foram confirmadas com a microscopia eletrônica de transmissão. Os estudos com ultraestrutura também revelaram que os hepatócitos das traíras contaminadas apresentam uma redução no número de organelas citoplasmáticas e alterações na organização do retículo endoplasmático. Provavelmente isso esteja relacionado a uma desorganização do citoesqueleto, interferindo nos processos de organização e movimento de organelas e vesículas, pois se sabe que o MeHg é capaz de interagir com as tubulinas globulares e assim interferir na polimerização dos microtúbulos (HEATH, 1995). Os resultados mostrando a dispersão das organelas podem interferir no metabolismo dos hepatócitos de traíra, uma vez que segundo HEATH (1995), estas células são normalmente ricas em retículo endoplasmático granular e mitocôndrias, indicando uma alta atividade metabólica.

A organização de organelas no citosol deve-se à presença do citoesqueleto que por associação com proteínas motoras posicionam estas organelas dentro do citosol (ALBERTS *et al.*, 2002). Sendo assim, a desorganização do citoesqueleto afetaria diretamente o tráfego de vesículas, disposição e movimentação das organelas, trazendo como consequência danos na secreção e metabolismo celular, e principalmente nos processos de detoxificação celular. Para HEATH (1995), o

retículo endoplasmático pode apresentar reorganização ou proliferação em resposta a um poluente e isso pode ser atribuído à indução da síntese de enzimas do sistema P450, sendo esta indução considerada uma adaptação fisiológica e não um efeito patológico, o que envolve custos energéticos à célula.

A invasão de leucócitos observados no fígado das traíras contaminados parece ter acompanhado a evolução das necroses, como uma resposta do organismo à presença do tecido lesado. Alterações nucleares também foram observadas, como a perda de esfericidade dos núcleos. Para COSTA (2001), tal efeito é interpretado como uma alteração morfológica do fígado com o contaminante, conclusão retirada de evidências de que o núcleo acumule metais mais intensamente que outros compartimentos celulares devido à presença de proteínas ácidas intranucleares (GOYER & MOORE, 1974). Mudanças na forma do núcleo em peixes expostos a diversos poluentes foram também citadas na literatura (HEATH 1995).

Na microscopia eletrônica observou-se corpúsculos altamente eletrodensos distribuídos pelo citoplasma. TAKASIMA & HIBIYA (1995) analisando fígado de trutas não contaminadas, observaram que a estagnação da bile leva a formação de grânulos amarelos amarronzados. Conclui-se que a ocorrência destes grânulos eletrodensos observados aqui não parecem estar relacionados com a presença do MeHg nos hepatócitos.

Foi observado no citoplasma dos hepatócitos um aumento de vesículas lipídicas nos grupos expostos ao MeHg. Este tipo de alteração foi descrita também por OLIVEIRA RIBEIRO *et al.* 2002, em *Salvelinus alpinus* exposto ao mercúrio orgânico por trinta dias, e por MURCHELANO & WOLKE (1991) em peixes provenientes de uma região portuária impactada por metais pesados. O acúmulo de lipídeos foi associado com a presença de necrose e exposição ao mercúrio por WEIS & WEIS, (1998). Essa deposição lipídica pode indicar uma possível alteração no metabolismo lipídico destas células (ARELLANO *et al.*, 1999).

A barreira entre o sangue e o tecido hepático é realizada pelas células endoteliais. Nos indivíduos do grupo exposto ao MeHg estas células mostraram-se vacuolizadas e parcialmente destruídas, o que pode estar alterando significativamente a troca de componentes do plasma com o espaço intersticial do

parênquima hepático. Uma autometalografia realizada em sapos (*Rana ridibunda*) expostos ao mercúrio inorgânico, demonstrou que depois de seis dias o mercúrio absorvido encontra-se todo concentrado nas células de Kupffer e nas células endoteliais. Isto pode acontecer porque as células endoteliais são as primeiras a atuarem na proteção deste tecido, funcionando como uma barreira para a entrada no parênquima hepático (LOUMBOURDIS & DANSCHER, 2004). Com a alteração estrutural destas células o mercúrio encontrado no sangue destes animais não teria mais uma barreira e poderia entrar facilmente no parênquima hepático. Peixes expostos ao Cobre também apresentaram vacuolização e alterações nas células endoteliais (ARELLANO *et al.*, 1999).

Como dito anteriormente, o rim posterior de *H. malabaricus* não apresentou alterações morfológicas nas condições testadas. Este órgão é responsável pela excreção de metabólitos nos peixes, porém grande parte do metilmercúrio ingerido pelos peixes não é eliminado e sim estocado em outros tecidos. Assim, a forma orgânica do mercúrio dentro das doses utilizadas neste experimento pode não ter atingido o rim posterior destes animais, ou os mecanismos envolvidos com a detoxificação e/ou imobilização sejam mais eficientes neste tecido. Por outro lado, a falta de dados sobre esta região do órgão em *H. malabaricus* poder estar relacionado à forma de mercúrio utilizada (MeHg), já que os danos no rim posterior tem sido mais relacionados com a exposição ao mercúrio inorgânico (BAATRUP *et al.* 1986; ; BANERJEE & BHATTACHARYA 1994; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 1995; 1996; HOFFMAN & HEINZ 1998; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002). WHO (1991), relata a alta afinidade do rim posterior pelo mercúrio inorgânico, sendo que este tem um importante papel na eliminação desta forma de mercúrio (ALLEN *et al.*, 1988).

As análises de microscopia de luz revelaram que o rim anterior também apresentou importantes áreas de lesões necróticas e conseqüentemente destruição do tecido, o que pode comprometer as importantes funções hematopoiéticas deste órgão. Observou-se também um aumento no número de centros de melanomacrófagos nos indivíduos do grupo exposto, uma provável conseqüência da morte celular e/ou reposição de células do sangue danificadas.

A função básica dos melanomacrófagos é remover, através de fagocitose, partículas estranhas derivados da degradação celular (ELLIS *et al.*, 1976; HERRÁEZ

& ZAPATA, 1991; MESEGUER *et al.*, 1994; RAVAGLIA & MAGGESE, 1995). Para estes autores, os macrófagos são os principais componentes dos CMMs, independente da espécie ou órgão considerado. Na traíra, a presença de melanomacrófagos próximos aos focos de necrose no fígado e rim sugere que estes fagócitos estejam envolvidos na remoção de células necróticas e contribuam para o aumento dos CMMs.

O aumento quantitativo dos CMMs nos indivíduos contaminados com MeHg e observados no rim anterior, sugere que existe uma tendência dos melanomacrófagos livres se concentrarem em centros, uma vez que houve diferenças significativas destas estruturas nos indivíduos contaminados. BLAZER *et al.* (1987) e RABITTO *et al.* (2004) propõem que a diferença no número destas estruturas possa ser utilizada como um biomarcador de poluição aquática e de saúde em peixes, o tem sido reforçado por WOLKE (1992), e MANERA *et al.* (2000), os quais descrevem que o número de melanomacrófagos livres e de CMMs são parâmetros biológicos que podem ser influenciados pela exposição a contaminantes na dieta de peixes.

A literatura relaciona ainda os CMMs com: o envelhecimento (BROWN & GEORGE, 1985), degradação de tecidos (AGIUS, 1979; AGIUS & ROBERTS, 1981), condições alimentares (AGIUS & ROBERTS, 1981; MOCCIA *et al.*, 1984), metabolismo de ferro e hemoglobina (GROVER, 1968), poluição (HARTLEY *et al.*, 1996; THIYAGARAJAH *et al.*, 1998), condições patológicas e inflamatórias (ROBERTS, 1975; 1976; ELLIS 1981; MATHIESSEN & ROBERTS 1982; VOGELBEIN *et al.*, 1987), processos imunológicos (ELLIS *et al.*, 1976; ELLIS, 1980; SECOMBES & MANNING, 1980) e privação de alimento (RIOS, 2001).

Em peixes a principal localização dos melanomacrófagos é observada na derme, hipoderme, rim, fígado e pequenos grupos de células do sangue e vasos linfáticos (AGIUS & ROBERTS, 1981). Porém alguns estudos mostram que estes também já foram observados em cérebro, brânquias e gônadas (FERGUSON, 1989).

Histologicamente os melanomacrófagos contém hemosiderina, melanina, lipofusina e ceróides HERRAEZ & ZAPATA, 1986; RABITTO *et al.*, 2004), porém a origem destes pigmentos é variável e pouco conhecida (WOLKE *et al.*, 1985). Sua

morfologia e composição variam com diferentes condições como a inanição (AGIUS & ROBERTS, 1981; RIOS, 2001), idade (BROWN & GEORGE 1985), doenças (ROBERTS, 1975), alterações teciduais (AGIUS, 1979), poluição da água (ARELLANO *et al.*, 1999) e mecanismos de defesa (ELLIS *et al.*, 1976; FERGUSON, 1989).

RABITTO *et al.* (2004), concluíram que os melanomacrófagos do rim anterior de *Hoplias malabaricus* contém predominantemente melanina e mucopolissacarídeos neutros, porém não apresenta pigmentos férricos. A melanina parece desempenhar um papel ativo na neutralização de radicais livres, produzidos durante a fagocitose de tecidos mortos contendo lipídios polinsaturados (AGIUS & AGBEDE, 1984; AGIUS, 1985; LAVAGNO *et al.*, 1992). No fígado, predomina a presença de hemosiderina (pigmento contendo ferro proveniente da degradação de eritrócitos), sendo que a melanina e os mucopolissacarídeos aparecem em menor quantidade. Segundo os autores, estas diferenças nos tipos de pigmentos indicam que apesar de serem estruturas morfológicamente muito parecidas, possivelmente tenham funções diferentes, relacionadas com o tipo de pigmento que concentram.

De acordo com RIOS (2001), na traíra os grandes CMMs apresentam um revestimento, formado por uma monocamada de células achatadas. MESEGUER *et al.* (1994), através de observações citoquímicas e ultraestruturais, as classificou como células reticulares semelhantes a fibroblastos. Segundo HERRÁEZ & ZAPATA (1991) e MESEGUER *et al.* (1994), todos os agregados de macrófagos inclusive os CMMs menores, devem evoluir para uma condição encapsulada.

