

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAIARA VICENTINI

**CÁDMIO E SEU POTENCIAL EFEITO TÓXICO EM FÊMEAS DE *Rhamdia quelen*  
(SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE), COM ÊNFASE NO EIXO REPRODUTIVO**

CURITIBA

2017

MAIARA VICENTINI

**CÁDMIO E SEU POTENCIAL EFEITO TÓXICO EM FÊMEAS DE *Rhamdia quelen*  
(SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE), COM ÊNFASE NO EIXO REPRODUTIVO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Cristina da Silva de Assis

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Vicentini, Maiara

Cádmio e seu potencial efeito tóxico em fêmeas de *Rhamdia quelen*  
(Siluriformes: Heptapteridae), com ênfase no eixo reprodutivo. / Maiara  
Vicentini. – Curitiba, 2017.

59 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Helena Cristina da Silva de Assis

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e  
Conservação.

1. Ecotoxicologia. 2. Peixe. 3. Metais. I. Título II. Assis, Helena  
Cristina da Silva de. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

CDD (20. ed.) 574.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MAIARA VICENTINI** intitulada: "**Cádmio e seu potencial efeito tóxico em fêmeas de *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE), com ênfase no eixo reprodutivo**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação.

Curitiba, 21 de Fevereiro de 2017.

*Helena C. de M. de Assis*  
HELENA CRISTINA DA SILVA DE ASSIS  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

*Viviane Prodocimo*  
VIVIANE PRODOCIMO  
Avaliador Interno (UFPR)

*Claudia Bueno dos Reis Martinez*  
CLAUDIA BUENO DOS REIS MARTINEZ  
Avaliador Externo (UEL)



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por mostrar que sou mais forte do que penso e por não me deixar desistir.

À minha família, em especial aos meus pais, por entenderem minhas ausências e pelo amor que sempre me deram.

À professora Helena, pela oportunidade e por ser um exemplo de ética e profissionalismo que todos deveriam seguir.

Aos meus colegas de laboratório, por tornarem o ambiente de trabalho um local aconchegante. Ana, Sabrina, Francielle, Mayara, Maiara, Talitha, Lilian, Fernando e João. Obrigada por cada conversa, cada risada, pelos brigadeiros, pelos conselhos e discussões e por toda ajuda nos experimentos. Sem uma equipe, como a que nós formamos, esse trabalho não seria possível. Um agradecimento especial à Cris, por ouvir todos meus desabafos e não se irritar com as trilhões de dúvidas semanais, e a Letícia, por toda a ajuda relacionada à parte experimental e a biologia molecular.

Aos colegas do laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, em especial ao Flávio e ao Toni, por toda a ajuda em experimentos, nas análises genotóxicas e demais questionamentos.

A todos os meus demais amigos, sejam da graduação, da pós-graduação ou da vida, em especial ao Vinícius, Débora, Carol, Marina e Jaque. Obrigada pelas conversas (mesmo que em outro país) e pelos puxões de orelha ... Vocês são muito importantes para mim.

A todo o pessoal do departamento de Farmacologia. Por cada tempinho no café, por cada bom dia nos corredores e por cada palavra de incentivo.

Ao professor Luís Fernando Fávoro, por toda a ajuda nas análises histológicas, à Caroline Gomes por nos ceder os reagentes utilizados e ao pessoal do Scanner de Lâminas pelas fotos.

À Loana e ao professor Marco, pela colaboração nas análises químicas da água e à professora Cláudia Martinez e ao Dr. Wagner Ezequiel Risso, pela análise química dos tecidos.

Ao professor Maurício Moura por toda paciência e ajuda de sempre com a parte estatística.

Ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária e ao Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, por ceder os equipamentos utilizados nas análises de biologia molecular.

Ao pessoal da Divisão de Gestão Ambiental da Universidade, por toda atenção que tiveram conosco no descarte de nossos resíduos de cádmio.

Aos peixes que foram utilizados neste trabalho, afinal, sem eles essa dissertação não seria possível.

Ao programa de Pós Graduação em Ecologia e Conservação, todos os professores, funcionários e colegas, por todos os ensinamentos durante esses dois anos.

À Universidade Federal do Paraná, minha casa há sete anos, que me proporcionou tanto o crescimento profissional quanto o pessoal.

À banca, pelas sugestões para este trabalho.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da Bolsa e equipamento de scanner de fotos mantido no setor, e ao CNPq pelo auxílio financeiro do projeto.

Maiara

## RESUMO

O aumento populacional tem diversas consequências para o ambiente, como a poluição de ecossistemas aquáticos. Dentre os poluentes que podem alcançar esses ambientes estão os metais, que são classificados como desreguladores endócrinos e são capazes de afetar parâmetros reprodutivos das espécies. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar os potenciais efeitos do metal cádmio sobre parâmetros relacionados ao eixo de regulação da reprodução Hipotálamo-Pituitária-Gônada-Fígado (HPGF), em fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas às concentrações nominais de 0,1; 1; 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , por via hídrica. Após 15 dias, foi coletado o sangue para quantificação hormonal e análises genotóxicas; o hipotálamo para a expressão gênica da aromatase cerebral; a gônada para as análises bioquímicas, genotóxicas e histológicas; e o fígado para as análises bioquímicas e genotóxicas. O cádmio foi quantificado na água, gônada e fígado. Os níveis plasmáticos de estradiol e testosterona e os índices gonado e hepatossomático não apresentaram diferenças significativas se comparados ao controle. A expressão da aromatase cerebral, apesar de não apresentar diferença significativa, mostrou uma redução expressiva da expressão nos últimos tratamentos. O cádmio foi detectado no tecido gonadal e em maiores concentrações no tecido hepático. Assim, a maioria dos biomarcadores bioquímicos e genotóxicos testados nas gônadas não sofreram alterações. Apesar de não apresentar alterações genotóxicas, o cádmio aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase do sistema antioxidante do fígado em 1, 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Esta alteração não foi suficiente para evitar lipoperoxidação em 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , visto que a catalase e a glutathione peroxidase não foram alteradas, podendo ter ocasionado uma superprodução de peróxido de hidrogênio. Outro biomarcador testado, as metalotioneínas, foi reduzido em 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  na gônada e em 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  no fígado. Estas alterações hepáticas podem causar efeitos reprodutivos, visto que este órgão é importante na produção da vitelogenina, que pode ser alterada pela peroxidação lipídica por ter lipídios em sua composição. Assim, as concentrações de cádmio testadas, e que já foram encontradas em ecossistemas aquáticos dulcícolas brasileiros, podem afetar o eixo de regulação reprodutiva HPGF de fêmeas da espécie nativa *R. quelen*.

Palavras-chave: Desregulação endócrina, ecotoxicologia, jundiá, metais, peixes

## ABSTRACT

The population increase has several consequences for the environment, such as pollution of aquatic ecosystems. Metals are one of these pollutants, which are classified as endocrine disruptors and are capable of affecting the reproductive parameters of the species. In this study, the objective was evaluate the potential effects of cadmium on parameters related to the reproduction regulation axis of Hypothalamic-Pituitary-Gonadal-Liver (HPGL) in females of *Rhamdia quelen* exposed to nominal concentrations 0.1; 1; 10 and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  of cadmium, by water. After 15 days, the blood was collected for hormonal quantification and genotoxic analyses; the hypothalamus for the gene expression of brain aromatase; the gonad for the biochemical, genotoxic and histological analyses; and the liver for biochemical and genotoxic analyzes. Water, gonad and liver samples were taken for cadmium quantification. Plasma levels of estradiol and testosterone and gonado and hepatosomatic indexes didn't present significant differences when compared to control. The expression of the brain aromatase, although didn't present significant difference, there was an expressive expression reduction expression at the last treatments. Cadmium was detected in gonadal tissue and in higher concentrations in the hepatic tissue. Thus, most of the biochemical and genotoxic biomarkers tested in the gonads didn't change. Although didn't present genotoxic alterations, cadmium increased superoxide dismutase activity of the liver antioxidant system in 1, 10 and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . This alteration wasn't enough to avoid lipoperoxidation in 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ., since catalase and glutathione peroxidase weren't altered, it could have caused overproduction of hydrogen peroxidase. Another biomarker tested, the metallothioneins, were reduced in 10 and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  in the gonad and 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  in the liver. These liver changes can cause reproductive effects, since this organ is important in vitellogenin production, which can be altered by lipid peroxidation because it has lipids in its composition. Thus, the tested cadmium concentrations, which already have been found in the Brazilian freshwater ecosystems, may affect the reproductive regulation axis HPGL of females of the native species *R. quelen*.

Key words: Endocrine disruption, ecotoxicology, jundiá, metals, fish

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Representação simplificada da regulação da reprodução pelo eixo Hipotálamo-Pituitária-Gônada-Fígado (HPGF) em peixes .....	20
FIGURA 2	- Exemplar de fêmea de <i>Rhamdia quelen</i> .....	24
FIGURA 3	- Gônada (A) e fígado (B) de fêmea de <i>Rhamdia quelen</i> .....	26
FIGURA 4	- Encéfalo de <i>Rhamdia quelen</i> , com seta indicando o hipotálamo em formato de U ou ferradura .....	26
FIGURA 5	- Concentrações médias de cádmio e mínimos/máximos, em $\mu\text{g.g}^{-1}$ , em gônada e fígado de fêmeas expostas ao cádmio (n = 2) .....	37
FIGURA 6	- Índice gonadossomático (A) e hepatossomático (B) de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao cádmio por 15 dias (n = 6 a 10). Os resultados estão graficamente expressos em média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) .....	38
FIGURA 7	- Níveis plasmáticos de estradiol (A) e testosterona (B) de fêmeas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao cádmio por 15 dias (n = 4 a 5). Os resultados estão graficamente expressos em média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) .....	38
FIGURA 8	- Expressão relativa da aromatase cerebral de fêmeas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao cádmio por 15 dias (n = 4 a 5). Os resultados estão graficamente expressos em média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) .....	39
FIGURA 9	- Biomarcadores bioquímicos GST (A), GPx (B), LPO (C), SOD (D), GSH (E) e MT (F), em gônadas de fêmeas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao cádmio por 15 dias (n = 6 a 10). Os resultados estão graficamente expressos em média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) .....	40

- FIGURA 10 - Biomarcadores bioquímicos EROD (A), GST (B), GSH (C), SOD (D), CAT (E), em fígado de fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio por 15 dias (n = 6 a 10). Os resultados estão graficamente expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05) ..... 41
- FIGURA 11 - Biomarcadores bioquímicos GPx (A), LPO (B), PCO (C) e MT (D), em fígado de fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio por 15 dias (n = 6 a 10). Os resultados estão graficamente expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05) ..... 42
- FIGURA 12 - Alterações morfológicas nucleares (A) e danos no DNA em sangue (B), gônada (C) e fígado (D) de fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio por 15 dias (n = 6 a 10). Os resultados estão graficamente expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05) ..... 43
- FIGURA 13 - Histologia de gônadas de fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio. A – Folículos ovarianos pré-vitelogênicos; B – Folículos ovarianos em vitelogênese; C – Folículos com vesículas citoplasmáticas; D – Folículos com grânulos de vitelo. Todas as estruturas citadas estão apontadas por seta. Coloração H/E ..... 44
- FIGURA 14 - Representação gráfica de NMDS, com todos os biomarcadores compilados em duas dimensões, sendo que as coordenadas representam os escores da análise. Controle = Controle; 0,1 = 0,1 µg.L<sup>-1</sup>; 1 = 1 µg.L<sup>-1</sup>; 10 = 10 µg.L<sup>-1</sup>; e 100 = 100 µg.L<sup>-1</sup> ..... 45

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Concentrações de cádmio dos tecidos gonadal e hepático, por tratamento, expressos em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de tecido seco (n = 2) .	36
TABELA 2	- Frequência de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de fêmeas de <i>Rhamdia quelen</i> expostas ao cádmio por 15 dias .....	43

## LISTA DE SIGLAS

$\mu\text{g.L}^{-1}$	- Microgramas por litro
ALFAC	- Álcool, formol e ácido acético
ANOVA	- Análise de variância
AROA	- Aromatase gonadal
AROB	- Aromatase cerebral
BHT	- Hidroxitolueno butilado
CAT	- Catalase
Cd	- Cádmio
CdCl <sub>2</sub>	- Cloreto de cádmio
cDNA	- Dna complementar
CDNB	- 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	- Comitê de Ética em Experimentação Animal
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido dextrorribonucleico
DNPH	- 2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB	- Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	- Ácido etileno-diamino-tetra-acético
ERO	- Espécie reativa de oxigênio
EROD	- Etoxiresorufina-O-deetilase
FSH	- Hormônio folículo estimulante
GLM	- Modelo linear generalizado
GnRH	- Hormônio liberador de gonadotrofina
GPx	- Glutaciona peroxidase
GSH	- Glutaciona reduzida
GSSG	- Glutaciona oxidada
GST	- Glutaciona S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- Ácido sulfúrico
HE	- Hematoxilina-eosina
HPGF	- Hipotálamo-pituitária-gônada-fígado

HNO <sub>3</sub>	- Ácido nítrico
ICP-OES	- Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
IGS	- Índice gonadosomático
IHS	- Índice hepatossomático
IPCS	- Programa Internacional de Segurança Química
LH	- Hormônio luteinizante
LPO	- Liporeroxidação
mA	- Miliampere
mg.L <sup>-1</sup>	- Miligramas por litro
MT	- Metalotioneínas
NaCl	- Cloreto de sódio
NADPH	- Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NaOH	- Hidróxido de sódio
ng.mL <sup>-1</sup>	- Nanogramas por mililitros
NIST	- Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
NMDS	- Escalonamento multidimensional não métrico
PCO	- Proteínas carboniladas
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PERMANOVA	- Análise Multivariada Permutacional de Variância
pg.mL <sup>-1</sup>	- Picogramas por mililitro
ppm	- Partes por milhão
RNA	- Ácido ribonucleico
SCGE	- Ensaio de eletroforese de célula única
SOD	- Superóxido dismutase
TCA	- Ácido tricloroacético
USEPA	- Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	POLUIÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS .....	16
2.2	CÁDMIO .....	17
2.3	USO DE PEIXES COMO ORGANISMOS TESTES .....	18
2.4	BIOMARCADORES .....	19
2.4.1	Biomarcadores bioquímicos .....	20
2.4.2	Biomarcadores genotóxicos .....	22
2.4.3	Biomarcadores morfológicos .....	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	OBJETIVO GERAL .....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
4.1	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS .....	24
4.2	DESENHO EXPERIMENTAL .....	24
4.3	CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO .....	26
4.3.1	Água .....	26
4.3.2	Gônada e Fígado .....	27
4.4	ÍNDICES GONADOSSOMÁTICO E HEPATOSSOMÁTICO .....	27
4.5	QUANTIFICAÇÃO HORMONAL .....	28
4.6	BIOMARCADORES MOLECULARES .....	28
4.7	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	29
4.7.1	Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) .....	29
4.7.2	Glutathione-S-Transferase (GST) .....	30
4.7.3	Superóxido dismutase (SOD) .....	30
4.7.4	Catalase (CAT) .....	30
4.7.5	Glutathione Peroxidase (GPx) .....	31
4.7.6	Glutathione Reduzida (GSH) .....	31
4.7.7	Lipoperoxidação (LPO) .....	31