Pode-se concluir que estudos *in vivo* em laboratório utilizando doses realísticas são importantes do ponto de vista toxicológico, pois permitem obter dados sem as interferências ambientais. Estas informações podem ser utilizadas para auxiliar o monitoramento ambiental, desde que observadas as variações e realizadas as devidas adaptações. Futuros estudos utilizando biomarcadores *in situ* em regiões afetadas pela presença do mercúrio, poderão complementar este trabalho, resultando em um diagnóstico mais completo dos efeitos do mercúrio e seus derivados na espécie *Hoplias malabaricus*.

6 CONCLUSÕES

- O desenho experimental utilizado neste experimento foi satisfatório para os objetivos propostos no estudo;
- A espécie *Hoplias malabaricus* foi considerada um bom modelo biológico para este estudo, pois adaptou-se bem às condições laboratoriais e à manipulação durante o experimento;
- Os resultados descritos para *Hoplias malabaricus* mostram que alterações hematológicas podem ser potencialmente utilizadas como biomarcadores na avaliação do efeito em peixes expostos ao metilmercúrio;
- As medidas da atividade colinesterásica em músculo axial de traíras expostas ao metilmercúrio, confirmou a neurotoxicidade deste metal em peixes;
- A análise da concentração de mercúrio em músculo e fígado mostra que a traíra teve uma tendência em acumular metilmercúrio durante o tempo de exposição o que possibilita uma avaliação da relação dose/efeito;
- A contagem de centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres demonstraram que esta estrutura pode vir a ser utilizada como um parâmetro a mais no estudo de toxicologia ambiental;
- Os dados obtidos através do estudo histopatológico do fígado e rim de indivíduos expostos ao metilmercúrio, demonstrou que este contaminante é tóxico na dose e tempo de exposição testado, causando uma variedade de lesões nos tecidos e órgãos dos organismos expostos;
- Os danos causados pelo metilmercúrio podem comprometer a qualidade de vida dos organismos expostos bem como a qualidade do ambiente aquático;
- Apesar de realizado em laboratório, este trabalho possibilitou avaliar uma condição realística, fornecendo portanto dados inéditos que possibilitam uma compreensão melhor do potencial tóxico do metilmercúrio em peixes tropicais brasileiros.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S.M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. **Americas fishers society**, 3:104-112, 2002.

AFFONSO, E.G; POLEZ, V.L.P; CORREA,C.F.; MAZON, A.F; ARAUJO, M.R.R; MORAES, G. & RANTIN, F.T. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hipoxia. **Comparative biochemistry and physiology**, 133:375-382, 2002.

AGIUS, C. The role of melano-macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish. **Journal of fish diseases**, 2:337-343, 1979.

AGIUS, C. & ROBERTS, R.J. Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. **Journal of fish biology**, 19:161-169, 1981.

AGIUS, C. & AGBEDE, S.A. An electron microscopic study on the genesis of lipoficsin, melanin and hemosiderin in the haemopoietic tissue of fish. **Journal of fish biology**, 24:471-478, 1984.

AGIUS, C. The melano-macrophage centres of fish: A review. In: **Fish immunology** (Manning, M.J & Tatner, M.F: eds. 85-105. London: Academic Press, 1985.

AKAGI, H. Human exposure to mercury due to goldmining in the Tapajós river Basin, Amazon, Brazil: Spesiation of mercury in human hair, blood and urine. **Water air and soil pollution**, 80:85-94, 1995.

AKAGI, H; MALM, O; BRANCHES, F.J.P.; KINJO, Y.; KASHIMA, U.; GUIMARÃES, J.R.D.; OLIVEIRA, R.B.; HARAGUCHI, K.; PFEIFFER, W.C.; TAKIZAWA, Y. & KATO, H. Methylmercury pollution in the Amazon Brazil. **Science of the total environmental**, 175:85-95, 1995.

AKAGI, H.; MALM, O. & BRACHES, F.J.P. Human exposure to mercury due to mining in the Amazon, Brazil-a review. **Environmental science**, 3:199-211, 1996.

AKAISHI, F.M. Avaliação do potencial tóxico da fração solúvel de petróleo em água (FSA) em *Astyanax sp.* utilizando biomarcadores de contaminação. **Dissertação de Mestrado** – UFPR, 141p. 2003

ALBERTS, R.A. & ANDERSON, D. W. Mercury levels, reproduction and hematology in western grebs from three California lakes, USA. **Environmental toxicology and chemistry**, 17:210-213, 2002.

ALLAN, D., THOMAS, P. & LIMBRICK, A.R. Microvesiculation and sphingomyelinase activation in chicken erythrocytes treated with ionophore A23187 (calcimycin) and calcium. **Environmental science**, 693:53-67, 1982.

ALLEN, P; MIN, S.Y. & KEONG, W.M. Acute effects of mercury chloride on intracellular GSH levels and mercury distribution in the fish *Oreochromis aureus*. **Bulletin of environment contamination and toxicology**, 40:178-184, 1988.

ALLEN, P. Changes in the hematological profile of the achlid during acute inorganic mercury intoxication. **Comparative biochemistry and physiology**, 108:117-121, 1994.

ALMEIDA, V.L.L. & HAHN, N.N.S. Atividade alimentar de cinco espécies de peixes picívoros, da planície de inundação do Alto Rio Paraná, Brasil. **Anais do XIII encontro brasileiro de ictiologia**, 1999.

AMADIO, S.A. Variação dos parâmetros hematológicos das espécies do gênero *Semaprochilodus* (Ostariophysis, Prochilodontidae) em função de aspectos ontogenético, reprodutivos, comportamentais e ambientais no baixo Rio negro Amazonas, Manaus - Brasil, **Tese de Doutorado**, 1985.

ANDERSON, H.A.; HANRAHAN, L.P.; SMITH, A.; DRAHEIM, L.; KANAREK, M. & OLSEN, J. The role of sport-fish consumption advisories in mercury risk communication: a 1998-1999 12-state survey of women age 18-45. **Environmental research**, 95:315-324, 2004.

ARELLANO, M.J., STORCH, V. & SARASQUETE, C. Histological changes and Cooper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 44:62-72, 1999.

ASCHNER, M. Neurotoxic mechanisms of fish-borne methylmercury. **Environmental toxicology and pharmacology**, 12:101-104, 2002.

ATCHISON, G.J., SANDHEINRICH, M.B. & BRYAN, M.D. Effects of environmental stressors on interspecific interactions of aquatic animals. In: **Ecotoxicology: A hierarchical treatment** (Newman, M.C., Jagoe, C.H.) CRC Press, Inc., Boca Raton, 319-345, 1996.

AXTELL, C.D.; COX, C.; MYERS, G.J.; DAVIDSON, P.W.; CHOI, A.L.; CERNICHIARI, E.; SLOANE-REEVES, J.; SHAMLAYE, C.F. & CLARKSON, T.W. Association between methylmercury exposure from fish consumption and child development at five and a half years of age in the Seychelles child Development Study: an evaluation of nonlinear relationships. **Environment research**, 84:71-80, 2000.

AZCUE, J.M.P. Possíveis vias de acesso de metais pesados provenientes do sistema hídrico do Rio Paraíba do Sul – Rio Grande, RJ, até o homem. **Dissertação de Mestrado**, UFRJ – IBCCFO, 1987.

AZEVEDO, F.A. **Toxicologia do mercúrio**. Editora Rima, São Carlos, 272p, 2003.

BAATRUP, E.; NIELSEN, M.G. & DANSCHER, G. Histochemical demonstration of two mercury pools in trout tissue: Mercury in kidney and liver after mercuric chloride exposure. **Ecotoxicol and environmental safety**, 12:267-282, 1986.

BAATRUP, E.; DOVING, K.B. & WINBERG, S. Differential effects of mercurial compounds on the electroolfactogram (EOG) of Salmon (*Salmo salar* L.) **Ecotoxicology and environmental safety**, 20:269-276, 1990.

BABCOCK, M.M. Morphology of olfactory epithelium of pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*, and changes following exposure to benzene: a scanning electron microscopy study. In: **Marine biology of polar regions and effects of stress on marine organisms** (Gray, J. S.; Christiansen, M. E.) John Wiley & Sons. New York, 259-267, 1985.

BAINY, A.C.D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. **Ciência e cultura**, 45:10-11, 1993.

BALDI, F. Microbial transformation of mercury species and their importance in the biogeochemical cycle of mercury. **Metal ions in biological systems**, 34:213-57, 1997.

BALLATORI, N. Mechanisms of metal transport across liver cell membranes. Drug metabolism reviews, **Environmental research**, 23:83-132, 1991.

BALM, P.H.M.; HAENEN, H.E.M.G. & WENDELAAR BONGA, S.E. Regulation of interrenal function in freshwater and sea water adapted tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Fish physiology and biochemistry**, 14:37-47, 1995.

BANERJEE, S. & BHATTACHARYA, S. Histopathology of kidney of *Channa punctatus* exposed to chronic nonlethal level of elsan, mercury and ammonia. **Ecotoxicology and environmental safety**, 29:265-275, 1994.

BARBOSA, A.C.; BOESCHIO, A.A. ; EAST, G.A.; FERRARI, I.; GONÇALVES, A.; SILVA, P.R.M. & CRUZ, T.M. E. Mercury contamination in the Brazilian Amazon. Environmental and ocupacional aspects. **Water air and soil pollution**, 80:109-121, 1995.

BARBOSA; A.C.; SILVA, S.R.L. & DÓREA, J.G. Concentration of mercury in hair of indigenous mothers and infants from the Amazon Basin. **Archives of environmental contamination and toxicology**, 80:109-121, 1998.

BERLIN, M.; NORCERG, G. & HELLBERG, J. In: **Mercury, mercurials and mercaptans** (MILLER, M. W.; CLARKSON, T. W.) Charles C. Thoams Books. Springfield, 111. 1973.