4.7.8	Proteínas carboniladas (PCO) .....	32
4.7.9	Metalotioneínas (MT) .....	32
4.7.10	Concentração de proteínas .....	33
4.8	BIOMARCADORES GENOTÓXICOS .....	33
4.8.1	Alterações morfológicas nucleares .....	33
4.8.2	Ensaio cometa .....	34
4.9	BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS .....	34
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
5.1	CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO .....	36
5.1.1	Água .....	36
5.1.2	Gônada e fígado .....	36
5.2	ÍNDICES GONADOSSOMÁTICO E HEPATOSSOMÁTICO .....	37
5.3	QUANTIFICAÇÃO HORMONAL .....	37
5.4	BIOMARCADORES MOLECULARES .....	38
5.5	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	39
5.5.1	Gônada .....	39
5.5.2	Fígado .....	39
5.6	BIOMARCADORES GENOTÓXICOS .....	42
5.7	BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS .....	44
5.8	ANÁLISE MULTIVARIADA .....	45
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por recursos que satisfaçam as necessidades humanas e o aumento das atividades antrópicas, causado pela expansão populacional, têm a degradação ambiental como grave consequência. A água é um dos recursos naturais mais afetados, visto que é usada para atividades agropecuárias, em indústrias e para a geração de energia, além ser afetada pela poluição (GARCIAS; SANCHES, 2009).

Diferentes classes de poluentes podem afetar esse ambiente aquático e causar danos à biota, bem como diminuir sua qualidade para o consumo humano. Dentre elas encontram-se os desreguladores endócrinos, que são capazes de interferir em processos endógenos relacionados à reprodução de organismos, acarretando em problemas em níveis biológicos superiores, como populações e comunidades. Metais são exemplos desse tipo de substância, sendo classificados como desreguladores sintéticos (BILA; DEZOTTI, 2007).

Em baixas concentrações, alguns metais são essenciais aos organismos por apresentarem funções biológicas, como o zinco e o cobre. Outros apresentam efeitos adversos, como é o caso do cádmio, chumbo e mercúrio (FERREIRA; HORTA; CUNHA, 2010). O cádmio é um metal encontrado no ambiente proveniente de resíduos de mineração, fabricação de tintas, em pigmentos e também devido ao descarte incorretos de pilhas, baterias e ligas metálicas (GUMPUR et al., 2015). Por ser persistente no ambiente e ter capacidade de se bioacumular em organismos (ALMEIDA et al., 2002), é necessário se avaliar os efeitos do cádmio a nível molecular e celular, antes que esse metal afete todo o ecossistema (ARIAS et al., 2007).

Efeitos desse metal sobre parâmetros fisiológicos, genotóxicos e oxidativos já foram avaliados na espécie de peixe nativa *Rhamdia quelen*, também conhecida como jundiá (PRETTO et al., 2011; PRETTO et al., 2014; PEREIRA et al., 2016). Com relação à reprodução, há relatos que a partir de 20 e 28,6 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, o cádmio influencia espermatozoides e ovócitos de *R. quelen* (WITECK et al., 2011).

Considerando a contaminação ambiental por metais e os efeitos já descritos em organismos aquáticos, será que baixas concentrações de cádmio são suficientes para alterar parâmetros do eixo reprodutivo da espécie nativa *Rhamdia quelen* e consequentemente afetar as próximas gerações da espécie?

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 POLUIÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS

A expansão da ocupação humana tem como consequência o aumento da demanda por diversos recursos ambientais importantes, como a água (GARCIAS; SANCHES, 2009). No entanto, esse aumento populacional maior do que a natureza pode suportar leva à escassez desse recurso (MORAES; JORDÃO, 2002). Além deste problema, o ambiente aquático tem sofrido com o aumento da concentração e da variedade de poluentes, o que afeta gravemente a qualidade dessa água.

Esses poluentes são provenientes das mais diferentes fontes, como efluentes industriais e hospitalares, atividades agropecuárias, descarte incorreto de lixo tóxico, derrames de petróleo e atividades de mineração. Nem todos são despejados diretamente na água, porém alguns podem alcançar o meio aquático por meio da chuva, irrigação de áreas agrícolas, por percolação do solo ou volatilização (ARIAS et al., 2007).

Dentre as categorias recentes de poluentes encontram-se os desreguladores endócrinos. Pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA), estes são “agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais” (USEPA, 1997). O IPCS (Programa Internacional de Segurança Química), juntamente com outras instituições, definiu esses compostos como “substâncias exógenas que alteram o sistema endócrino e conseqüentemente causam efeitos adversos na saúde de organismos, ou em sua prole, ou em (sub)populações” (COM, 1999). Em resumo, são substâncias que interferem na função normal dos hormônios (KABIR; RAHMAN; RAHMAN et al, 2015).

Desreguladores endócrinos podem atuar no hipotálamo, pituitária, gônada ou fígado, causando alterações na taxa de desenvolvimento gonadal (KIME; NASH, 1999). Dentre as diversas substâncias classificadas como desreguladores encontram-se os metais, como o cádmio, que são chamados de desreguladores sintéticos (BILA; DEZOTTI, 2007).

## 2.2 CÁDMIO

O cádmio (Cd) é um metal não essencial encontrado em pigmentos, em lixo tóxico descartado incorretamente, em resíduos associados à mineração, fundição e galvanoplastia e também na fumaça do tabaco (DAS; MUKHERJEE, 2013). O cádmio foi descoberto em 1.817, tornou-se muito importante para a indústria e é um dos metais mais tóxicos que pode afetar o ambiente, mesmo em baixas concentrações (MÉNDEZ-ARMENTA; RÍOS, 2007; ZARCO-FERNÁNDEZ et al., 2016).

No Brasil, a resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), estabelece valores máximos de cádmio total para a água doce. O limite é de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  para água doce de classes 1 e 2, destinadas ao abastecimento humano após tratamento simplificado e convencional e à recreação primária, e de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  para classe 3, destinadas ao abastecimento humano após tratamento convencional ou avançado e à recreação secundária (CONAMA, 2005). Há relatos de hepato e nefrotoxicidade em peixes causadas por essas concentrações (PEREIRA et al., 2016). No entanto, concentrações maiores que as permitidas já foram encontradas em ecossistemas aquáticos dulcícolas brasileiros, que vão desde 14 até  $813 \mu\text{g.L}^{-1}$  (RIETZLER; FONSECA; LOPES, 2001; LIMA et al., 2015).

Na literatura, já foram relatados efeitos endócrinos de diferentes concentrações de cádmio em diversos organismos, como: alterações em sistema reprodutivo de diferentes espécies de peixes (CANAPA et al., 2007; DAS; MUKHERJEE, 2013; LUO et al., 2015), na vitelogênese de insetos (CERVERA et al., 2006), em tecido reprodutivo de aves e mamíferos (MARETTOVÁ; MARETTA; LEGÁTH, 2015) e na metamorfose e diferenciação sexual de anfíbios (SHARMA; PATIÑO, 2010).

No caso de peixes, parte desses trabalhos é com machos, por estes serem mais indicados para expressar efeitos reprodutivos de determinadas substâncias, como as estrogênicas (AMUTHA; SUBRAMANIAN, 2013). Entretanto, é importante estudar seus efeitos também em fêmeas, visto que esses poluentes podem ser transferidos para os filhotes ou afetarem fatores maternos que são responsáveis pelo desenvolvimento precoce do embrião (BILA; DEZOTTI, 2007; BOBE; LABBÉ, 2010). Em fêmeas de carpa *Cyprinus carpio* (CYPRINIFORMES: CYPRINIDAE), espécie exótica cultivada no Brasil, o cádmio foi capaz de inibir a atividade da aromatase gonadal estimulada por hormônio luteinizante e a expressão do gene (DAS; MUKHERJEE, 2013). Enquanto que em tilápia vermelha, o cádmio foi capaz de inibir

a desova de fêmeas, prejudicando o desenvolvimento ovariano (EL-EBIARY; WAHBI; EL-GREISY, 2013). Porém, dos estudos de fêmeas existentes, a maioria é com espécies exóticas, tornando importante o estudo com espécies nativas.

### 2.3 USO DE PEIXES COMO ORGANISMOS TESTES

Como o ecossistema aquático é um dos ambientes que mais recebe carga de poluentes, os peixes se tornaram organismos de risco primário para desreguladores endócrinos (HACHFI et al., 2012). Algumas espécies são fáceis de serem coletadas em campo, e outras podem se adaptar mais facilmente às condições laboratoriais. Além disso, tanto em experimento de campo quanto de laboratório, é possível coletar diferentes tecidos para análise de parâmetros relacionados à fisiologia desses animais. Por esses e outros motivos, os peixes tornaram-se organismos-modelo em estudos ecotoxicológicos, isto é, em estudos dos efeitos dos mais diversos poluentes.

Dentre as espécies encontradas no Brasil, e utilizadas para estudos de toxicidade, está a *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), conhecida popularmente como jundiá. Esses animais são encontrados do sul da América do Sul ao sul do México. *Rhamdia quelen* é espécie ovulípara, não possui cuidado parental e alcança maturidade sexual com um ano de vida, são animais onívoros, de hábito noturno, que habitam lugares calmos e profundos (GOMES et al., 2000).

Jundiás já foram utilizados para avaliar o efeito tóxico de xenobióticos em diferentes condições experimentais. Com relação aos metais, Muñoz et al. (2015) aplicaram biomarcadores histológicos para avaliar o efeito de chumbo em diferentes tecidos. Pereira et al. (2016) testaram os efeitos do cádmio sobre parâmetros fisiológicos e genotóxicos. Pretto et al. (2014) testaram os efeitos do mesmo metal sobre o metabolismo de carboidratos e proteínas, enquanto Pretto et al. (2011) testaram os efeitos das mesmas concentrações em parâmetros oxidativos. Efeitos reprodutivos do cádmio foram avaliados por Witeck et al. (2011), por meio de motilidade espermática, fertilização de ovócitos e eclosão de ovos. Esses trabalhos demonstram que o uso de um conjunto de biomarcadores em peixes permite avaliar diferentes efeitos de poluentes.

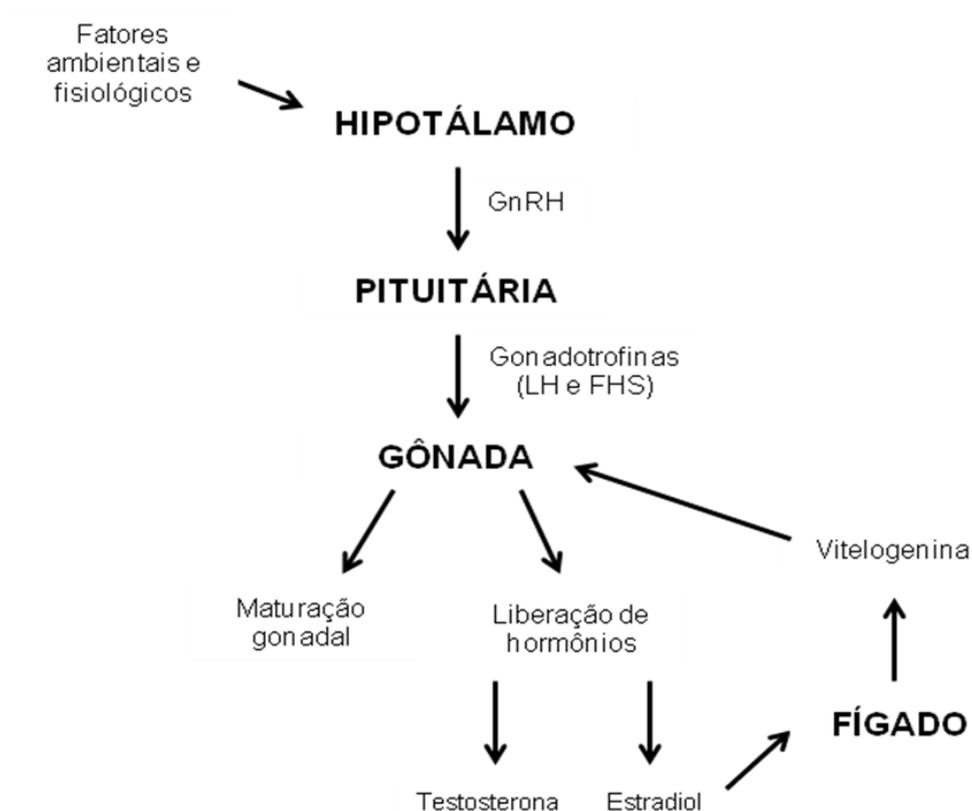
## 2.4 BIOMARCADORES

Biomarcadores ambientais são respostas biológicas quantificáveis dos organismos frente à poluição ambiental, que podem ser celulares, bioquímicas, moleculares ou fisiológicas (LAM; GRAY, 2003). Neste sentido, os peixes possuem diversos parâmetros mensuráveis que respondem à contaminação ambiental e que podem indicar alterações a nível reprodutivo, provocadas pelos desreguladores endócrinos.

A reprodução de peixes é regulada pelo eixo Hipotálamo-Pituitária-Gônada-Fígado (HPGF, FIGURA 1). Fatores ambientais, como o fotoperíodo, e fisiológicos, como os neurotransmissores, causam diferentes estímulos no cérebro desses animais. O hipotálamo, localizado na base do cérebro, produz o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que estimula a liberação de duas gonadotrofinas pela pituitária: o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Essas gonadotrofinas estimulam a maturação gonadal e a liberação de hormônios esteroides pelas gônadas (HACHFI et al., 2012). Um desses hormônios é o estradiol, responsável por regular a produção de vitelogenina. Esta é uma proteína sintetizada no fígado e transportada por corrente sanguínea até as gônadas, nas quais será a precursora do vitelo, cuja função é servir de reserva energética para os embriões nos ovócitos (CANAPA et al., 2007). Dessa forma, a quantificação ou detecção de hormônios e efeitos no tecido de produção de vitelogenina podem ser considerados como biomarcadores de desregulação endócrina.