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**, 22:25-34, 1999.

BEVERIDGE, T.J.; HUGLES, M.N.; LEE, H.; LEUNG, K.T.; POOLE, R.K.; SAVIVADIS, I.; SILVER, S. & TREVORS, J.T. Metal microbe interations: contemporaty approaches. **Advances in microbial physiology**, 38:177-243, 1997.

BEYER, W.N.; HEINZ, G.H. & RENMON-NORWOOD, A.W. **Environmental contaminants in wildlife**. London, Lewis publishers, 1996.

BEYERS, D.W. & SIKOSKI, P.J.; Acetylcholinesterase inibition in federally and alanine aminotransferase in *Rutletapes philippinarum* (Mollusco: Bivalvia). **Comparative biochemistry and physiology**, 122:253-263, 1999.

BIESTER,H.; GOSAR, M. & MULLER, G. Mercury speciation in tailings of the Idrija mercury mine. **Journal of fish diseases**, 63:95-204, 1999.

BLAZER, V.S.; WOLKE, R.E., BROWW, J. & POWEL, C.A. Piscine macrophage aggregate parameters as health monitors: effect of age, sex, relative weight, season and site quality in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) **Aquatic toxicology**, 10:199-215, 1987.

BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F. & TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AchE activity from several marine species in pollution monitoring. **Marine environment research**, 30:75-89, 1990.

BOENING, D.W. Ecological effects, transport and fate of mercury: A general Review. **Chemosphere**, 40:1335-1351, 2000.

BOISCHIO, A.A.P. & HENSHEL, D. Fish consumption, fish lore, and mercury pollution – risk communication for the madeira river people. **Environmental research section**, 84:108-136, 2000.

BOUDOU, D.; GEORGESCAULD, D. & DESMAZES, J.P. Ecotoxicological role of the membrane barriers in transport and bioaccumulation of mercury compounds. In: **Aquatic toxicology** (Niriagu, J.O.) John Wiley & Sons, New York, 118-136, 1983.

BOYAR, H.C. Blood cell types and differential cell counts in Atlantic herring, *Clupea harengus harengus*. **Copeia**, 2:463-465, 1962.

BRADFORD, M. An Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. **Analytical biochemistry**, 72: 248-254, 1976.

BRADO, E.S.; OLIVEIRA SANTOS,E.; MAURA de JESUS, M.; MASCARENHAS, A.F.S. & FAIAL, K.F. Mercury contamination of fish and exposures of an indigenous community in Pará state, Brazil. **Environmental research section**, 84:197-203, 2000.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S. & LOPES, B.L. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. Brasília, Embrapa, 1999.

BROWN, C.L. & GEORGE, C.J. Age dependent accumulation of macrophage aggregates in the yellow perch, *Perca fluviatilis* (Mitchell). **Journal of fish diseases** 8:135-138, 1985.

BUCKLEY, J.A., WHITMORE, C.M. & MATSUDA, R.I. Changes in blood chemistry and blood cell morphology in coho salmo (*Oncorhynchus kisutch*) following exposure to sublethal levels of total residual chlorine in municipal wastewater. **Journal of fish diseases**, 33:776-782, 1976.

BURGSTALLER, W. & SCHINNER, F. Leaching of metals with fungi. **Journal of biotechnology**, 27:91-116, 1993.

BUSHNELL, P.G., NIKINMAA, M. & OIKARI, A. Metabolic effects of dehydroabietic acid on rainbow trout erythrocytes. **Journal of fish diseases**, 81:391-394, 1985.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C. & VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian peninsula: a practical approach. **The science of the total environment**, 247:295-311, 2000.

CAMPBELL, P.G.; LEWIS, A.G.; CHAPMAN, P.M.; CROWDER, A.A.; FLETCHER, W.K.; IMBER, B.; LUONA, S.N.; STOKES, P.M. & WINFREY, M. **Biologically available metals in sediments national research**, 298p. Ottawa, 1988.

CARTA, P.; FLORE, C.; ALINOV, R.; IBBA, A; TOCCO, M.G.; ARU, G.; CARTA, R.; GIREI, E.; MUTTI, A; LUCCHINI, R. & RANDACCIO, F.S. Sub-clinical neurobehavioral abnormalities associated with low level of mercury exposure through fish consumption. **Neurotoxicology**, 24:617-623, 2003.

CARVALHO, W.F. **Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia**. Editora Coopmed, Belo Horizonte, 66-175, 1994.

CERNICHIARI, E.; BREWER, R.; MYERS, G.J.; MARSH, D.O.; LAPHAM, L.W.; COX, C.; SHAMLAYE, C.F.; BERLIM, M.; DAVIDSON, P.W. & CLARKSON, T.W. Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. **Neurotoxicology**, 16:705-710, 1995.

CHAPMAN, P.M.; ALLEN, H.; GODTFREDSSEN, K. & GRAGGER, M.N. Avalution of bioaccumulation factors in regulating metals. **Environment sciense of technology**, 30: 448A-452A, 1996.

CHEMINFO - CCOHS CANADIAN CENTER FOR OCCUPATIONAL HEALTH AND SAFETY. Nov. 2000. Issue 2000-4. Disponível em: <http://www.ccohs.ca>. Acesso em 17 de maio 2001.

CHLIAMOVITCH, Y.P. & KUHN, C. Behavioural, haematological and histological studies on acute toxicity of bis-(tri-n-butyltin) oxide on *Salmo gaisdneri* Richardson and tilapia rendalli Boulenger, **Journal of fish biology**, 10:575-582, 1977.

CLARKSON, T.W. The Pharmacology of mercury compounds. **Annual review of pharmacology and toxicology**, 12:375-406, 1972.

CLARKSON, T.W. Effects-general principles underiyng the toxic action of metals. In: **Handbook on the toxicology of metals** (FRIBERG, L.; NORDBERG, G. F.; VOUK, V. B.), 1986.

CLARKSON, T.W. Human health Risk from methylmercury in Fish. **Environmental toxicology**, 9: 957-961, 1990a.

CLARKSON, T.W. Mercury an element of mystery. **New england journal of medicine**, 323:1137-1139, 1990b.

CLARKSON, T.W. The Toxicology of mercury and its compounds. In: **Mercury pollution: Integration and synthesis** (WATRAS, C. J.; HUCKABEE, J.W.). London, Lewis Publishers, 1994

CLARKSON, T.W. Health effects of metals: A role of evolution. **Environmental health perspectives**, 103:9-12, 1995.

CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. **Critical reviews clinical laboratory sciences**, 43:369-403, 1997.

CLARKSON, T.W. The Three modern faces of mercury. **Environmetal health perspectives**, 110:11-23, 2002.

COLE, M.B.; ARNOLD, D.E; WATTEN, B.J & KRISE, W.F. Hematological and physiological responses of brook charr, to untreated and limestone neutralized acid mine drainage. **Journal of fish biology**, 59:79-91, 2000.

COOPER, G.P.E & STEINBERG, D. Effects of cadmium and lead on adrenergic neuromuscular transmission in the rabbit. **American journal of physiology**, 232:534-541, 1977.

COSTA, J.R.M.A. Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no rio ribeira (SP/PR).**Dissertação de mestrado**, 2001.

COUNTER, S.A. & BUCHANAN, L.H. Mercury exposure in children: a review. **Toxicology and applied pharmacology**, 198:209-230, 2004.

D'ITRI, F.M. **The environment mercury problem**. Cleveland: CRC Press, 167p, 1972.

DACIE, J.V. & LEWIS, K. **Practical haematology**, 4ed., London: Churchill, 1968.

DALLINGER, R. & RAIMBOW, P.S. **Ecotoxicology of metals in invertebrates**. Chelsea, Lewis publishers, 1993.

DE VITO, S.C. Mercury. In: KROSCWITZ, J.I. (Ed). **Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology**. Ed. New York: John Wiley & Sons, v.16, 1995.

DE WILDE, M.A. & HOUSTON, A.H. Hematological aspects of thermoacclimatory process in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Research of the board of Canada**, 24:2267-2281, 1967.

DILERMANO, B.F. **Venenos Metálicos**. Praia Grande, Editora Itaipú, , 1^oed., Cap. IV, 159-165, 1983.

DIXIT, R.K. & AGRAWALA, N. Seasonal studies on the adrenal homologue of female *Puntius sophore*. **Acta anatomica**, 93:334-50, 1975.

DOGGETT, T.A.; WRATHMELL, A.B. & HARRIS, J.E. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae.; **Journal of fish biology**, 31:147-53, 1987.

DONALDSON, E.M. **The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish**. Ed. Stress and fish. London, 11-47, 1981.

DOREA, J.G. Fish are central in the diet of Amazonian riparians: should we worry about their mercury concentrations? **Environmental research**, 92:232-244, 2003.

DRISCOLL, C.T.; YAN, C.; SCHOFIELD, C.L.; MUNSON, R. & HOLSAPPLE, J. The mercury cycle and fish in the Adirondack Lakes.. **Journal of fish biology**, 28:138-143, 1994.

EIRAS , A.E. & SOUZA, M.A.B. Phylogeny of the lymphoid sistem. I a sutdy of the fate of circulationg lymphocytes in plaice. **European journal on immunology**, 4:338-343, 1974.

ELLIS, A.E.; MUNROE, A.L.S & ROBERTS, R.J. Defence mechanisms in fish. I.A study of phagocytic system and the fate of intraperitoneally onjected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Journal of fish biology**, 8:67-78, 1976.

ELLIS, A.E. Antigen-trapping i the spleen and kidney of the plaice, *Pleuronectes platessa* L. **Journal of fish diseases**, 3:413-426, 1980.

ELLIS, A.E. Non-specific defense mechanisms in fish and their role in disease processes. Developmental lymphocytes in plaice. **European journal on immunology**, 4:338-343, 1981.

ELLMANN, G.L.; COUTNEY, K.O.; ANDRES, V. & FEATHERSTONE, R.M.A New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, 7:88-95, 1961.