Os níveis de estradiol são relacionados com a aromatase, uma enzima do complexo do citocromo P450 que é responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos. Em teleósteos, esta é expressa por dois diferentes genes que codificam para duas diferentes isoformas: *cyp19a1a* e *cyp19a1b* (MILLS et al., 2014). A *cyp19a1a* é mais encontrada nas gônadas (AROA), sendo a responsável pela conversão hormonal diretamente neste tecido. Já a *cyp19a1b*, a aromatase cerebral (AROB), além da função de diferenciação sexual, também é responsável pela neurogênese, pelo reparo cerebral e pelo comportamento sexual dos organismos (BRETON et al., 2015). Essa enzima pode ser avaliada por diferentes métodos, como a expressão gênica por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real (HINFRAY et al., 2008).

FIGURA 1: Representação simplificada da regulação da reprodução pelo eixo Hipotálamo-Pituitária-Gônada-Fígado (HPGF) em peixes.



FONTE: Baseada em HACHFI et al. (2012).

Dessa maneira, muitos são os parâmetros relacionados ao eixo HPGF que podem ser utilizados como biomarcadores de desregulação endócrina. A integridade e funcionamento dos tecidos a ele relacionados também podem, então, serem analisados como forma de entender os mecanismos e níveis pelos quais um desregulador endócrino está agindo. Biomarcadores bioquímicos, genotóxicos e morfológicos podem ser empregados para se avaliar esse tipo de efeito.

#### 2.4.1 Biomarcadores bioquímicos

Ao ser absorvido pelo organismo, um xenobiótico pode passar pelo sistema de biotransformação. Este é composto por duas fases de reação, I e II, compostas por diferentes enzimas que podem ser utilizadas para se avaliar o efeito do poluente nesse sistema. Na fase I, ocorrem reações de oxidação, redução e hidrólise, e nela encontra-se a etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), que faz parte do citocromo P450. Na fase II, ocorrem reações de glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação e

conjugação com a glutatona. A glutatona S-transferase (GST) é uma enzima de fase II que conjuga o xenobiótico, utilizando como co-fator glutatona reduzida (GSH), tornando o composto mais hidrofílico para ser excretado (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Outra forma de avaliar os efeitos xenobióticos, no caso de metais, é por meio das metalotioneínas. Estas representam um conjunto de proteínas de baixo peso molecular, responsáveis pelo transporte e armazenamento de metais essenciais, pela desintoxicação de metais não essenciais, bem como pela proteção contra espécies reativas de oxigênio (HIDALGO et al., 2001).

Alguns xenobióticos também podem produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), combatidas pelo sistema antioxidante dos organismos. Entretanto, um poluente pode afetar os componentes desse sistema, ou produzir ERO em quantidade muito alta. O cádmio, por exemplo, pode produzir espécies reativas de oxigênio por interações indiretas em pontos críticos das células ou por inibir mecanismos de proteção (MÉNDEZ-ARMENTA; RÍOS, 2007). Quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO e a ação do sistema antioxidante, causando danos celulares, o organismo entra em um quadro de estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2011).

O sistema antioxidante é composto por diferentes fatores enzimáticos e não-enzimáticos, e entre eles se encontram as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). A SOD é uma metaloenzima, responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. No entanto, o peróxido de hidrogênio ainda é tóxico para a célula e por isso precisa ser degradado. Essa degradação é realizada por duas diferentes enzimas: CAT e GPx. A CAT é responsável por decompor este peróxido em oxigênio e água, quando este está em grandes quantidades na célula. Já a GPx utiliza a GSH como co-fator e, além de degradar peróxido de hidrogênio, também é responsável por combater outros peróxidos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; LOPEZ-MARTINEZ et al., 2008).

Quando esse sistema antioxidante falha ou é insuficiente para combater as ERO, alguns danos em lipídios e proteínas podem ser causados. A lipoperoxidação (LPO) ocorre por reação em cadeia, formando radicais e hidroperóxidos durante o processo e pode afetar membranas celulares, sendo considerado um dano importante provocado por poluentes (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). A formação de proteínas carboniladas (PCO) é

outro dano ocasionado por ERO, por meio da introdução de grupos carbonilas, como cetonas e aldeídos reativos (MØLLER; ROGOWSKA-WRZESINSKA; RAO, 2011).

#### 2.4.2 Biomarcadores genotóxicos

A detecção dos efeitos de agentes genotóxicos presentes no ambiente pode ser feita por diferentes metodologias e tem se mostrado um método de avaliação adequado por detectar efeitos em baixas concentrações (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009). A análise de alterações nucleares em eritrócitos, como a presença de micronúcleos, é uma técnica sensível que pode indicar danos mutagênicos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Já a análise de quebra de fitas de DNA avalia tanto efeitos oxidativos, como também pode indicar a mutagenicidade de um composto. Esta pode ser realizada por meio da técnica de ensaio de eletroforese em gel de célula única (SCGE - *Single Cell Gel Electrophoresis*), também chamada de ensaio cometa (LEE et al., 1996).

#### 2.4.3 Biomarcadores morfológicos

Os processos pelos quais um xenobiótico passa no interior da célula podem causar danos observados a nível morfológico. A histopatologia pode indicar injúrias teciduais ocasionadas durante este processo (AARAB; GODAL; BECHMANN, 2011; CARRASCHI et al., 2012).

O cádmio, ao entrar no organismo pelas brânquias, se liga às proteínas plasmáticas no sangue e é transportado ao fígado. Chegando neste órgão, o complexo é degradado, o Cd é liberado e posteriormente se acumula nos rins (NOGAMI et al., 2000; NORDBERG, 2009). No entanto, pequenas concentrações já foram encontradas em gônadas (LÜ et al., 2012). Como a gônada é um órgão importante para a transferência de contaminação para gerações seguintes (TERRA et al., 2008), principalmente no caso de fêmeas, estudos histológicos são importantes por indicar possíveis alterações na estrutura desse tecido e no desenvolvimento sexual desses organismos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial tóxico do cádmio em fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*), por contaminação hídrica, com ênfase no eixo Hipotálamo-Pituitária-Gônada-Fígado.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o cádmio na água, gônada e fígado de fêmeas expostas ao cádmio e indicar em qual tecido este metal está se bioconcentrando;
- Verificar possíveis alterações no estágio reprodutivo por meio dos índices gonadossomático e hepatossomático e da histologia gonadal de fêmeas expostas ao cádmio;
- Verificar o efeito do cádmio nos níveis plasmáticos de estradiol e testosterona, bem como na expressão da enzima aromatase cerebral presente no hipotálamo de fêmeas expostas ao cádmio;
- Verificar o potencial genotóxico do cádmio em sangue, gônada e fígado de fêmeas;
- Verificar os possíveis danos bioquímicos em gônada e fígado de fêmeas expostas ao cádmio, para inferir sobre os possíveis efeitos destes nas próximas gerações da espécie.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizadas 50 fêmeas adultas de *Rhamdia quelen* provenientes de piscicultura localizada em Toledo - PR (FIGURA 2), com as medidas (média  $\pm$  erro padrão): peso =  $70,50 \pm 6,10$  g e comprimento total =  $20,00 \pm 0,53$  cm. Esses animais foram alocados no Laboratório de Toxicologia Ambiental, em tanques de polipropileno de cor escura, com capacidade para 100 litros, contendo água filtrada. Durante o período de 30 dias de aclimatação, os tanques foram mantidos com aeração constante, a sala sob condições controladas de temperatura ( $26 \pm 2$  °C) e fotoperíodo (12 horas claro / 12 horas escuro) e os animais alimentados diariamente com ração comercial (MP31, Primor, Brasil). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob o nº 912.

FIGURA 2: Exemplar de fêmea de *Rhamdia quelen*.



FONTE: O autor

### 4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Após o período de aclimatação, os peixes foram expostos aos tratamentos por via hídrica, nos mesmos tanques de polipropileno, com 75 litros de solução teste. Foram usadas quatro concentrações nominais de cádmio (Cd) sendo elas 0,1; 1; 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Essas concentrações foram escolhidas com base na legislação, visto que 1 e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  são os valores máximos de cádmio total permitidos pelo CONAMA (CONAMA, 2005). Foi utilizado também um grupo controle, o qual continha apenas água filtrada, sem adição de cádmio. A solução de cádmio ( $400 \text{ mg.L}^{-1}$ ) utilizada

durante o experimento foi feita a partir de uma solução padrão de  $\text{CdCl}_2$  (Sigma-Aldrich) de  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ .

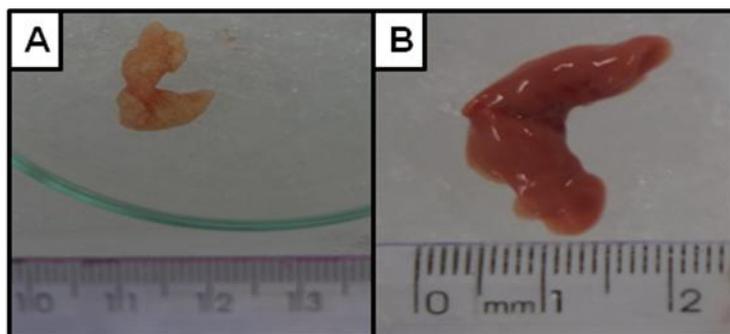
O experimento foi realizado em duplicata, com condições controladas de temperatura e fotoperíodo, totalizando 10 animais por tratamento, que foram alimentados diariamente com ração comercial. A cada 24h, 1/3 da água foi trocada (25 L), com reposição total do poluente, ou seja, um bioensaio semi-estático. Para quantificação de cádmio total, foram retiradas amostras de água nos seguintes tempos de experimento: 0 h, 24 h, 48 h, 7 dias e 14 dias.

Os parâmetros de qualidade da água como nitrito, oxigênio dissolvido, amônia e pH foram avaliados durante o experimento, por meio de kit testes Labcon®. Os valores (média  $\pm$  erro padrão) desses parâmetros foram: nitrito ( $1,19 \pm 0,26$  ppm), oxigênio dissolvido ( $5,24 \pm 0,99$  ppm), amônia tóxica ( $<1,5$  ppm) e pH ( $6,7 \pm 0,02$ ), sendo todos considerados adequados.

Após 15 dias de exposição, os animais foram anestesiados com benzocaína 1% e tiveram o sangue coletado, separado para as análises genotóxicas e posteriormente foi centrifugado e o plasma destinado à quantificação hormonal. Após a retirada de sangue, a secção medular foi realizada como forma de eutanásia e os animais foram medidos e pesados. Então, a gônada (FIGURA 3A), o fígado (FIGURA 3B) e o hipotálamo (FIGURA 4) foram retirados.

A gônada foi destinada aos biomarcadores bioquímicos (GST, SOD, GPx, GSH, LPO e MT), ao biomarcador genotóxico (ensaio cometa), histologia e dois *pools* de cinco animais para a quantificação química. O fígado foi destinado aos biomarcadores bioquímicos (EROD, GST, SOD, CAT, GPx, GSH, LPO, PCO e MT), ao biomarcador genotóxico (ensaio cometa) e dois *pools* de cinco animais para a quantificação química. E o hipotálamo foi armazenado para a expressão da aromatase cerebral.

FIGURA 3: Gônada (A) e fígado (B) de fêmea de *Rhamdia quelen*.



FONTE: O autor.

FIGURA 4: Encéfalo de *Rhamdia quelen*, com seta indicando o hipotálamo em formato de U ou ferradura.



FONTE: O autor.

### 4.3 CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO

Tubos de 50 ml passaram pelo processo de descontaminação de metais, o qual consistiu na lavagem por Extran 3 %, seguido de 24h em ácido nítrico, para o armazenamento das amostras destinadas à quantificação química.

#### 4.3.1 Água

Durante os tempos de exposição 0 h, 24 h, 48 h, 7 dias e 14 dias, 50 ml de água de cada tratamento foram coletadas para a quantificação de cádmio. Essas amostras foram fixadas com 100  $\mu$ l de ácido nítrico e mantidas à 4°C até a

quantificação do cádmio total. Para este procedimento foi utilizada uma solução padrão contendo  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$  de Cd (AccuStandard), preparada com água deionizada de sistema Mili-Q. A curva analítica, incluindo o branco, foi preparada em meio de  $\text{HNO}_3$  1 % (v/v) na faixa de concentração de 0,001 a  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd. Para a determinação de cádmio nas amostras, foi utilizada a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* – ICP-OES), com limite de detecção de  $1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ .

#### 4.3.2 Gônada e Fígado

Após 15 dias de exposição, fragmentos de gônada e fígado foram mantidos à  $-80^\circ\text{C}$ , totalizando dois *pools* de cinco animais por tratamento. Desse material, 500 mg foram transferidos para tubos criogênicos descontaminados, os quais permaneceram em estufa à  $60^\circ\text{C}$  até a secagem total. Após esse processo foram adicionados ácido nítrico supra puro (Merck) 1 N na proporção de 1:5 (p/v). Os tubos tampados foram mantidos em estufa por 48h a  $60^\circ\text{C}$  para digestão ácida (ALVES; WOOD, 2006). Essa solução foi centrifugada e o sobrenadante foi diluído em  $\text{HNO}_3$  1% para quantificação do cádmio em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer A700), por método de atomização eletrotérmica acoplado ao forno de grafite. O limite de detecção do método utilizado foi de  $0,1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ . Um curva padrão foi preparada a partir de uma solução padrão de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  (Specsol) com certificação do *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

#### 4.4 ÍNDICES GONADOSSOMÁTICO E HEPATOSSOMÁTICO

Os índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) foram calculados seguindo a equação a seguir:

$$\frac{\text{Peso da gônada ou fígado}}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO HORMONAL

O sangue coletado foi centrifugado (2000 x g, por 10 minutos) para se obter o plasma, que foi armazenado em freezer -80°C até a análise. Os níveis de estradiol e testosterona foram mensuradas usando ensaio imunoenzimático de micropartículas (AxSYM Abbott). Os resultados foram expressos em pg.mL<sup>-1</sup> para estradiol e ng.mL<sup>-1</sup> para testosterona.