EVANS, H.L.; LATUS, V.G. & WEISS, B. Beharoval effects of mercury and methylmercury. **Federation procceding**, 34:1858-1867, 1975.

EVANS, H.L.; GARMAN, R.H. & WEISS, B. **Toxicology and applied pharmacology**, 30:243-251, 1997.

FDA - UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Center for drug Evaluation and Research**, 1997. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/fdama/mercuryreport.htm>. Acesso em 21 de Abril 2001.

FERGUSON, H.W. The relationship between ellipsoids and melanomacrophage centres in the spleen of turbot (*Scophthalmus maximus*). **Journal of comparative pathology**, 86:377-380, 1976.

FERGUSON, H.W. **Systemic pathology of fish**. Cleveland, Ohio, 1989.

FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. & MORON, S.G. Comparative study of gill dimensions of three Erythrinid species in relation to their respiratory function. **Canadian journal of zoology**, 71:160-165, 1993.

FILIPAK NETO, F. Análise hematológica e ultraestrutural dos componentes do sangue de *Hoplias malabaricus* após exposição trófica e subcronica ao organoestanho (TBT) e chumbo inorganico (Pb). **Relatório técnico-científico** parcial apresentado ao programa de iniciação científica do CNPq-PIBIC da Universidade Federal do Paraná. 27p. Curitiba 2001.

FJELD, E.; HAUGEN, T.O. & VOLLESLAD, L.A. Permanent impairment in the fuding behavior of grayling (*Thymallus thymallus*) exposed to methylmercury during embryogenesis. **Science of the total environmental**, 213:247-254, 1998.

FLAMARION, P.; NOURY, P. & GARRIC, J. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in the club (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. **Environmental pollution**, 23:35-45, 2002.

FORESTI, F.; CARVALHO, E.D.; BORMIO, A.M. & CARAMASHI, E.P. Hematologia da Traíra (*Hoplias malabaricus*, bloch,1794) (Pisces: erythrinidae) - Aspectos morfológicos e fisiológicos. **Ciência e cultura**, 29:28-32, 1977.

FOWLER, H.W. **Os peixes de água doce do Brasil**. São Paulo, Arquivos de Zoologia do estado de São Paulo, 6:205-404, 1950.

FOWLER, B.A. Structure, Mechanism and toxicity. In: **Changing Metal Cycles and Human Health**. (Niriago, J.O.) Berlin, 31:391-404, 1984.

FRANCESCONI, K.A. & LENANTON, R.C.J. Mercury aontamination in a senci-enclosed marine embayment organic and inorganic mercury content of biota, and factors influencing mercury levels in fish. **Marine environmetal research**, 33:189-212, 1992.

FRAVOLA, L.K. The effect of inorganic cobalt on the morphological picture os the blood of *Cyprinus carpio*, **Environmental pollution**, 131:983-984, 1960.

FRIBERG, L. & VOSTAL, J. (Eds). **Mercury in the environment**, erc press, Cleveland, Ohio, 1972.

FRIEDMANN, A.S.; WATZIN, A.C.; BRINCK-JOHNSEN, T. & LEITER, J.C. Low levels of dietary methylmercury inhibit growth and gonadal development in juvenile walleye (*Stizostedion vitreum*). **Aquatic toxicology**, 35:165-278, 1996.

GADD, G.M. Interation of fungi with toxic metals. **New phytologist**, 125:25-60, 1993.

GALGANI, F. & BOCQUENÉ, G. *In vitro* inibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. **Bulletin environment contamination toxicology**, 45:243-249, 1990.

GALLO, M.A & LAWRYK, N.J. Organic phosphorus pesticides. In: **Handbook of pesticide toxicology** (W.J. Hayes & E.R. Laws) vol. 2, eds(S. Diego: Academic Press), pp. 917-1123, 1991.

GARCIA-NAVARO, C.E.K & PACHALY, J.R. **Manual de hematologia veterinária**. Livraria Varela, São Paulo, 169p, 1994.

GARTNER, L.P. & HIATT, J.L. **Tratado de histologia**. Editora Guanabara, 426p, 1997.

GIBLIN, F.J. & MASSARO, E.J. The erythrocyte transport and transfer of methylmercury to the tissues of the rainbow trout. **Toxicology**, 5:243-254, 1975.

GILL, T.S.; TEWARI, H. & PANDE JAISHREE. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. **Comparative biochemistry and physiology**, 97:287-292, 1990.

GOCHFELD, M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicology and environmental safety**, 56:174-179, 2003.

GOLDSTEIN, R.M.; BRIGHAM, M.E. & STANFFER, J.C. Comparison of mercury concentrations in liver, muscle. Whole bodies composites of fish from the red river. **Canadian journal of the fisheries and aquatic sciences**, 53:244-252, 1996.

GOYER, R.A. & MOORE, J.F. Cellular effects of lead. **Comparative biochemistry and physiology**, 48:447-462, 1974.

GRIPPO, M.A. & HEATH, A.G. The effect of mercury on the feeding behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Ecotoxicology and environmental safety**, 55:187-198, 2003.

GROVER, J.H. Hemosiderin in bluegill spleens. **Transaction of the American fisheries society**, 97:48-50, 1968.

GUILHERMINO, L.; LOPES, M.C.; CARVALHO, A.P. & SOARES, A.M.V.M. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with Juvenile *Daphnia magna*. **Chemosphere**, 32:727-738, 1996.

GUILHERMINO, L.; BARROS, P.; SILVA, M.C. & SOARES, A.M.V.M. 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? **Biomarkers**, 3:157-163, 1998.

GUILHERMINO, L.; LACERDA, M.N.; NOGUEIRA, A.J.A.; SOARES, A.M.V.M. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. **The science of the total environment**, 274:137-141, 2000.

GUIMARÃES, J.R.D.; ROULET, M.; LUCOTTE, M. & MERGLER, D. Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajós river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations. **The science of the total environment**, 261:91-98, 2000.

HABIG, C.; DIGIULIO, R.T. & ABOU-DONIA, M.B. Comparative properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crab (*Callinectes sapidus*) acetylcholinesterase. **Comparative biochemistry and physiology** 91:293-300, 1998.

HANCON, S.; ROCHEDO, E.R.; CAMPOS, R.; ROSALES, G. & LACERDA, L.D. Risks assessment of Mercury in Alta Floresta, Amazon Basin, Brazil. **Water air and soil pollution**, 97:91-105, 1997.

HARA, T.J.; BROWN, S.B. & EVANS, R.G.(1983). Pollutants and chemoreception in aquatic animals. **Aquatic toxicology**, 13: 247-306, 1983.

HARTLEY, W.R. THIYAGARAJAH, A. & TREINIES, A.M. Liver lesions in the gar fish (lepisosteidae) as biomarker of exposure. **Marine environmental research** 42:217-221, 1996.

HAWRYSHYN, C.W. & MACKAY, W.C. Toxicity and tissue uptake of methylmercury administered intraperitoneally to rainbow trout (*Salmo gairdneri Richardson*) **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 23:79-86, 1979.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**, CRC press, Boca Raton, Florida, 230p, 1987.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Florida, Lewis Publishers, 1995.

HENNING, H.K.O. Metal-binding proteins as metal pollution indicators. **Environment health perspectives**, 65:175-187, 1986.

HENSLEY, D.A. & MOODY, D.P. Occurrence and possible establishment of *Hoplias malabaricus* (Characoidei, Erythrinidae) in Florida. **Florida scientist**, 38(2):122-128, 1975.

HERRÁEZ, M.P. & ZAPATA, A.G. Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. **Veterinary immunology and immunopathology**, 12:111-126, 1986.

HERRÁEZ, M.P. & ZAPATA, A.G. Structural characterization of the melano-macrophage centres of goldfish *Carassius auratus*. **European journal of morphology**, 29:89-102, 1991.

HINTON, D.E. & LAURÉN, D.J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American fisheries society symposium**, 8:51-66, 1990.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELAN, R.A. & OKIHIRO, M.S. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopatological markers of antropogenic stress**. Lewis Publishers, 155-208, 1992.

HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A. & CAIRNS, J. **Handbook of ecotoxicology**. London, Lewis publisher, 1995.

HOFFMAN, D.J. & HEINZ, G.H. Effects of mercury and selenium on glutathione metabolism and oxidadtive stress in mallard ducks. **Amercian fisheries society symposium**, 17:161-166, 1998.

HONGXIA, L. GNOLAN, H. & SHUGUI, D. Toxicity and accumulation of tributyltin chloride on tilapia. **Environmental sciense of technology**, 12:109-119, 1998.

HOUSTON, A.H. Blood and ciculation. In methods for fish biology (Schreck, CB and MOYLE, PB; eds)p451-489. Bethesda, MD: **American fishers society**, 76:54-64, 1990.

HSDB - HAZARDOUSSUBSTANCES DATA BANK. Mercury. In: TOMES CPS SYSTEM. **Toxicology, occupational medicine and environmetal series**. Englewwod: Micromedex, 2000, CD-ROM.

ICES, International council for the Exploration of the Sea. Report of the ICES Workshop on the of pathology in studies of the effects of contaminations. Project CM/ICES E. 401-464, 1986.

JANINI, P. & JANINI FILHO, P. **Interpretação clínica do hemograma**, 9° ed, São Paulo, Sarvier, 625p, 1990.

JARDIM, W.F. & FADINI, P.S.A Origem do mercúrio nas águas do Rio Negro. **Ciência hoje**, 30:62-64, 2001.

JOBLING, M. **Environmental biology of fish**. London, Chapman e Hall, 1995.

JOHNSON, L.L.; STEHR, A.M.; OLSON, O.P.; MYERS, M.S.; PIERCE, S.M.; WIGREN, C.A.; Mc,AIN, B.B. & VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United states. **Environmental science of technology**, 27:2759-2771, 1993.

JOIRIS, C.R.; HOLSBEEK, L. & MOATEMRI, N.L. Total and methylmercury in *Sardines Sardinella aurita* and *Sardina pilchardus* from Tunisia. **Marine pollution bulletin**, 38:188-192, 1999.