#### 4.6 BIOMARCADORES MOLECULARES

Para a análise de expressão gênica da aromatase cerebral, o hipotálamo foi mantido em microtubos livres de RNase em freezer – 80°C. Posteriormente, o RNA foi extraído com auxílio de minikit RNeasy (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante até se obter o RNA total da amostra. Após esse processo, o material foi quantificado em aparelho Nanodrop e cerca de 4 ng/μL foram tratados com a enzima DNase I (Invitrogen), afim de garantir que as amostras estivessem livres de DNA.

Por transcrição reversa, o RNA obtido foi transformado em DNA complementar (cDNA) com kit Reverse Transcription System (Promega), pelo qual foram adicionados enzima, tampão e nucleotídeos às amostras, para que a fita complementar fosse sintetizada. Após a adição dos reagentes, as amostras foram submetidas ao ciclo térmico de 20 °C por 10 minutos, 45 °C por 45 minutos, 95 °C por 5 minutos, transferidas para o gelo e posteriormente diluídas para 8 ng/μL para a realização da PCR em tempo real (RT qPCR).

Para a RT qPCR, foi utilizado o reagente Power SYBR® Master Mix (Applied Biosystems), que contem corante que se liga a cadeia dupla de DNA e emite fluorescência, além da AmpliTaq Gold® DNA polimerase, enzima que faz a amplificação do material, e demais reagentes necessários para a reação. Ao Power SYBR® foram adicionados os iniciadores (*forward* e *reverse* previamente desenhados) e água livre de RNase. Após a adição de 20 μL desse mix e de 5 μL de amostra em cada reação, a placa de PCR (Placa MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction with Barcode) foi submetida ao ciclo térmico no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System. Esse ciclo consistiu em uma etapa de 10 minutos a 95 °C, com 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 59 °C por 15 segundos e 72 °C por 40 segundos.

Após esse processo, foram submetidos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto.

Para os cálculos da expressão do gene de interesse, genes de referência, chamados de normalizadores, são necessários. Para essa normalização, foram utilizados os genes do fator de alongação 1 $\alpha$ , da  $\beta$  actina e do 18 S. Os cálculos foram feitos por  $2^{\Delta Ct}$  (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010), corrigido para a eficiência de cada iniciador. Como foram utilizados três genes normalizadores, um fator de normalização foi calculado baseado em Vandesompele et al. (2002), utilizando média geométrica. A quantidade relativa foi calculada pela divisão entre o gene de interesse e o fator de normalização.

#### 4.7 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

As amostras de gônada e fígado retiradas para os biomarcadores bioquímicos foram mantidas em freezer -80°C até o momento da homogeneização. Cerca de 150 mg de tecido gonadal e hepático foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M e pH 7,0), em proporção de 1:10, e centrifugadas a 15000 xg por 30 minutos a 4°C. Do sobrenadante foram feitas alíquotas de acordo com a necessidade de cada biomarcador. Para as metalotioneínas, 35 mg de tecido foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl/sacacore (20mM/500 mM, pH 8,6), seguindo a mesma proporção e centrifugação do restante das amostras. As alíquotas de todas as análises foram mantidas refrigeradas à -80°C.

##### 4.7.1 Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

Para a atividade da EROD foi utilizado o método de Burke e Mayer (1974), pelo qual há a determinação da resorufina proveniente da metabolização da 7-etoxiresorufina pela EROD. Para esta análise são utilizados dois comprimentos de onda: 530 nm para excitação e 590 nm para emissão.

Em microplacas escuras, 50  $\mu$ l de amostras foram pipetadas, sendo adicionados 200  $\mu$ l da solução de 7-etoxiresorufina (Tampão Tris /NaCl 0,1 M pH 7,5; 7-etoxiresorufina 2,6  $\mu$ M). Após 5 minutos, 10  $\mu$ l da solução de NADPH (2,6 mM) foram adicionados e, por 10 minutos, a fluorescência foi mensurada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro e a atividade foi expressa em  $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$ .

#### 4.7.2 Glutathione S-Transferase (GST)

Para a atividade da enzima GST foi utilizado o método proposto por Keen, Habig e Jakoby (1976). O princípio desta análise é a conjugação do CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a GSH pela ação da GST, que forma um tioéter monitorado pelo aumento da absorvância.

Em microplaca, 20  $\mu$ l das amostras, diluídas para 2 mg/mL de proteína, foram pipetadas seguidos de 180  $\mu$ l de solução de CDNB (3 mM) e GSH (3 mM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 340 nm e a atividade foi expressa em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$ .

#### 4.7.3 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi mensurada de acordo com Gao et al. (1998), baseado na capacidade da SOD em inibir a autooxidação do pirogalol.

Depois de diluídas (1:5 para gônada e 1:10 para fígado), as amostras foram divididas em duas alíquotas de 40  $\mu$ l em tubos de 1,5 ml e adicionados 885  $\mu$ l de tampão Tris/EDTA (1 M/5 mM, pH 8,0). Em um tubo de cada amostra foram adicionados 50  $\mu$ L de pirogalol (15 mM), incubados por 30 minutos e a reação foi interrompida com 25  $\mu$ L de HCl 1N. Desta reação, 300  $\mu$ L foram pipetados em triplicada na microplaca e a leitura realizada em espectrofotômetro a 440 nm. O tubo restante de cada amostra passou pelo mesmo processo, no entanto sem a etapa de incubação, sendo considerado o controle da amostra. A atividade da SOD foi expressa em U de SOD.  $\text{mgproteína}^{-1}$ , na qual cada unidade (U) equivale a quantidade de SOD que inibe a auto-oxidação do pirogalol em 50%.

#### 4.7.4 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi baseada em Aebi (1984), no qual a enzima degrada o peróxido de hidrogênio, seu substrato, e esse consumo é mensurado.

Após a diluição (1:5), 5  $\mu$ L foram pipetados de amostra e adicionados 295  $\mu$ L de solução reação (Tampão Tris 1M / EDTA 5mM pH 8,0; peróxido de hidrogênio 30%

e água). Por um minuto, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 240 nm, e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgproteína}^{-1}$ .

#### 4.7.5 Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi baseada em Hafeman, Sunde e Hoekstra (1974). A redução da GSSG em GSH, pela GR em presença de NADPH, promove queda de absorvância a 340 nm. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional a produção de GSSG, pela GPx, na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Em 10  $\mu\text{L}$  da amostra em microplaca foram adicionados 130  $\mu\text{L}$  de meio de reação (tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0; 3,0769 mM de azida sódica; 0,3077 mM de NADPH; 3,0769 mM de GSH e 1,54  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  de glutathione redutase). Após 2 minutos, 60  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,5 mM) foram adicionados. Imediatamente, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro a 340 nm e a atividade expressa em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgproteína}^{-1}$ .

#### 4.7.6 Glutathione Reduzida (GSH)

A concentração de GSH foi mensurada baseado no método de Sedlak et al. (1968). Em alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de amostra foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético a 50% (TCA) para precipitar as proteínas e separá-las do GSH, e então centrifugados a 10000 x g por 10 minutos, a 4°C. Desse material, 25  $\mu\text{L}$  foram pipetados na microplaca, juntamente com 115  $\mu\text{L}$  de tampão Tris Base (0,4 M e pH 8,9) e 10  $\mu\text{L}$  de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico a 2,5 mM). Após um minuto, as amostras foram lidas em espectrofotômetro, a 415 nm e a concentração expressa em  $\mu\text{g GSH} \cdot \text{mgproteína}^{-1}$ .

#### 4.7.7 Lipoperoxidação (LPO)

Para a lipoperoxidação, hidroperóxidos foram quantificados pelo método FOX (*Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*), proposto por Jiang, Hunt e Wolff (1992). As amostras foram ressuspensas em metanol (1:1) e centrifugadas à 5000 x g por 5 minutos, à 4 °C. Desse sobrenadante, 100  $\mu\text{L}$  foram transferidos para novos microtubos e adicionados 900  $\mu\text{L}$  da solução reação de FOX (laranja de xilenol 100

$\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 mM, BHT 4  $\mu\text{M}$ , sulfato ferroso amoniacal 250  $\mu\text{M}$ , metanol 90%). Após incubação de 30 minutos no escuro, 300  $\mu\text{L}$  foi pipetados em microplaca e lidos em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados da lipoperoxidação foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de hidroperóxidos. $\text{mgproteína}^{-1}$ .

#### 4.7.8 Proteínas carboniladas (PCO)

Para quantificar as proteínas carboniladas, foi utilizado o método de Levine et al. (1994), no qual o DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) reage com proteínas oxidadas/carboniladas, do tipo aldeído e cetona, formando dinitrofenil hidrazonas, que são detectadas.

Duas alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram utilizadas. Em uma delas, a amostra teste, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de DNPH (10 mM, HCl 2,0 M). Na outra alíquota, o branco, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de HCl (2,0 M). Ambas foram mantidas em banho-maria, à 90 °C, por 30 minutos e então colocadas em gelo. Em seguida, foram adicionados 350  $\mu\text{L}$  de TCA 28 % e as amostras foram centrifugadas a 9000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o material foi ressuspendido em 500  $\mu\text{L}$  de etanol/acetato de etila (1:1), centrifugado a 9000 x g por 10 minutos e o sobrenadante novamente descartado. Essa lavagem em etanol/acetato de etila, seguida de centrifugação, foi repetida mais uma vez. O material foi novamente ressuspendido, mas dessa vez em 500  $\mu\text{L}$  de cloreto de guanidina (3,0 M), centrifugado a 3000 x g por 3 minutos e 150  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi pipetado em microplaca e lido em espectrofotômetro a 363 nm. Os resultados foram expressos em [hidrazonas]  $\text{pmol.mgproteína}^{-1}$ .

#### 4.7.9 Metalotioneínas (MT)

A concentração de metalotioneínas foi analisada pelo método de Viarengo et al. (1997), que determina o conteúdo de sulfidrilas presentes nas metalotioneínas.

Para esta análise foram feitas várias lavagens do material. Inicialmente, em 300  $\mu\text{L}$  de amostra foram adicionados 342  $\mu\text{L}$  de solução composta por etanol e clorofórmio. Este material foi centrifugado a 6000 x g por 10 minutos a 4 °C. 490  $\mu\text{L}$  deste sobrenadante foram transferidos para novos microtubos, neles adicionada uma

solução composta por etanol e HCl e foram mantidos em - 20°C por 60 minutos. Depois de novamente centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o material ressuspenso em solução com etanol, clorofórmio e tampão Tris-HCl (20 mM). O material foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e o precipitado foi ressuspenso em 50 µL de NaCl (250 mM) e 50 µL de EDTA Sódico (EDTA a 4 mM e HCl a 1,0 M). A esse material foram adicionados 1000 µL de solução de Ellman (DTNB; metanol; e tampão fosfato de sódio 0,2 M saturado de NaCl 2,0 M). Depois de centrifugado a 3000 x g por 5 minutos, 300 µL do sobrenadante foi transferido para microplaca em triplicata e lido em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram expressos em µg.mg proteína<sup>-1</sup>.

#### 4.7.10 Concentração de proteínas

As proteínas das amostras foram quantificadas seguindo o método de Bradford (1976). Devido a diferença no tampão de homogeneização, foram realizadas análises de proteína para a metalotioneína (diluição 1:30) e outra utilizando o tampão fosfato de potássio pH 7,0 (diluição 1:20). Depois de diluídas, 10 µL de amostra foram pipetados em microplaca juntamente com 250 µL de solução de Bradford e lidos em espectrofotômetro em 620 nm.

### 4.8 BIOMARCADORES GENOTÓXICOS

#### 4.8.1 Alterações morfológicas nucleares

O teste do micronúcleo píceo foi realizado de acordo com Hooftman e De Raat (1982). Para cada organismo, 2.000 eritrócitos foram examinados em ampliação de 1.000x, e registrada a presença de micronúcleos e anormalidades morfológicas nucleares manifestadas em mudanças na forma elíptica do núcleo. A frequência de micronúcleos e anormalidades (“blebed”, “lobed”, “vacuolated”, “notched”, binúcleo) foi analisada de acordo com Carrasco, Tilbury e Myers (1990).

#### 4.8.2 Ensaio cometa

Em fragmentos de gônada e fígado foram adicionados 250 µL de soro fetal bovino e em 10 µL de sangue foram adicionados 500 µL de soro para a realização do ensaio cometa. Esta análise seguiu o protocolo de Speit e Hartmann (2005) modificado por Ramsdorf et al. (2009). 20 µL dessa suspensão celular foram diluídos em agarose de baixo ponto de fusão 0,5 % e colocados em lâmina de microscópio pré-revestida com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Durante 24 h essas lâminas foram mantidas em 4°C em solução composta por Triton X100 a 1% v/v, DMSO a 10% v/v e solução de lise de 89% v/v (NaCl 2,5 M; EDTA 0,1 M; Tris 0,01 M; NaOH a 0,2 M; N-lauroilsarcosina sal sódica 0,034 M, pH 10). Após esse processo, as lâminas foram submetidas a eletroforese horizontal, com solução de NaOH (10N) e EDTA (200 mM), pH > 13, 4 °C, durante 20 min e a eletroforese ocorreu a 300 mA e 1V / cm durante 25 min. Após esse processo, as lâminas foram lavadas três vezes durante 5 minutos com HCl Tris (0,4 M; pH 7,5) a 4 °C, fixadas durante 5 minutos em etanol absoluto e coradas com 0,02 µg/ml de brometo de etídio.

As quebras nas cadeias de DNA foram marcadas com auxílio de microscópio de epifluorescência, com uma ampliação de 400x. 100 nucleoides foram avaliados visualmente de acordo com a intensidade da cauda e determinado um valor de 0, 1, 2, 3 ou 4 (0 para um nucleoide intacto e gradualmente até o dano 4). Assim, a pontuação total de 100 nucleoides poderia variar de 0 (todas em bom estado) para 400 (todos em dano máximo) (COLLINS; MA; DUTHIE, 1995). Os cometas com pequena ou inexistente cabeça e grandes caudas difusos, não foram considerados porque eles estão associados com a morte celular (OLIVE; FRAZER; BANÁTH, 1993; FAIRBAIRN et al., 1996; FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009).

#### 4.9 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

Parte da gônada de cada animal foi fixada em solução ALFAC (álcool 80%, formol e ácido acético glacial) por 20 horas. Depois, foram desidratados em série alcoólica, diafanizados em xilol e incluídas em Paraplast®. Em micrótomo manual, com espessura de 7 µm, foram cortadas e posteriormente coradas com hematoxilina-eosina (HE). No processo de coloração, as lâminas passaram por xilol, série alcóolica decrescente e por último em água. Essas lâminas foram colocadas em hematoxilina

(corante básico) por 2 minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos, mergulhadas em água destilada e transferidas para a eosina (corante ácido) por 2 minutos. Depois, foram novamente desidratadas e série alcóolica crescente, diafanizadas em xilol e montadas com resina Entellan®. Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscopia de luz quanto ao estágio gonadal.

#### 4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados dos biomarcadores foram submetidos individualmente à análise de modelo linear generalizado (GLM), sugerida para dados ecotoxicológicos (SZÖCS; SCHÄFER, 2015). Os modelos foram ajustados através de distribuições de erro das famílias Gamma, Gamma (log), Gaussiana Inversa e Poisson, escolhidos de acordo com o Critério de Akaike, utilizando as bibliotecas MASS (VERNABLES; RIPLEY, 2002) e effects (FOX, 2003). Após a escolha do modelo, foi realizada Análise de Variância (ANOVA) unifatorial, utilizando contrastes de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para as comparações *a posteriori* através da biblioteca multcomp (HOTHORN; BRETZ; WESTFALL, 2008).

Análise Multivariada Permutacional de Variância (PERMANOVA) e Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) foram realizadas para a comparação integrada de todos os biomarcadores e para averiguar a distribuição dos grupos em apenas duas dimensões, respectivamente. Foram utilizadas as bibliotecas MASS e vegan (OKSANEN et al., 2015), com 999 permutações para a PERMANOVA.

Todas as análises estatísticas mencionadas foram realizadas em ambiente R (versão 3.2.2).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CONCENTRAÇÃO DE CÁDMIO

#### 5.1.1 Água

Na água, no tratamento controle não foi encontrado cádmio e, devido ao limite de detecção do método, também não foi detectado no grupo de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Nos tratamentos de 1, 10 e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ , as concentrações médias de cádmio total ( $\pm$  erro-padrão) foram 1,75 ( $\pm$  0,16); 18,68 ( $\pm$  2,29) e 187,90 ( $\pm$  28,22)  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente. Este resultado indicou que a concentração de cádmio total foi superior à concentração nominal proposta.

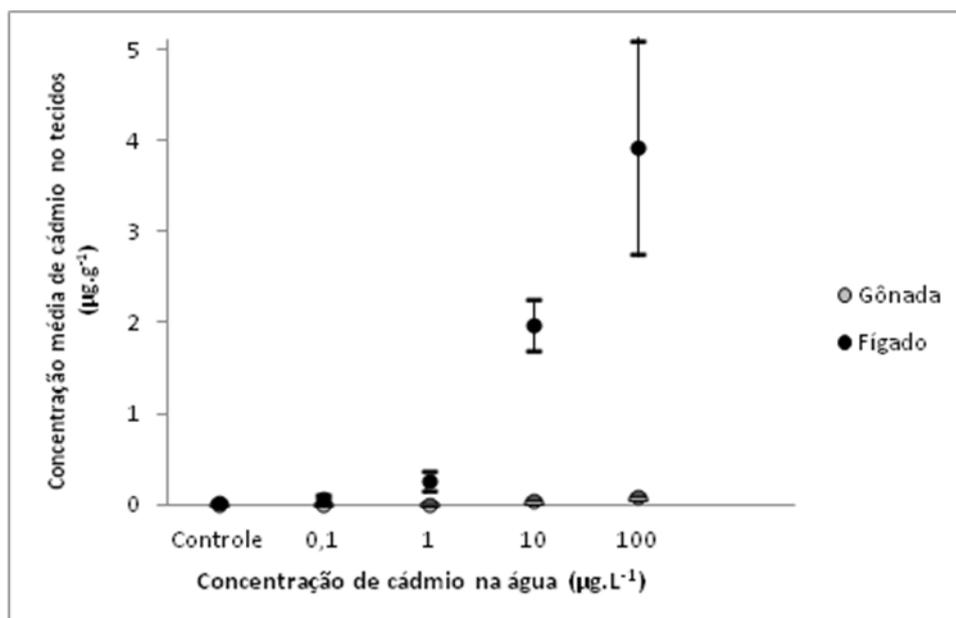
#### 5.1.2 Gônada e fígado

No tecido gonadal (TABELA 1) foram encontradas baixas concentrações de cádmio se comparados ao tecido hepático (TABELA 1), conforme representado na FIGURA 5. Nos tratamentos de 10 e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ , a concentração média de cádmio total no fígado foi 2 e 4 vezes maior do que na gônada, respectivamente.

TABELA 1: Concentrações de cádmio dos tecidos gonadal e hepático, por tratamento, expressos em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de tecido seco ( $n = 2$ ).

Concentração nominal de cádmio na água ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Gônada	Fígado
0	0,0012 / 0,0214	0,0232 / 0,0508
0,1	0,0060 / 0,0107	0,0252 / 0,1131
1	0,0039 / 0,0222	0,1601 / 0,3680
10	0,0263 / 0,0806	1,7020 / 2,2670
100	0,0825 / 0,1084	5,0900 / 2,7640

FIGURA 5: Concentrações médias de cádmio e mínimos/máximos, em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , em gônada e fígado de fêmeas expostas ao cádmio ( $n = 2$ ).



## 5.2 ÍNDICES GONADOSSOMÁTICO E HEPATOSSOMÁTICO

O índice gonadossomático (FIGURA 6A) não apresentou variações entre os grupos testados, bem como o índice hepatossomático (FIGURA 6B).

## 5.3 QUANTIFICAÇÃO HORMONAL

Os níveis plasmáticos de estradiol e testosterona não apresentaram variações significativas entre os grupos testados (FIGURA 7).

FIGURA 6: Índice gonadossomático (A) e hepatossomático (B) de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio por 15 dias (n = 6 a 10). Os resultados estão graficamente expressos em média  $\pm$  erro padrão e letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

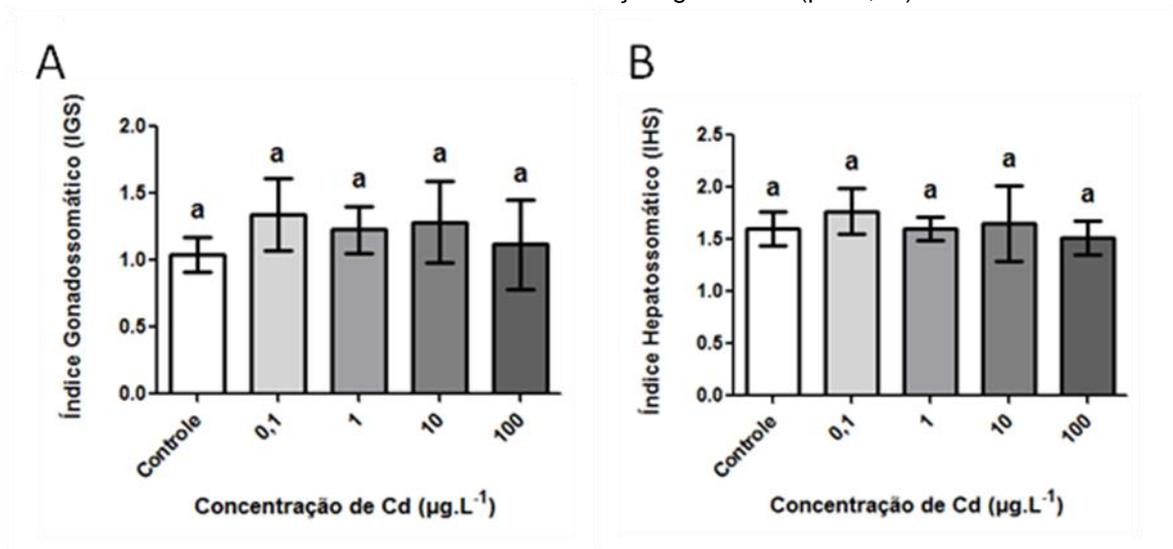
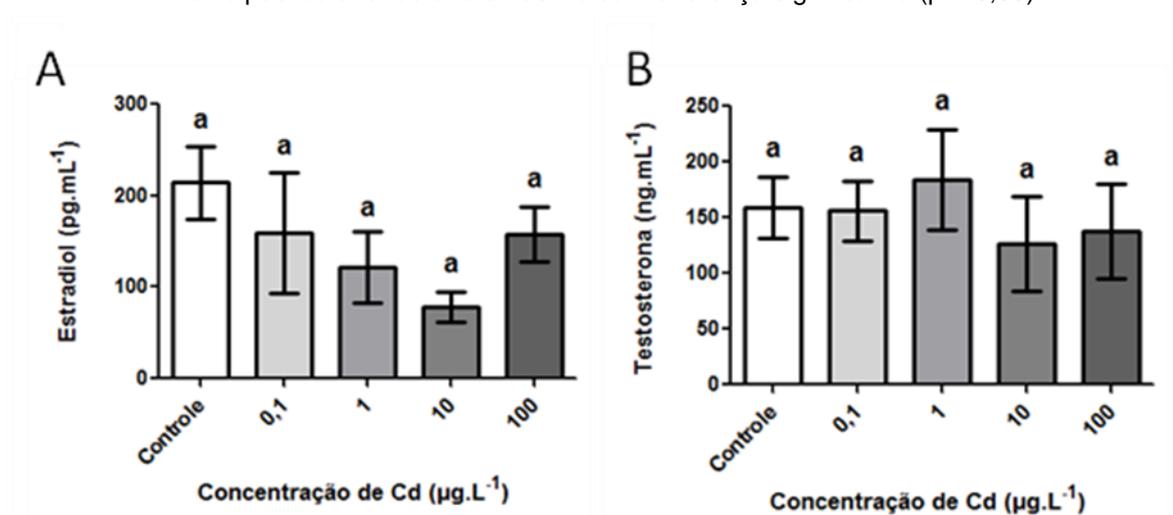


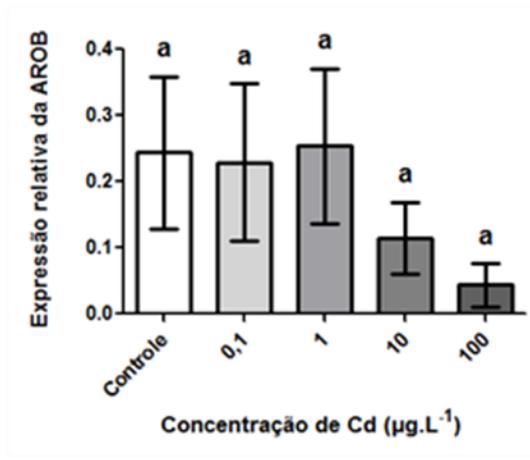
FIGURA 7: Níveis plasmáticos de estradiol (A) e testosterona (B) de fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio por 15 dias (n = 4 a 5). Os resultados estão graficamente expressos em média  $\pm$  erro padrão e letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



#### 5.4 BIOMARCADORES MOLECULARES

A expressão da enzima aromatase cerebral no hipotálamo não apresentou alterações significativas, porém foi observada uma redução de 53 % e 82% na sua expressão média em 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em relação ao controle, respectivamente (FIGURA 8).

FIGURA 8: Expressão relativa da aromatase cerebral no hipotálamo de fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio por 15 dias (n = 4 a 5). Os resultados estão graficamente expressos em média  $\pm$  erro padrão e letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



## 5.5 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

### 5.5.1 Gônada

No tecido gonadal, a GST, a GPx e a LPO não apresentaram diferenças entre os tratamentos. A SOD apresentou um aumento em sua atividade em  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  em relação ao grupos de  $0,1$  e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , enquanto que a GSH apresentou um aumento no grupo de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  em relação ao de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ . As metalotioneínas sofreram redução significativa de 86 e 99 % nos tratamentos de  $10$  e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente, se comparados ao controle (FIGURA 9).

### 5.5.2 Fígado

No fígado, as enzimas EROD (FIGURA 10A) e GST (FIGURA 10B) não apresentaram alterações em suas atividades entre os tratamentos, bem como o co-fator GSH (FIGURA 10C). A SOD (FIGURA 10D) apresentou aumento significativo nos tratamentos de  $1$ ,  $10$  e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ , sendo este de 200 % na última concentração, ao contrário da CAT (FIGURA 10E) e da GPx (FIGURA 11A) que não apresentaram alterações. Ocorreu um aumento de 90% da lipoperoxidação na última concentração (FIGURA 11B), ao contrário da PCO que não apresentou alteração (FIGURA 11C). A concentração de metalotioneínas sofreu uma redução significativa de aproximadamente 70 % na concentração de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (FIGURA 11D).