JOIRIS, C.R.; HIRENDA, K.DAS & HOLSBEEK, L. Mercury accumulation and speciation in marine fish from bangladesh. **Marine pollution bulletin**, 40:454-457, 2000.

JONSSON, A.C. & HANSSON, T. Influence of sex steroids on the catecholamine biosynthesis in the cromafin tissue from Rainbow trout, *Salmo gairdneri*, **Marine pollution bulletin**, 55:200-207, 1984.

JONSSON, C.M. Estudos de toxicidade e acumulo de endosulfan nos peixes *Brachy brachyolantio Rerio* e *hyphessobrycon bifasciatus*. Campinas. **Tese de Mestrado** . Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1991.

KAGI, J.H.R. & KOGINA, Y. **Metallothionein II**. Basel, Switzerland: Birkhauser-Verlang, 1987.

KAVAMOTO, E.T.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. & TOKUMARU, M. Estudos hematológicos em bagre *Rhamdia hilarii*, teleósteo, no estágio de desenvolvimento gonadal. **Aquatic Toxicology**, 12:15-23, 1985.

KEHRIG, H.A.; COSTA, M.; MOREIRA, I. & MALM, O. Total and methylmercury in a Brazilian estuary, Rio de Janeiro. **Marine pollution bulletin** 44:1018-1023, 2002.

KHAN, R. A.; BARKER, E. E. HOOPER, R.; LEE, E. M.; RYAN, K. & NAG, K. Histopathology in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and paper mill. **Aquatic Toxicology**, 26, 95-102, 1994.

KLAASSEN, C. D. Heavy metals and the heavy metal antagonists. In" GOODMAN, R.; GILMANS, M. **The pharmacological basis of therapeutics**, 9:1592-614, 1990.

KLAVERKAMP, J.F.; WAUTIER, K. & BARON, C.L. A modified mercury saturation assay for measuring metallothionein. **Aquatic toxicology**, 50:13-25, 2000.

KLINGER, R.C.; BLAZER, V.S. & ECHEVARRIA, C. Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, 147:225-233, 1996.

KORZHEEV, P.A., ALYAKRINSKAYA, I.O & DOLGOVA, S.N. Characteristics os the blood in yong and adult *Salmo solar* (Salmonidae). **Marine pollution bulletin**, 22:112-120, 1982.

KRAUS, M.L. & KRAUS, D.B. Differences in effects of mercury on predator avoidance in two populations of *Grass shrimp and Palaemonetes pugio*. **Marine pollution bulletin**,18:277-289, 1986.

LACERDA, L.D.; PFEIFFER, W.C.; OTT, A.T. & SILVEIRA, G.G. Mercury contamination in the Madeira River, Amazon-Hg inputs to the environmental. **Biotropica**, 21:91-93, 1989.

LACERDA, L.D.; BIDONE, E.D.; GUIMARÃES, A.F. & PFFEIFER, W.C. Mercury concentartions in fish from the Itacaiunas-Parauapebas River system, Carajas region, Amazon. **Anais da academia brasileira de ciências**, 66:373-379, 1994.

LAVAGNO, C.C; ROMANO, I.A. & BOVERIS, A. Melanin could act as a free radical scavenger in melano-macrophage centres during phagocytosis. **Documental veterinarian**, 43:16-21, 1992.

LEENHUER, E.L. Hemopoiesis in the kidney of *Oncorhynchus masou* (Brevoort) M.S. **Tese de Doutorado**. University of Western Ontario, London, 1969.

LEIBEL, W.S. An analysis of esterase activity from surgeon fish tissue yields evidence of an atypical pseudocholinesterase. **Comparative Biochemistry and physiology**, 91:437-447. 1988.

LELAND, H.V. & KUWABARA, J.S. Trace metals in fundamentals of aquatic toxicology, methods and applications. In: **Water pollution and fish physiology** (RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R.) Washington, Hemisphere Publishing, 1985.

LINDBERG, S.E. Introduction: the fourth international conference on mercury global pollutant. **Environmental research**, 12:807-808, 1998.

LINDBERG, A.; ASK BJORNBERG, K.; VAHTER, M. & BERGLUND, M. Exposure to methylmercury in non-eating people in Sweden. **Environmental research**, 96: 28-33, 2004.

LINDQUIST, O. Atmospheric cycling of mercury: An overview. In: **Mercury pollution integration and synthesis** (WATRAS, C. J. & HUCKABILL, J. W). London, Lewis Publishers, 1994.

LITTLE, E.E., FAIRCHILD, J.F. & DELONAY, A.J. Behavioral methods for assessing impacts of contaminants on early life stage fishes. **Aquatic Toxicology**, 14:67-76, 1993.

LOUMBOURSDIS, N.S. & DANSCHER, G. Autometallographic tracing of mercury in frog liver. **Environmental research**, 129:299-304, 2004.

LUNDIN, S.J. Comparative studies of cholinesterase in body muscles of fish. **Journal of cellular and comparative physiology**, 59:93-105, 1962.

MaCARTHUR, J.L.; THOMSON, A.W. & FLETCHER, T.C. Aspects of leucocyte migration in the plaice, *Pleuronectes platessa*. L. **Journal of fish biology**, 27:667-676, 1985.

MACHADO, C.R.; GARÓFALO, M.A.R.; ROSELINO, J.E.S.; KETTELHUT, I.C. & MIGLIORINI, R.H. Effects of fasting on glucose turnover in carnivorous fish (*Hoplias malabaricus*). **American journal of physiology**, 256:612-615, 1989.

MAGALHÃES, A.C. **Monografia brasileira de peixes fluviais**, São Paulo, Graphicars, 1931.

MAGOS, L.; HALBACH, S. & CLARKSON, W. Role of catalase in the oxidation of mercury vapor. **Biochemical pharmacology**, 27:1373-1377, 1987.

MALM, O.; BRANCHES, F.J.P.; AKAGI, H.; CASTRO, M.B.; PFEIFFER, W.C.; HARADA, M.; BASTOS, W.R. & KATO, W.R. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajósriver basin, Brazil. **Science of the total environment**, 17:141-150, 1995.

MALM, O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. **Environmental research**, 77:73-78, 1998.

MANAHAN, S.E. **Water pollution environment quimistry** Lewis publishers, First edition, 155, 1991.

MANAHAN, S.E. **Environmental chemistry**. Florida, Lewis Publishers, 2000.

MANAJAN, C.L. & DHEER, J.S. Cell types in the peripheral blood of an air breathing fish *Channa punctatus*. **Journal of fish biology**, 14:481-487, 1979.

MANALIS, R.S. & COOPER, G.P. Evoked transmitter release by inorganic mercury at frog neuro muscular function. **Nature**, 257:690:691, 1975.

MANERA, M.; SERRA, R.; ISANI, G.E. & CARPENÉ, E. Macrophage aggregates in gilthead sea bream fed cooper, iron and zinc enriched diets. **Journal of fish biology** 57:457-465, 2000.

MARINS, R.V; LACERDA, L.D.; PARAQUETTI, H.H.M.; PAIVA, E.C. & VILAS BOAS, R.C. Geochemistry of mercury in sediments of a subtropical coastal lagoon, Sepitiba Bay, Southeastern Brazil. **Bulletin of environment contamination and toxicology**, 61:57-64, 1998.

MASSOULÍE, J.; PEZZEMENTI, L.; BOM, S.; KREJCI, E. & VALLETTE, F. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in neurobiology**, 41:31-91, 1993.

MATHIESSEN, P. & ROBERTS, R.J. Histopathological changes in the liver and brain of fish exposed to endosulfan insecticide during tsetse fly control operations in Botswana. **Journal of fish diseases**, 5:153-159, 1982.

MATTY, A.J. The adrenal and the kidney hormones In: **Fish endocrinology** (MATTY, A.J.). London, Lewis Publishers, 25:113-37, 1985.

MAURICE-BOURGOIN, L.; QUIROGA, I.; CHINCHEROS, J. & COURAU, P. Mercury distribution in waters and fishes of the upper Madeira rivers and mercury exposure in riparian Amazonian populations. **The science of the total environment**, 206:73-86, 2000.

MAURO, J.B.N.; GUIMARÃES, J.R. & MELAMED, R. Aguapé agrava contaminação por mercúrio. **Ciência hoje**, 25: 68-72, 1999.

McKNIGHT, I.M. A hematological study on the mountain whitefish, *Prosopium williamsoni*. **American journal of physiology**, 23:45-64, 1966.

MEECH, L.A; VEIGA, M.M. & TROMANS, D. Emissions and stability of mercury in the Amazon. **Canadian metallurgical quarterly**, 36:231-239, 1997.

MELANCON, M.J. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: **Handbook of ecotoxicology** (HOFFMAN, D. .; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS, J.).Ed. Boca raton. Lewis, 1995.

MESEGUER, J.; LÓPEZ-RUIZ, A. & ESTEBAN, M.A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell and tissue research** 277:1-10, 1994.

MOCCIA, R.D.; HUNG, S.S.O.; SLINGER, S.J. & FERGUSON, H.W. Effect of oxidized fish oil, vitamin e and ethoxyquin in the histopatology and hematology of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of fish diseases** 7:269-282, 1984.

MOLNAR, G & TAMASSY, E. Study of hemoglobin content of a single erythrocyte in various cultured fish species. **Journal of fish biology**. London, 2:167-171, 1970.

MOORE, M.N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, 59:1-15, 2002.

MOURA, M.A.F; OLIVEIRA, M.S. & VAL, A.L. Effects of hipoxia on leucocytes of two Amazon fish *Colossoma macropomum* and *Haplosternum littorale*. **Journal of fish diseases**, :13-22, 1997.

MURCHELANO, R.A. & WOMLKE, R.E. Neoplasms and nonneoplastic liver lesion in winter flounder, *pseudopleuronectes americanus*, from Boston Harbor, Massachusetts. **Environment health perspectives**, 90:17-26, 1991.

MYERS, M.S. & FOURNIE, J.W. Histopathological biomarkers as integrators of anthropogenic and environmental stressors. In: **Biological indicators of aquatic ecosystem stress** (Adams S.M.) American Fisheries Society, 24:221-287, 2002.

NATT, M. P. & HERRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Aquatic toxicology**, 31:735-738, 1992.

NEWLAND, M.C. Neurobehavioral toxicity of methylmercury and PCBs effects-profiles and sensitive population. **Environmental toxicology and pharmacology**, 12:119-128, 2002.

NIENCHESKI, L.F.; WINDOM, H.L. BARAJ, B.; WELLS, D. & SMITH, R. Mercury in fish from Patos and Mirim lagoons, southern Brazil. **Marine pollution bulletin**, 42:1403-1406, 2001.

NIKINMAA, M. & HUESTIS, W.H. Shape changes in goose erythrocytes. **American fisheries society**, 77:317-320, 1984.

NIOSH - NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. **Pocket guide to chemical hazards**. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office, 192p. DHHS. Publication N.97-104, 1997.

NIRIAGU, J.O.; SOUZA, C.M.M. & MIERLE, G. Mercury pollution in Brazil, **Nature**, 356:389-390, 1992.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; GUIMARÃES, J.R.D. & PFEIFFER, W.C. Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*), **Environmental science technology**, 4:45-52, 1995.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A ; GUIMARÃES, J.R.D. & PFEIFFER, W.C. Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish *Trichomycterus brasiliensis* (Pices, Siluroidei). **Biocell** 20:43-54,1996.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; ROULEAU, C.; PELLETIER, E.; AUDET, C. & TJALVE, H. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environmental science technology**, 33:902-907, 1999.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; SCHATZMANN, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; SILVA, P.H. & PELLETIER, E. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and environment Safety**, 51:61-167, 2002.

OLIVEIRA SANTOS, E.C.; MAURA de JESUS, I.; BRADO, E.S.; LOUREIRO, E.C.B.; MASCARENHAS, A.F.S.; WEIRICH, J.; CÂMARA, V.M. & CLEARY, D. Mercury exposure in riverside Amazon communities in Pará, Brazil. **Environmental research section**, 84:100-107, 2000.

PAIN, D.J. Mercury in the environment. In: **Handbook of Ecotoxicology**. (HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS, J.) Boca Raton. Lewis, 1995.

PAIVA, M. P. Fisiocologia da Traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch ,1794), no Nordeste Brasileiro. São Paulo, **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.

PAIVA, M.P. **Crescimento, alimentação e reprodução da Traíra, *Hoplias malabaricus* no Nordeste Brasileiro**. Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1974.

PALENZUELA, B.; MANGANIELLO, L.; RIOS, A. & VALCARCEL, M. Monitoring inorganic mercury and methylmercury species with liquid chromatography-piezoelectric detection. **Environmental research section**, 511:289-294, 2004.

PANDEY, B.N. Haematological studies in relation to environmental temperature and different periods of breeding cycle in an air breathing fish, *Heteropneustes fossilis*, **Environmental research section**, 104:69-74, 1977.

PARADIS, S.; WHEATLEY, B.; BOSUELL-PURDY, J.; BELISLE, D.; COLE, M.; LICKERS, H.; HAYTON, A. & DAVIES, K. Mercury contamination through fish consumption. A model for predicting and preventing hazardous behaviour on a community level. **Water air and soil pollution**, 97:147-158, 1997.

PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W. & FANCY, L.L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in new found land. **Marine pollution bulletin**, 32:225-231, 1996.

PELLETIER, E. & AUDET, C. Tissue distribution and histopathological effects of dietary methylmercury in benthic *Guppy Myoxocephalus Aeneus*. **Bulletin environmental of contamination and toxicology**, 54:724-730, 1995.

PELLETIER, E. **Metal speciation and bioavailability in aquatic systems**. Eds. TESSIER, A.; TURNER, D.R. John Wiley e Sons Ltd. 1995.

PFEIFFER, W.C. & LACERDA, L.D. Mercury inputs into the Amazon Region, Brasil. **Environmental technology**, 9:325-330, 1988.

PFEIFFER, W.C.; LACERDA, L.D.; MALM, O.; SOUZA, C.M.; SILVEIRA, E.G. & BASTOS, W.R. Mercury concentrations in inland waters of gold mining areas in Rondonia. **Science of the total environment**, 87:233-240, 1989.

PFEIFER, W.C.; MALM .O.; SOUZA, C.M.; LACERDA, L.D. & SILVEIRA, E.G.A. Ameaça do mercurio nos garimpos . **Ciencia hoje**, 61:12-16, 1990.

PICKERING, A.A. Changes in blood cell composition of the trout, salmo trutta during the spawning season. **Journal of fish biology**, 29:335-347, 1996.

PITUBEIRA, M.S. Hematologia do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Cuvier, 1829). Peixes teleósteos. Aspectos morfológicos e fisiológicos. São Paulo (SP), Instituto de biociências. Departamento de fisiologia geral. Universidade de são Paulo e universidade federal do ceará. **Tese de Doutorado**, 1972

PITUBEIRA, M.S., MARTINS, J.M. & FURTADO, E. Hematology of the Atlantic thread herring, *Opisthonema oglinum*. **Sicence of the total environment**, 8:11-116, 1968.

POUGH, H.F.; HEISSER, B.J. & McFARLAND, W.N. **A vida dos vertebrados**. 2ed. São Paulo. Atheneu, 1999.

PUCHKOV, N.V. The white blood cells. In techniques for the investigation of fish. Physiology academy of sciences of the USSR. **Ichthyological board**, 8:11-5, 1964.

QUEIROZ, I.R. Determinação de metilmercúrio em peixes da região de garimpo. **Dissertação de mestrado** – Faculdade de ciencias farmaceuticas, Universidade de São Paulo- São Paulo, 109p, 1995.

RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J.R.M.; SILVA de ASSIS, H.C.; PELLETIER, F.M.; 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*: hitopatological and biochemical findings. **Ecotoxicology and environemntal safety**, in press, 2004.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. Estudos hematológicos em Curimatá *Prochilodus scrofa steindacher*, 1881 (*Osteichthyes*, *Cypriniformes*, *Prochilodontidae*), São Carlos, Universidade Fedadar de São Carlos, **Dissertação de Mestrado**, 1981.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. & GODINHO, H.M. Sobre células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos e eritrócitos em Curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (*Osteichthyes*, *Cypriniformes*, *prochilodontidae*). **Biocell**, 43:331-338, 1983.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; PORTELLA, M. C. & CELIBERTO, R.J. Hematologia da carpa, *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus sp.* E após um tratamento com fosfato de 0,0dimetil-oxi-2,2,2-tricloroetilo(Neguvon). **Boletim do instituto de pesca**, 14:83-92, 1987.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. & EIRAS, A.C. das. Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos de 13 espécies de teleósteos do rio Paraná-Pr. **Acta scientiarum**, 34:54-62, 1992.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de tainha *mugil platanus* Gunther, 1880 (*osteichthyes*, *mugilidae*) da região estuarino-laguanr de Cananéia-SP. **Boletim do instituto de pesca**, 22:23-40, 1995.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; CAMPOS, B.E.S. & EIRAS, A.C. Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus* Gunther, fro the estuarine region of Cananéia, são Paulo, Brazil, **Boletim do instituto de pesca**, 14:329-339, 1997.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SOUZA-SILVA, A.T.; PAVANELLI, G.C.; TAKEMOTO, R. M. & EIRAS, A.C. Hematological evaluation in commercial fish species from the floodplain of the upper Paraná river, Brazil. **Acta scientiarum** 229:507-513, 2000.

RAVAGLIA, M.A. & MAGGESE, M.C. Melano-macrophage centres in the gonads of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch, (Pisces, Synbranchidae): histological and histochemical characterization. **Journal of fish diseases** 18:117-125, 1995.

REZENDE, C.E. & LACERDA, L.D. Metais pesados em mexilhões *Perna perna* no litoral do estado do rio de janeiro. Ver. Brasil. **Journal of fish diseases**, 46:239-247, 1986.

RIBEIRO, W.R. Contribuição ao estudo de hematologia de peixes. Morfologia e citoquímica das células do sangue e dos tecidos hematopoéticos do mandi amarelo, *Pimelodus maculatus* lacepede, 1803 Ribeirão preto (SP). **Tese de Doutorado**. Faculdade medica de Ribeirão preto-USP, 1978.

RICHARDSON, G.M.; EGYED, M. & CURRUE, D.J. Does acid rain increase human exposure to mercury? A Review and analysis of recent literature. **Environmental toxicology and chemistry**, 14:809-813, 1995.

RIOS, F.S. Metabolismo energético de *Hoplias malabaricus* (Boch, 1794) (Erythrinidae) submetida à privação de alimento e à realimentação. São Carlos-SP. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Carlos, 2001.

RIOS, F.S.; KALININ, A.L. & RANTIN, F.T. The effects of long-term food deprivation on respiration e hematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Journal of fish biology**, 61:85-95, 2002.

ROBERTS, R.J. Melanin containing cells of teleost fish and their relation to disease. In: **The pathology of fishes** (RIBELIN, W.E.; MIGALI, G.) Ed. pp.399-428. Madison:University of Wiscosin press, 1975.

ROBERTS, R.J. **Experimental pathogenesis of lymphocytis i the plaice (*Pleuronectes platessa L.*)**.431-441. London: Plenum press, 1976.

ROBERTS, R.J. **Patologia de los peces**. Ediciones Mindi-Prensa, Madrid, 366p. 1981.

ROBERTS, R.J. **Fish pathology**. Editora Bailliére tindall, second edition, 467pg, 1989.

ROTHMANN, C.; LEVINSHAL, T.; TIMAN, B.; AUTALION, R.R. & MALIK, Z. Spectral imagin of red blood cells in experimental anemia of *Cyprinus carpio*. **Comparative biochemistry and physiology**, 12:75-83, 2000.