FIGURA 9: Biomarcadores bioquímicos GST (A), GPx (B), LPO (C), SOD (D), GSH (E) e MT (F), em gônadas de fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio por 15 dias (n = 6 a 10). Os resultados estão graficamente expressos em média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

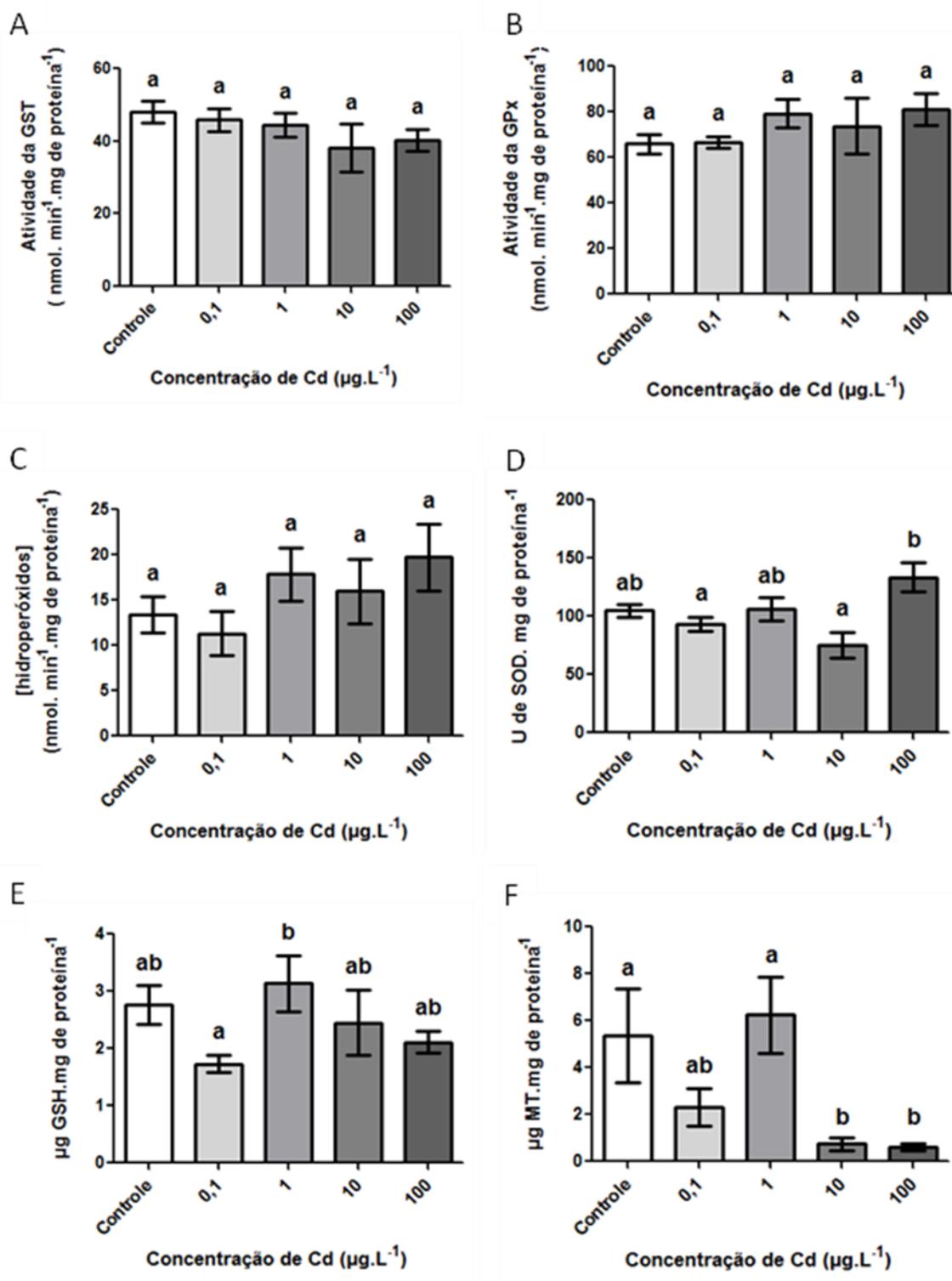


FIGURA 10: Biomarcadores bioquímicos EROD (A), GST (B), GSH (C), SOD (D), CAT (E), em fígado de fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio por 15 dias (n = 6 a 10). Os resultados estão graficamente expressos em média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

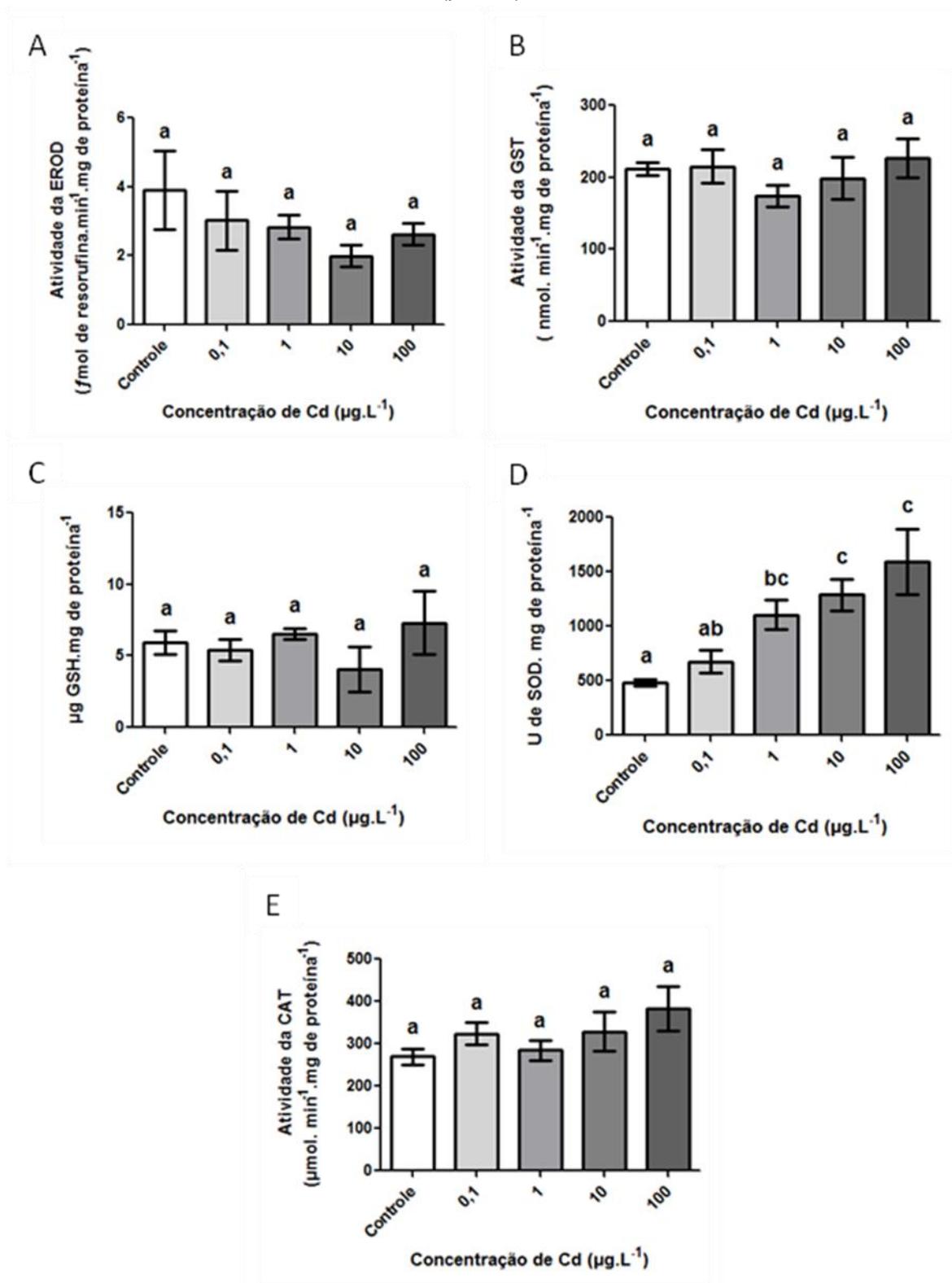
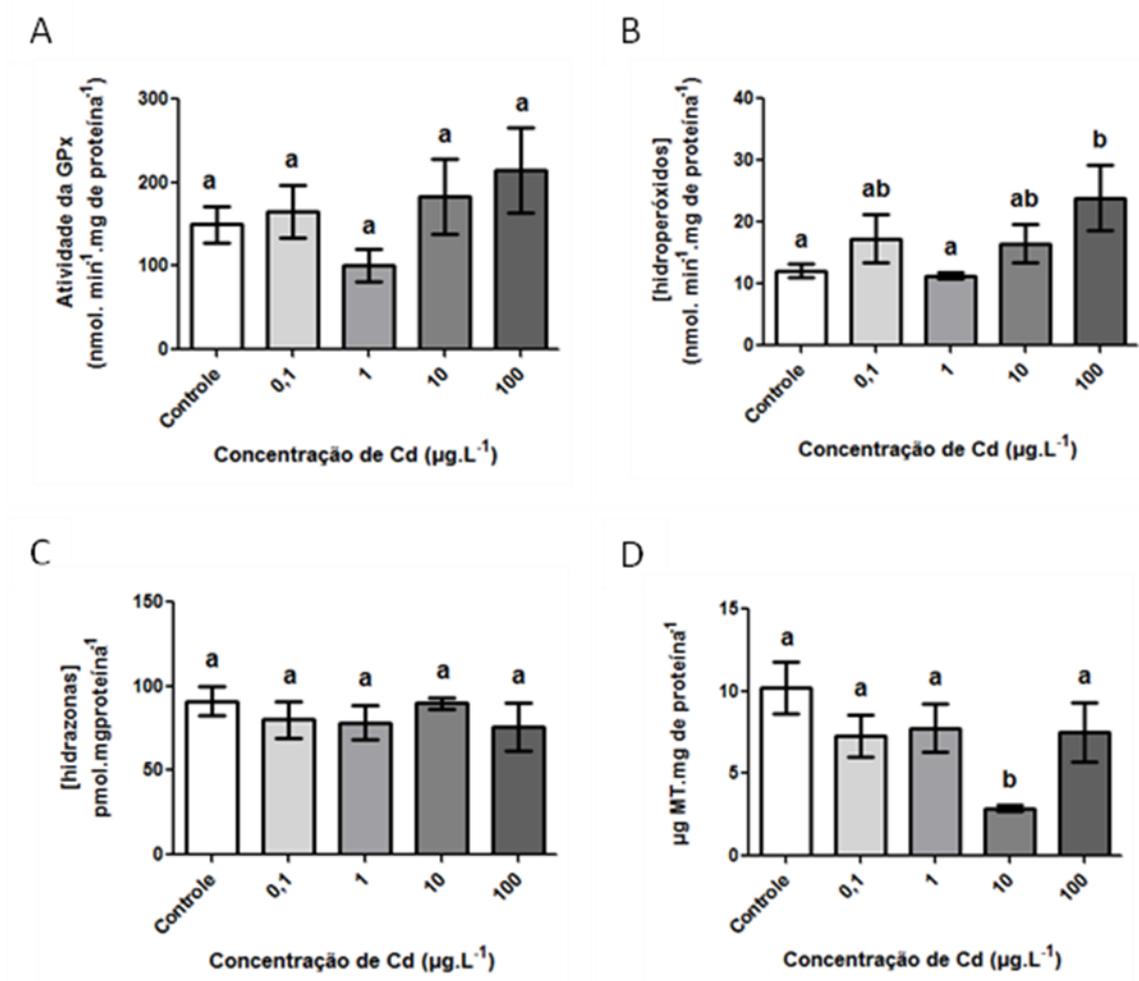


FIGURA 11: Biomarcadores bioquímicos GPx (A), LPO (B), PCO (C) e MT (D), em fígado de fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio por 15 dias (n = 6 a 10). Os resultados estão graficamente expressos em média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



## 5.6 BIOMARCADORES GENOTÓXICOS

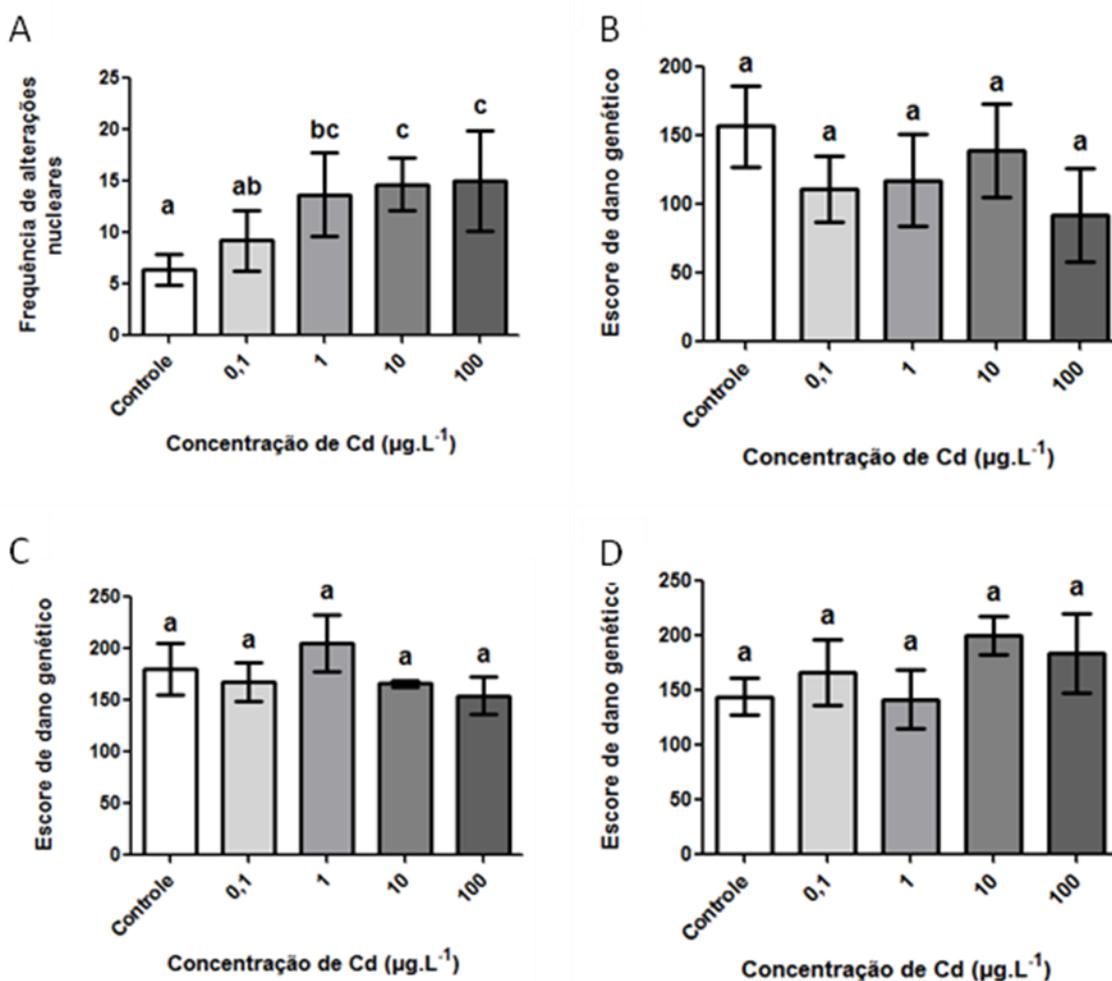
As alterações morfológicas nucleares apresentaram um aumento significativo em torno de 80% nas três concentrações mais altas, se comparadas ao controle (FIGURA 12A), sendo que a alteração mais comum foram os núcleos vacuolados. Micronúcleos estiveram presentes nos grupos de 1, 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (TABELA 2).

Para o cometa, não foram encontradas alterações de danos de quebra do DNA no sangue (FIGURA 12B), na gônada (FIGURA 12C) e no fígado (FIGURA 12D).

TABELA 2: Frequência de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio por 15 dias.