ROTHSTEIN, A. Mercurials and red cell membranes. In: **The function of red blood cells: Erithrocyte Pathology**. Inc. New York, 105-131, 1981.

ROULET, M. & LUCOTTE, C. The geochemistry of mercury in central Amazonia soils developed on the Atler do chão formation of the lower tapajós river valley, Para state, Brazil. **Science of the total environmental**, 223:1-24, 1998.

SAKAMOTO, M.; NAKANO, A. & AKAGI, H. Diclining Minamata male birth ratio associated with increased male fetal death due to heavy methylmercury pollution. **Environmetal research section A**, 87:92-98, 2000.

SANTOS, E. **Peixes de água doce**, Belo Horizonte, Itatiaia Ltda, 1981.

SANTOS, E.C.O.; MAURA de JESUS, I.; BRADO, E.S.; LOUREIRO, E.B.; MASCARENHAS, A.F.S.; WEIRICH, J.; CÂMARA, V.C. & CLEARLY, D. Mercury exposures in riverside Amazon communities in Pará, Brazil. **Environmental research section**, 84:100-107, 2002.

SCARFE, A.D., JONES, K.A., STEELE, C.W. KLEEREKOPER, H. & CORBETT, M. Locomotor behavior of four marine teleosts in response to sublethal copper exposure. **Aquatic toxicology**, 2:335-353, 1982.

SCHIEWE, M.A.; WEBWE, D.D.; MYERS, M.S.; JAQUES, F.J.; REICHERT, W.L.; KRONE, C.A.; MALINS, D.C.; McCAIN, B.B.; CHAN, S. & VARANASI, U. Induction of foci of celular alteration and other hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to na extract of na urban marine sediment. **Environmental research section**, 48:1750-1760, 1991.

SCHMALZ, W.F.; HERNANDEZ, A.D. & WEIS, P. Hepatic histopathology in two populations of the mimmichog *Fundulus heretoclitus*. **Marine environmental research**, 54:539-542, 2002.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal. Adaptação e Meio ambiente**. São Paulo, Santos, ed. 5, 1996.

SCHWAIGER, J.; BUCHER, F.; FERLING, H.; KALBFUS, W. & NEGELE R.D. A prolonged toxicity study on the effects os sublethal concentrations os bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO): histopathological and histochemical findings in rainbow trout (*Oncorhunchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, 23:31-48, 1992.

SECOMBES, C.J. & MANNING, M.J. Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians: antigen localization in the carp *Cyprinus carpio* L. **Journal of fish diseases**, 3:399-412, 1980.

SHAW, C.M.; MOTTET, N.K.; BODY, R. L. & LUSCHER, E.S. Variability of neurophatologic lesion in experimental methylmercurial encephalopaty in primates. **American journal of pathology**, 80:451-470, 1975.

SIDDIQUI, A.Q. & NASEEM, S.M. The haematology of rohu, *Labeo rohita*. **Journal of fish diseases**, 14:67-72, 1979.

SILVA DE ASSIS, H.C. Der Einsatz von Biomarkern Zur summarischen Erfassung von Gewasserverschmutzungen. Thesis presented at Technical University of Berlin, Germany. **Tese de Doutorado**, 1998.

SILVA FILHO, M.V.; OLIVEIRA, M.M. CUNHA, B.V.L.F.; ALVES, M.V. & CUNHA, B. J.(2000). Validação de espécies sentinelas para biomarcação com colinesterases de peixes. In: **Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI** (ESPÍNDOLA, E. L. G.; PASNCHOAL, C. M. R. B.; ROCHA, O.; BOHRER, M. B. C. & OLIVEIRA NETO, A. L.) São Carlos, Rima, 2000.

SIMENOVA, A.D. Behavioural, haematological and histological studies on acute toxicity mercury on *Salmo gairdneri* Richardson and tilapia rendalli Boulenger, **Journal of fish biology**, 10:575-582, 1999.

SIMKISS, K., DANIELS, S. & SMITH, R.H. Effects of population density and cadmium toxicology on growth and survival of blowflies. **Environmental pollution**, 81:41-45, 1993.

SIMON, M.; JONK, P.; WUHL-COUTRIEL,G. & DAUNDERER,M. Mercury, mercury alloy, and mercury compounds. In: **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry** (HANS-JURGEN, A.) 5th ed. New York: CVH, v.A16, p.269-298, 1990.

SOIVIO, A.; OIKARI, A. Hematological effects of stress on a teleost, *Esox lucil*. **Fish biology**, 8:397-411, 1976.

SORDYL, H. Influence of exposure time and h concentration of the water on the effects of sublethal Pb loads on blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Environmental research section**, 94:141-152, 1990.

SORENSEN, E.M.B. **Metal poisoning in fish**. CRC press, boca Raton, Florida, 340p. 1991.

SOUZA LIMA, A.P.; MULLER, R.C.S.; SARKIS, J.E.S.; ALVES, C.N.; BENTES, M.H.S.; BRADO, E. & SANTOS, E.O. Mercury contamination in fish from Santarém, Pará, Brazil. **Environmental research section**, 83:117-122, 2000.

SPANOVSKAYA, V.C & ROLDUGINA, V.V. Some blood indicators in the roach, *Rutilus rutilus*, from Mozhaysk reservoir. **Fish biology**, 18:960-967, 1978.

SPECKNER, W.; SCHINDLER, J.F. & ALBERS, C. Age-dependent changes in volume and hemoglobin content of erythrocytes in carp (*Cyprinus carpio L.*). **Fish biology**, 141:133-149, 1989.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FORLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M. & VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: **Biomarkers Biochemical, Physiological, and histological markers of antropogenic stress** (HUGGETT, R.J.; KIMERLEY, R.A.; MEHRLE, P.M.Jr.; BERGMAN, H.L.). Eds. Lewis Publishers, 235-234, 1992.

STENESH, J. Biochemistry. New York: Plenum. 1998 .In: **Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR)** (COSTA, J. R. M. A).

STURM, A.; DA SILVA ASSIS, H.C. & HANSEN, P.D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine environmental research**, 47:389-398, 1999.

SULLIVAN, J.F., ATCHISON, G.J., KOLAR, D.J. & MACLINTOSH, A.W. Changes in predator-prey behavior of fathead minnow *Pimephales prometas* and largemouth bass *Micropterus salmonides* caused by cadmium. **Fish biology**, 35:446-451, 1978.

SUNDA, W.G.; TESTER, P.A. & HUNTSMAN, A. Toxicity of trace metals to *Acartia touse* in the Elizabeth River and South Chesapeake bay. **Estuarine coastal and shelf science**, 30: 207, 1990.

SUNDIN, L.I.; REIS, S.G.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. & MILSOM, W.K. Cardiovascular and respiratory reflexes: The tropical fish, Traíra (*Hoplias malabaricus*) O₂ Chemosresponses. **Respiration physiology**, 116:181-199, 1999.

SUTTERLIN, A.M. Pollutants and the chemical senses of aquatic animals- perspective and review. **Chemical senses**, 1:167-178, 1974.

SWENSSON, , A. & ULFARSSON, V. Toxicology of organic mercury compounds used as fungicides. **Fish biology**, 15:5-11, 1963.

TAKASHIMA, F. & HIBIYA, T. **An Atlas of fish histology: normal and pathological feateres**, 2ed. New York, 1995.

TEH, S.J.; ADAMS, S.M. & HINTON, D.E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed different types of contaminant stress. **Aquatic toxicology**, 37:51-70, 1997.

THIYAGARAJAH, A.; HARTLEY, W.R. & ABDELGHANI, A. Hepatic hemosiderosis in buffalo fish (*Ictiobus spp.*) **Marine environmetal research** 46: 203-207, 1998.

THUVANDER, A.; NORRGREN, L. & FOSSUM, C. Phagocytic cells in the blood from Rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy. **Journal of the fish biology**, 31:197-208, 1987.

TUBINO, M. & MAGALHÃES, M.E.A. Mercúrio: Um caminho para a toxicidade. **Ciência hoje**, 23:20-22, 1997.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Mercury study report to Congress**. v.V: Health effects of mercury and mercury compounds (1997). [EPA 452/R-97-009]. Disponível em: <http://www.epa.gov/ttncaaa1/t3/reports/volume5>. acesso em: 25 de Abril 2001.

VALLEE, B.L. & ULMER, D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. **Reviews in biochemical toxicology**, 41:91-128, 1972.

VASSALO, D.V.; MASSARONI, L.; OLIVEIRA, E.M.; ROSSONI, L.V.; AMARAL, S.M.C. & VASSALO, P.F. Ações tóxicas e agudas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular. Centro Biomédico da UFGS, Vitória e Hospital Universitário da UFSM, Santa Maria RS-Vitória ES. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, 67:54-61, 1996.

VERBOST, P.M., FLIK, G., PANG, P.K.T., LOCK, S. & WENDELAAR BONGA, S.E. Cadmium inhibition of the erythrocytes Ca^{+2} pump. A molecular interpretation. **American fisheries society**, 64:5613-5615, 1989.

VERMA, G.P. & MISRA, S.K. Morphological and histochemical aspects of interrenal tissue of a teleost, *Channa gachua* (Ham.). **Fish biology**, 62:147-54, 1992.

VIARENGO, A. Heavy metal in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at cellular level. **Review of aquatic science**, 1:295-317, 1989.

VOGELBEIN, W.K.; FOURNIE, J.W. & OVERSTREET, R.M. Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melano-macrophage centres in *Rivulinus marmoratus*. **Journal of fish biology**, 31:145-153, 1987.

VOLKOK, I.V. On the physiology of the leukocyte system of *Vimba vimba* from neman river. **Journal of fish biology**, 18:148-153, 1978.

WALKER, P.R.; LEBLANC, J. & SIKORSKA, M. Effects of aluminium and other cations on the structure of brain and liver chromatin. **Biochemistry**, 28:3911-3915, 1989.

WARREN, L.A. & HAACK, E.A. Biogeochemical controls on metals behaviour in freshwater environmental. **Earth science reviews**, 54: 261-320, 2001.