Concentração nominal de Cd ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	“Blebed”	“Lobed”	“Vacuolated”	“Notched”	Binúcleo	Micronúcleo	Total	n
0	4	0	42	18	0	0	64	10
0,1	8	0	52	14	0	0	74	8
1	17	3	82	20	0	1	123	9
10	12	1	69	4	0	2	88	6
100	20	2	49	39	6	4	120	8

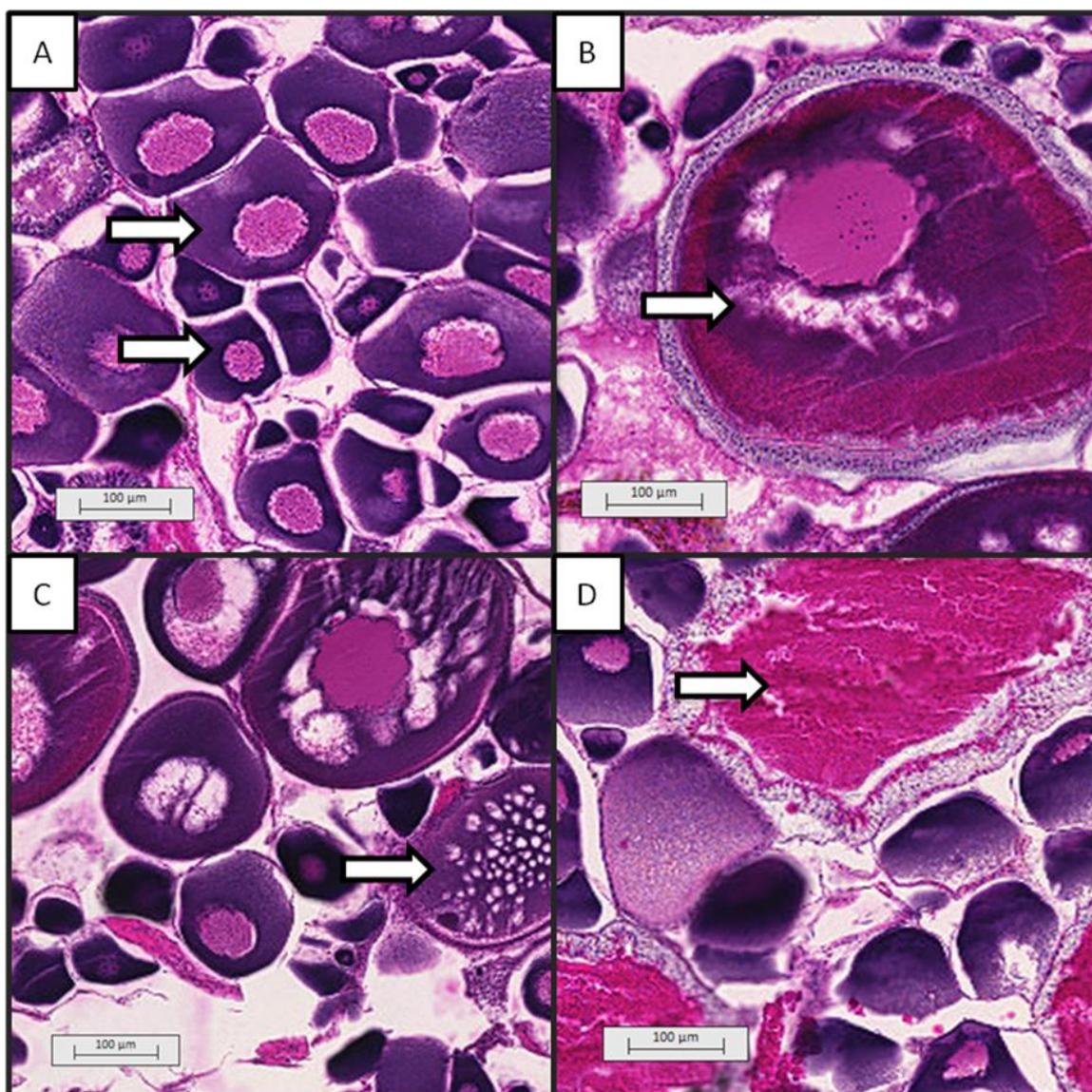
FIGURA 12: Alterações morfológicas nucleares (A) e danos no DNA em sangue (B), gônada (C) e fígado (D) de fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio por 15 dias (n = 6 a 10). Os resultados estão graficamente expressos em média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



## 5.7 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

O tecido gonadal avaliado não apresentou diferenças quanto ao estágio reprodutivo dos animais. Todos os grupos se mantiveram em estágio de desenvolvimento, com folículos ovarianos pré-vitelogênicos (FIGURA 13A) e em vitelogênese (FIGURA 13B). Estes últimos foram observados em duas fases: maior percentual com vesículas citoplasmáticas (FIGURA 13C) e uma menor frequência de folículos com grânulos de vitelo (FIGURA 13D). Não foram observadas alterações na estrutura histológica dos ovários desses animais.

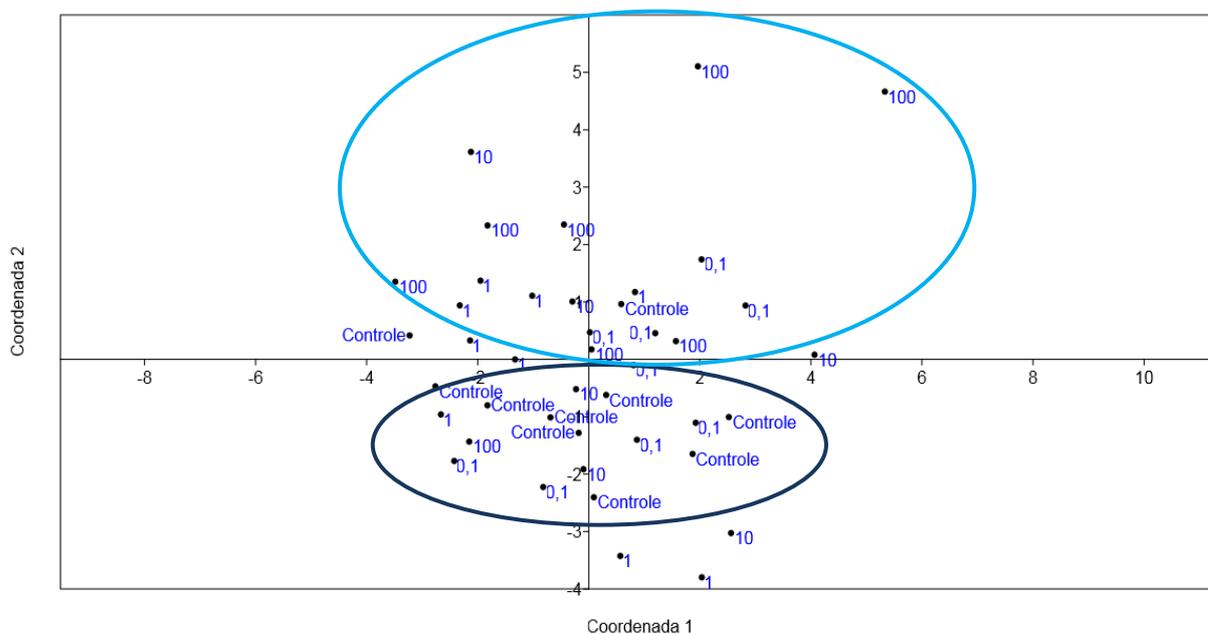
FIGURA 13: Histologia de gônadas de fêmeas de *Rhamdia quelen* expostas ao cádmio. A – Folículos ovarianos pré-vitelogênicos; B – Folículos ovarianos em vitelogênese; C – Folículos com vesículas citoplasmáticas; D – Folículos com grânulos de vitelo. Todas as estruturas citadas estão apontadas por seta. Coloração H/E.



## 5.8 ANÁLISE MULTIVARIADA

A PERMANOVA apresentou  $p = 0,003$ , indicando diferença entre os grupos, baseada em uma análise integrada de todos os biomarcadores testados. O NMDS, que apresentou stress de 0,2365, demonstrou diferença espacial entre os pontos que representam o controle para os pontos dos tratamentos, principalmente nas concentrações de 1, 10 e 100. O controle se concentrou nos quadrantes inferiores, enquanto que a maioria dos pontos das concentrações mais altas se concentrou nos quadrantes superiores (FIGURA 14).

FIGURA 14: Representação gráfica de NMDS, com todos os biomarcadores compilados em duas dimensões, sendo que as coordenadas representam os escores da análise. Controle = Controle; 0,1 = 0,1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; 1 = 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; 10 = 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; e 100 = 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .



## 6 DISCUSSÃO

Metais, como o cádmio, têm potencial de alterar diversos parâmetros relacionados à reprodução dos organismos. Neste trabalho, não foram encontradas alterações em níveis plasmáticos de hormônios ou no tecido gonadal, no entanto, fígado e sangue apresentaram danos oxidativos. O fígado é de grande importância para as fêmeas, pela produção da vitelogenina, fazendo com que alterações na homeostase desse órgão afetem também a reprodução dos organismos (COSTA, 2013).

No presente estudo, a enzima aromatase cerebral de fêmeas de *Rhamdia quelen* teve uma redução expressiva de 82 % em sua média de quantidade relativa em  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ . As duas isoformas da aromatase, gonadal e cerebral, podem ser expressas diferentemente ao longo do ciclo reprodutivo, podendo variar entre as espécies. Em peixes *Hippoglossus hippoglossus* (PLEURONECTIFORMES: PLEURONECTIDAE), a AROB começa a ser expressa antes da AROA, anteriormente a diferenciação histológica ovariana, enquanto que a AROA possui um segundo pico de expressão após essa diferenciação ser observada. Dessa forma, não se sabe ao certo até que ponto cada isoforma da aromatase se envolve na diferenciação sexual, porém há relatos que esse processo começa no cérebro, ressaltando a importância da aromatase cerebral (MATSUOKA et al, 2006).

Além de estar relacionada ao processo reprodutivo, a AROB também possui outras funções, como a de regulação da neurogênese e reparo, por estar localizada nas células radiais da glia capazes de gerar novos neurônios. Além disso, hormônios estrógenos produzidos por essa enzima podem ter papel da neuroproteção e regeneração, também relacionando a atividade da AROB ao crescimento e à regeneração neuronal em teleósteos. Ou seja, os níveis de expressão desta enzima podem ser produtos de diferentes processos que ocorrem simultaneamente no cérebro (CHESHENKO et al., 2008, BRETON et al., 2015). Então, uma redução expressiva dessa enzima pode ter consequências para o organismo, como afetar sua neurogênese, tornar o tecido cerebral mais propício a danos por falta de neuroproteção por hormônios, além de afetar a diferenciação sexual cerebral desses

organismos. Assim, crescimento e reprodução podem ser alterados, levando a danos a nível ecológico, por serem capazes de reduzir as populações.

Outros biomarcadores não apresentaram alterações significativas, como os índices gonado e hepatossomático, níveis plasmáticos de hormônios sexuais, estágio reprodutivo do tecido gonadal ou danos de quebra de DNA, em exposição de 15 dias. Canapa et al. (2007) sugerem que o cádmio apresenta efeitos retardados em múltiplos níveis do eixo Hipotálamo-Pituitária-Gônada-Fígado (HPGF). Com base nessa afirmação, dados experimentais encontrados na literatura mostram que, em um tempo de exposição mais prolongado, alguns efeitos nesses parâmetros podem ser observados. Após exposição às concentrações nominais de 50, 100 e 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cádmio, por 60 dias, fêmeas da espécie *Oreochromis niloticus* (PERCIFORMES: CICHLIDAE) apresentaram alterações histológicas nos ovários, bem como aumento do hormônio estradiol (LUO et al., 2015). Alterações nos índices hepato e gonadossomático foram observadas em fêmeas juvenis de *Oreochromis mossambicus* (PERCIFORMES: CICHLIDAE), em exposição a 0,1 e 0,15  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd por 50, 100 e 150 dias, encontrando diferentes padrões de resposta (AMUTHA; SUBRAMANIAN, 2013). Assim, tempo de exposição ao cádmio de 15 dias é insuficiente para causar alterações em níveis plasmáticos de hormônios e em índices relacionados à reprodução.

Os biomarcadores bioquímicos testados na gônada, exceto as metalotioneínas, também não foram alterados. Esse órgão, por exemplo, apresenta menor atividade enzimática da GST se comparado ao rim ou fígado (HAMED et al., 2014). Em se tratando de gônadas de *Oreochromis niloticus*, testículos apresentam uma atividade maior para GST, GPx e CAT, e maior concentração de GSH (HAMED et al., 2016). Dessa maneira, alterações para tais enzimas gonadais femininas se tornam mais difíceis de serem detectadas em baixas concentrações de poluentes que podem estar se acumulando nesse tecido.

O cádmio apesar de já ter sido encontrado em gônadas, pode se concentrar no tecido hepático, visto sua alta afinidade pela vitelogenina, proteína produzida no fígado. Em fígados de *Halobatrachus didactylus* (BATRACHOIDIFORMES: BATRACHOIDIDAE), foi observado aumento desse metal em período reprodutivo, no qual há maior produção de vitelogenina (PEDRO et al., 2015). Assim, espera-se que maiores concentrações de cádmio estejam no fígado, visto que esses animais estão em desenvolvimento e a produção de vitelogenina pode estar maior nesse órgão.

Neste trabalho, apesar de ter um aumento de cádmio nas gônadas, a maior concentração deste metal se encontrou no fígado. Lü et al. (2012) relatam que as maiores quantidades de cádmio estão presentes em órgãos como o fígado e pequenas quantidades se acumulam nas gônadas. Contudo, há trabalhos com maior tempo de exposição, como de 60 dias, que demonstram que o Cd tem a capacidade de se acumular nas gônadas e ovos em longo prazo, alterando o desenvolvimento de embriões e podendo afetar as próximas gerações da espécie (LUO et al., 2015).

O fígado de fêmeas se torna um órgão importante em se tratando de reprodução, visto que a produção de vitelogenina é um ponto crítico para o desenvolvimento normal de embriões (MURPHY; ROSE; THOMAS, 2005). O cádmio pode ser inibidor de diferentes enzimas do citocromo P450, como a EROD, ou ainda atuar aumentando o substrato para a GST (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). No presente trabalho, não foram encontrados efeitos desse metal na atividade da EROD e da GST presentes no fígado de fêmeas de *Rhamdia quelen*. No entanto, sob as mesmas condições, Pereira et al. (2016) encontraram uma redução da atividade da GST neste órgão de machos, mostrando que, entre os sexos, há diferenciação de resposta na via de biotransformação de xenobióticos.