WEDEMWYER, GA; BARTON, B.A. & McLEAY, D.J. Stress and acclimation. In methods for fish biology (SCHRECK, C.B and MOYLE, P.B eds) 451-489. Bethesda, MD: **American fisheries society**, 1990.

WEIS, J. S. & WEIS, P. Effects of embryonic exposure to methylmercury on larval prey capture ability in the mummichog. *Fundulus heteroclitus*. **Environmental toxicology and Chemistry**, 14:153-156, 1995a.

WEIS, J. S. & WEIS, P. Swimming performance and predator avoidance by mummichog (*Fundulus heteroclitus*) larvae after embryonic or larval exposure to methylmercury. **Journal of fish biology**, 52:2168-2173, 1995b.

WEIS, J.S. & WEIS,P. Effects of exposure to lead on behavior of mummichog (*Fundulus heteroclitus* L.) larvae. **Journal of experimental marine biology and ecology**, 12:1-10, 1998.

WESTER, P. W.; VETHAAK, A. D. & MUISWINKEL, W.B. Fish as biomarkers in immunotoxicology. **Toxicology**, 86:213-232, 1994.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mercury**. Geneva. Environment health Criteria 1. 148p, 1978.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mercury** – environmental aspects. Geneva. Environment health Criteria, 86, 115p, 1989.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Methylmercury**. Geneva. Environment health Criteria 101. 144p, 1990.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Inorganic mercury**. Geneva. Environment criteria 101. 140p, 1991.

WINTROBE, M.M Variations in the size and hemoglobin conten of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **American fisheries society**, 51:32-49, 1934.

WOLFENSBERGER,M.; FORSSMANN, W.G. & REINECKE, M. Localization and coexistence of atrial natriuretic peptide (ANP) and neuropeptide Y (NPY) invertebrate adrenal chromaffin cell immunoreactive to TH, DBH and PNMT. **Cell tissue and research**, 280:267-76, 1995.

WOLKE, R.E; MURCHELANO, R.A; DISKSTEIN, C. & GEORGE, C.J. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates as fish health monitors. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 35:222-227, 1985.

YASUTAKE, W.T. & WALLEES, J.H. **Microscopic anatomy of salmonids: An atlas**, United states department of the interior, 87-89, 1997.

ZHOW, H.Y. & WONG, M.H. Mercury accumulation in fresh water fish with emphasis on the dietary influence. **Water research**, 17:4234-4248, 2000.

8 ANEXOS

Coloração May-Grünwald-Giemsa: Sobre a lâmina adicionou-se o corante May-Grünwald por 3 minutos. Sem retirar o corante, colocou-se água tamponada (pH = 7.0) por 1 minuto, a qual impede a precipitação do corante. Retirou-se o corante May-Grünwald e colocou-se sobre a lâmina o corante Giemsa diluído (1 gota para cada 1mL de tampão) durante 20 minutos. Retirou-se o corante e em seguida lavou-se a lâmina em água corrente.

Contagem de Células do Sangue

Eritrócitos: Preparou-se a suspensão de células diluindo 10µl de sangue em 2ml de Formol Citrato. Homogeneizou-se a suspensão e preencheu-se a câmara de Neubauer, já com a lâminula aderida. Em seguida contou-se as células em microscópio ótico (aumento de 400X). Cálculos:

Eritrócitos por µl de sangue = E.c x 5 x 10 x 200

Ou seja: número de eritrócitos contados em 1/5 de mm² x 10.000

E.c = número de eritrócitos contados em 1/5 de mm²

5 = fator de conversão para 1 mm²

10 = fator de conversão para 1 µl

200 = fator de conversão da diluição

Leucócitos: Preparou-se a suspensão de células diluindo 20µl de sangue em 1,6 ml de solução de Natt e Henrick' s com violeta de metila (NATT e HERRICK, 1952). Em seguida homogeneizou-se e preencheu-se a Câmara de Newbauer. A contagem foi realizada em microscópio de luz. Cálculos:

Leucócitos por µl de sangue = L.c. x 20 x 10/4

Ou seja: Número de leucócitos contados em 4 mm² x 50

L.c. = número de leucócitos contados em 4 mm²

10 = fator de conversão para 1 µl

20 = fator de conversão da diluição

4 = fator de conversão para 1 µl

Contagem diferencial de Leucócitos: Foram contados 200 leucócitos de cada animal. Todos os leucócitos (Neutrófilos, Eosinófilo, Basófilo, Monócitos e Linfócitos)

presentes foram considerados. Em seguida calculou-se a porcentagem de cada tipo celular em relação ao total de leucócitos.

Contagem de Trombócitos: Os trombócitos foram contados juntamente com os leucócitos (contagem diferencial). O número total de trombócitos foi calculado em relação ao número total de leucócitos contados na Câmara de Newbauer.

Hemoglobinometria: Alíquotas de 10µl de sangue foram diluídas em 2ml de solução de Drabkin. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro de onda de 540nm após 3 a 5 min. Foi feita uma curva padrão com hemoglobina humana (Labtest® Cat.47).

Determinação do Hematócrito: Os capilares foram preenchidos com sangue, aproximadamente 2/3 do tubo capilar. Em seguida centrifugou-se as amostras em 1500 rpm por 5 minutos. A leitura foi feita com auxílio da escala de leitura.

Determinação da Fragilidade Osmótica: Foram utilizados 12 tubos de ensaio para cada animal (controle e teste) em cada tubo foi adicionado uma concentração diferente de solução salina tamponada, nas seguintes concentrações, 0,10% no tubo 1 seguido de 0,20% tubo 2 / 0,30% tubo 3 / 0,35% tubo 4 / 0,40% tubo 5 / 0,45% tubo 6 / 0,50% tubo 7 / 0,55% tubo 8 / 0,60% tubo 9 / 0,65% tubo 10 / 0,75% tubo 11 e 0,85% no tubo 12. Em seguida adicionou-se em cada um dos 12 tubos de ensaio exatamente 0,05 mL de sangue. Misturou-se bem e deixou-se em repouso por 30'. Em seguida misturou-se novamente e centrifugou-se a 2.000 rpm por 10 min. Removeu-se o sobrenadante para tubos do fotocolorímetro. O aparelho foi zerado usando os tubos número 12 (concentração de 0,85%) como brancos para cada série de tubos.

Em cada caso o tubo número 1 (concentração de 0,10%) foi considerado 100% de hemólise. Fez-se a leitura dos tubos (540 nm) e os cálculos como segue o exemplo:

Tubo 12.....0 (branco)

Tubo 1.....250 (100% de hemólise)

Tubo 5.....125 (50% de hemólise)

O mesmo calculo foi feito para todos os tubos.

Extração química de mercúrio em músculo e fígado

- 1,00g de tecido;
- 1,0mL de H₂O₂ concentrado;
- 3,0mL de H₂SO₄ : HNO₃ (1:1);
- Solubilização em bloco digestor a 60°C (4h);
- 5,0mL de KmnO₄ 5%;
- Solubilização em bloco digestor a 60°C (30 min);
- Titulação com NH₄OH.HCL 12%
- Filtração em filtro Whattman;
- Aferição para volume final de 25mL;
- Análise em ICP-AES com acessório gerador vapor frio.

Processamento das peças de rim e fígado, para observação por Microscopia de Luz.

Fixador utilizado - Alfac

Técnica utilizada - Imersão

Tempo de fixação - 16 horas

Desidratação - álcool 80% por 1:30 hora

álcool 90% por 1:30 hora

álcool 95% por 1:30 hora

álcool 100% por 30 min. 3 vezes

Diafanização_- xilol + álcool por 1 hora

Xilol puro por 1 hora

Xilol puro por 15 min.

Inclusão - permanece na estufa por 2 horas.

Emblocagem - permanece na bancada por 2 horas

Trimagem - remove-se o excesso de parafina em torno do material.

Microtomia - obtenção dos cortes (5µm).

Montagem das lâminas permanentes:

Desparafinização - xilol por 5 min. 2 vezes.

Hidratação - álcool 100% por 5 min. 3 vezes

álcool 90% por 5 min.

álcool 70% por 5 min.

álcool 50% por 5 min.

água destilada por 1 min.

Coloração - Hematoxilina por 1 min

Eosina por 30 Seg.

Desidratação_- álcool 90% por 5 min.

álcool 100% por 5 min. 2 vezes

álcool + xilol por 5 min

Xilol puro por 5 min. 2 vezes

Montagem - coloca-se uma lamínula sobre o corte.

Processamento das peças de rim e fígado para observação por Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Fixador utilizado - Karnovisk

Técnica utilizada - Imersão

Tempo de fixação - 2 horas

Lavagem do fixador - lavar por 10 min. 3 vezes com tampão Cacodilato.

Pós-Fixação(Tetróxido de Ósmio) - pós-fixação com ósmio por 1 hora

Lavagem pós-fixação - lavar as peças por 10 min. em tampão cacodilato 0,1M.

- lavar as peças por 10 min. em água destilada 2 x.

Pós fixação(acetato de uranila) - pós fixação com uranila por 1 hora

Lavagem do pós fixador → lavar por 10 min. em água destilada 3 vezes.

Desidratação - álcool 30% por 10'

álcool 50% por 10'

álcool 70% por 10'

álcool 95% por 10'

álcool 100% por 20' 3X

Preparo das peças à inclusão - óxido de propileno por 10' 3 vezes.

Inclusão - óxido de propileno 1:1 resina por 1 hora

óxido de propileno 1:2 ou overnight.

resina pura 30'.

Emblocagem - polimerizar em estufa a 60°C por 24 horas.

Trimagem - remove-se o excesso de resina em volta do material.

Ultramicrotomia - obtenção dos cortes.

Contrastação - Uralina 5% por 20'.

Lavagem do material contrastado com uranila - lavar 3 vezes com água destilada, mergulhando cada telinha 10 vezes em cada beaker.

Contrastação - Reynolds por 20'.;

Lavagem do material contrastado com Reynolds - o mesmo procedimento usado para uranila.