Ao contrário do que ocorreu nas gônadas, o cádmio causou estresse oxidativo em fígado de fêmeas de *R. quelen* expostas a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Neste estudo, o aumento da atividade da SOD, sem o aumento proporcional das atividades da CAT e GPx, ou de outros componentes do sistema antioxidante, como a GSH, causou um desbalanço oxidativo desses animais. O aumento da atividade da SOD tem como consequência um aumento da produção de peróxido de hidrogênio, degradado pela GPx e CAT (VEAL; DAY; MORGAN, 2007; LUSHCHAK, 2011). Como estas últimas enzimas não tiveram suas atividades alteradas, danos de macromoléculas podem ser causados. Não foram observados danos em proteínas e no DNA, porém ocorreu peroxidação lipídica em  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ , demonstrando a hepatotoxicidade causada pelo cádmio em fêmeas. O mesmo tipo de dano lipídico foi observado em machos de *R. quelen* também expostos à  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cádmio (PEREIRA et al., 2016). Em fêmeas, esse tipo de dano pode afetar a reprodução por alterar a homeostase de um tecido importante nesse processo. Além disso, a vitelogenina, precursora do vitelo nos ovócitos, tem lipídios em sua composição (HARA; HIRAMATSU; FUJITA, 2016), fazendo com que danos lipídicos no fígado também possam alterar sua conformação e ter efeitos na reprodução.

Além destes biomarcadores genotóxicos e bioquímicos, metalotioneínas também foram testadas. Por se tratar de uma proteína que participa da detoxificação de metais, espera-se que estes induzam sua síntese (VIARENGO et al, 1999). No entanto, em estudo com fígado de fêmeas de *Gambusia affinis* (CYPRINODONTIFORMES: POECILIIDAE), Huang et al. (2014) encontraram redução na expressão da MT após oito dias de exposição a 0,25  $\mu\text{M}$  de Cd, sendo que após um e três dias o efeito foi oposto. Neste trabalho com *R. quelen*, no fígado, a MT apresentou uma redução de 70% no tratamento de 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Em machos expostos às mesmas condições, não foram encontradas alterações de MT no fígado em 15 dias, mas um aumento no rim em 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (PEREIRA et al., 2016). Coyle et al. (2002) relatam que nem todos os estudos demonstram proteção significativa da MT contra o Cd no fígado, mas que em rim isto é mais observado. No caso da gônada, esta apresentou redução da MT nos grupos de 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , justamente os que apresentaram maiores concentrações de cádmio. Em trabalhos em com exposição de peixes ao cádmio, não foram feitas análises de concentração de metalotioneínas em gônadas. No entanto, em estudo com moluscos cefalópodes da espécie *Octopus vulgaris* (OCTOPODA: OCTOPODIDAE), não foi encontrada relação correspondente entre o nível de MT nas gônadas e a variação na concentração de Cd (RAIMUNDO et al., 2010). Sabe-se que o cádmio pode alterar a atividade do fator de transcrição da metalotioneína por interação estrutural, podendo levar a uma redução da expressão dessa proteína (BERTIN; AVERBECK, 2006). No entanto, na literatura ainda não foram bem elucidados os mecanismos pelos quais o Cd pode regular negativamente a expressão das metalotioneínas (SIMONIELLO et al., 2013).

Além dos danos encontrados no fígado, o Cd causou alterações morfológicas nucleares sanguíneas. Ele pode inibir sistema de reparo para pareamentos errados, que também é responsável por ativar pontos de controle do ciclo celular ou vias apoptóticas após a detecção de lesões. Dessa maneira, lesões como alterações nucleares podem não ser detectadas pelo organismo. Zhu et al. (2004) encontraram alterações nucleares em *Cyprinus carpio*, a partir do quarto dia de exposição a 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cádmio. Cavas, Garanko e Arkhipchuk (2005) observaram alterações nucleares do tipo micronúcleo em peixes das espécies *Carassius gibelio* (CYPRINIFORMES: CYPRINIDAE) e *Corydoras paleatus* (SILURIFORMES: CALLICHTHYDAE) expostos a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  por 21 dias. Além de inibir sistemas de reparo, o Cd também pode levar a apoptose por causar injúrias mitocondriais

(BERTIN; AVERBECK, 2006). No presente trabalho, cometas relacionados a apoptose não foram contabilizados, ou seja, a falta de danos de quebra de DNA pode ser consequência da morte celular causada pelo cádmio já relatada na literatura.

No geral, as concentrações mais altas de cádmio total na água testadas neste trabalho apresentaram alterações significativas se comparadas ao controle, dado também evidenciado pela análise multivariada. Apesar das concentrações reais detectadas nos experimentos estarem acima das que foram inicialmente propostas, diversos trabalhos ainda trazem concentrações dentro dessa faixa detectada e que já são encontradas em ambientes aquáticos dulcícolas brasileiros. Em um lago localizado no Rio Grande do Norte, Barbosa et al. (2010) encontraram  $15 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cádmio no verão. Rietzler, Fonseca e Lopes (2001) detectaram concentrações próximas, de  $14 \mu\text{g.L}^{-1}$  na estação seca e de  $18 \mu\text{g.L}^{-1}$  na estação chuvosa, em uma represa mineira. Fernandes et al. (2015) encontraram  $60 \mu\text{g.L}^{-1}$  na microbacia do Palmital, no Rio de Janeiro. Na bacia do Rio Cassiporé, no Amapá, Lima et al. (2015) detectaram de 27 até  $813 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cádmio em diferentes pontos da bacia, demonstrando os efeitos da mineração por diversos anos na região.

O eixo HPGF é um dos maiores alvos de estudos dos desreguladores endócrinos, visto que esse controla processos reprodutivos, de grande relevância ecológica por manterem a viabilidade populacional (HACHFI et al., 2012). O cádmio mostrou que pode afetar este eixo reprodutivo em concentrações já detectadas em ambientes aquáticos, por meio de danos hepáticos e sanguíneos. Como o fígado é um tecido com grande importância na reprodução, principalmente em fêmeas, danos que afetem sua integridade e homeostase podem levar a alterações nas próximas gerações. Além de ser o responsável pela vitelogênese, o fígado também aloca reserva energética para a fase reprodutiva, composta principalmente por lipídios (COSTA, 2013). Assim, seja por meio de alterações na vitelogênese ou em reservas energéticas causadas pela peroxidação lipídica hepática, o cádmio pode levar a alterações populacionais em consequência das alterações reprodutivas, podendo afetar a dinâmica populacional e ter efeitos tardios em comunidades e ecossistemas.

## 7 CONCLUSÕES

O cádmio, em concentrações já encontradas em ecossistemas aquáticos dulcícolas brasileiros, pode afetar o eixo reprodutivo, causando peroxidação lipídica no fígado e aumentando a frequência de alterações morfológicas nucleares no sangue de fêmeas da espécie nativa *Rhamdia quelen*. O dano de peroxidação lipídica no fígado, detectado na concentração nominal de  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ , pode afetar a homeostase desse tecido, importante para a reprodução por ser o responsável pela vitelogênese e pela reserva energética necessária neste período, podendo levar a implicações ecológicas, como a redução da população.

## REFERÊNCIAS

- AARAB, N.; GODAL, B. F.; BECHMANN, R. K. Seasonal variation of histopathological and histochemical markers of PAH exposure in blue mussel (*Mytilus edulis* L.). **Marine Environmental Research**, v. 71, p. 213-217, 2011.
- ACOSTA, I. B.; JUNIOR, A. S. V.; FERNANDES E SILVA, E.; CARDOSO, T. F.; CALDAS, J. S.; JARDIM, R. D.; CORCINI, C. D. Effects of exposure to cadmium in sperm cells of zebrafish, *Danio rerio*. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 696-700, 2016.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALMEIDA, J. A.; DINIZ, Y. S.; MARQUES, S. F. G.; FAINE, L. A.; RIBAS, B. O. BUMEIKO, R. C.; NOVELLI, E. L. B. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environment International**, v. 27, p. 673-679, 2002.
- ALVES, L. C., WOOD, C. M. The cronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 217-232, 2006.
- AMUTHA, C.; SUBRAMANIAN, P. Cadmium alters the reproductive endocrine disruption and enhancement of growth in the early and adult stages of *Oreochromis mossambicus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 351-361, 2013.
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M. EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.
- BARBOSA, J.S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 3, p. 320-325, 2010.
- BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v. 88, p. 1549-1559, 2006.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- BOBBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 535-548, 2010.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

- BRETON, T. S.; DIMAGGIO, M. A.; SOWER, S. A.; BERLINSKY, D. L. Brain aromatase (*cyp19a1b*) and gonadotropin releasing hormone (*gnrh2* and *gnrh3*) expression during reproductive development and sex change in black sea bass (*Centropristis striata*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 181, p. 45-53, 2015.
- BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 2, n. 6, p. 583-588, 1974.
- CANAPA, A.; BARUCCA, M.; GORBI, S.; BENEDETTI, M.; ZUCCHI, S.; BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; NIGRO, M.; REGOLI, F. Vitellogenin gene expression in males of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* from Terra Nova Bay (Ross Sea): A role for environmental cadmium? **Chemosphere**, v. 66, n. 7, p. 1270-1277, 2007.
- CARRACHI, S. P.; CRUZ, C.; NETO, J. G. M.; IGNÁCIO, N. F.; BARBUIO, R.; MACHADO, M. R. F. Histopathological biomarkers in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected with aeromonas hydrophila and treated with antibiotics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 83, p. 115-120, 2012.
- CARRASCO, K. R., TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47 p. 2123-2136, 1990.
- CAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 569-574, 2005.
- CERVERA, A.; MAYMÓ, A. C.; MARTÍNEZ-PARDO, R.; GARCERÁ, M. D. Vitellogenin polypeptide levels in one susceptible and one cadmium-resistant strain of *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae), and its role in cadmium resistance. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 2, p. 158-168, 2006.
- CHESHENKO, K.; PAKDEL, F.; SEGNER, H.; KAH, O.; EGGEN, R. I. L. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 155, p. 31-62, 2008.
- COLLINS, A. R; MA, A. G.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells. **Mutation Research**, v. 336, p. 69-77, 1995.
- COM. Community Strategy for Endocrine Disrupters: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. **Commission of the European Communities**, 1999.
- CONAMA, (Conselho Nacional do Meio Ambiente). CONAMA 357/05, Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005. **Ministério do Meio Ambiente**.

- COSTA, D. D. M. **Caracterização da vitelogênese em *Rhamdia quelen* e sua aplicação no monitoramento de desreguladores endócrinos**. 151 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- COYLE, P.; PHILCOX, J. C.; CAREY, L. C.; ROFE, A. M. Metallothionein: The multipurpose protein. **CMLS - Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 627-647, 2002.
- DAS, S.; MUKHERJEE, D. Effect of cadmium chloride on secretion of  $17\beta$ -estradiol by the ovarian follicles of common carp, *Cyprinus carpio*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 181, p. 107 – 114, 2013.
- DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 227–230, 2010.
- EL-EBIARY, E. H.; WAHBI, O. M.; EL-GREISY, Z. A. Influence of dietary cadmium on sexual maturity and reproduction of Red Tilapia. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, p. 313-317, 2013.
- FAIRBAIRN, D. W.; WALBURGER, D. K.; FAIRBAIRN, J. J.; O'NEILL, K. L. Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. **Scanning**, v. 18, n. 6, p. 407-416, 1996.
- FERNANDES, M. M.; CEDDIA, M. B.; FRANCELINO, M. R.; FERNANDES, M. R. M. Diagnóstico ambiental da faixa ciliar e qualidade de água de duas microbacias utilizadas para abastecimento humano. **Irriga**, Botucatu, v. 20, n. 1, p. 128-138, 2015.
- FERREIRA, A. P.; HORTA, M. A. P.; CUNHA, C. L. N. Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax* (Garça-da-noite) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Revista da Gestão Costeira Integrada**, v. 10, n. 2, p. 229-241, 2010.
- FOX, J. Effect displays in R for generalised linear models. **Journal of Statistical Software**, v. 8, p. 1-27, 2003.
- FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681, p. 80-92, 2009.
- GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, 1998.
- GARCIAS, C. M.; SANCHES, A. M. Vulnerabilidades sócioambientais e as disponibilidades hídricas urbanas: levantamento teórico-conceitual e análise aplicada à região metropolitana de Curitiba – PR. **Revista de Pesquisa em Arquitetura e Urbanismo**, p. 96-111. 2009.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GUMPU, M. B.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U. M.; RAYAPPAN, J. B. B. A review on detection of heavy metal ions in water – an electrochemical approach. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 213, p. 515–533, 2015.

HACHFI, L.; COUVRAY, S.; SIMIDE, R.; TARNOWSKA, K.; PIERRE, S.; GAILLARD, S.; RICHARD, S.; COUPÉ, S.; GRILLASCA, J. O.; PRÉVOT-D'ALVISE, N. Impact of Endocrine Disrupting Chemicals [EDCs] on Hypothalamic-Pituitary-Gonad-Liver [HPGL] Axis in Fish. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 4, n. 1, p. 14-30, 2012.

HAFEMAN, D. G.; SUNDE, R. A.; HOEKSTRA, W. C. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **Journal of Nutrition**, v. 104, n. 4, p. 580–587, 1974.

HAMED, R. R.; ABDEL-GHANY, S. S.; SALEH, N. S. M.; GUNEIDY, R. A.; SHOKEER, A.; ZAKI, E. Characterization of Glutathione Transferase in Some Organs of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Global Veterinaria**, v. 13, n. 6, p. 986-995, 2014.

HAMED, R. R.; SALEH, N. S. M.; SHOKEER, A.; GUNEIDY, R. A.; ABDEL-GHANY, S. S. Glutathione and its related enzymes in the gonad of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology Biochemistry*, v. 42, p. 353-364, 2016.

HARA, A.; HIRAMATSU, N.; FUJITA, T. Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. **Fisheries Science**, v. 82, p. 187-202, 2016.

HIDALGO, J.; ASCHNER, M.; ZATTA, P.; VASÁK, M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 133–145, 2001.

HINFRAY, N.; CHESHENKO, K.; AIT-AISSA, S.; PALLUEL, O.; PORCHER, J-M.; PAKDEL, F.; EGGEN, R. I. L.; KAH, O.; BRION, F. Brain and gonadal aromatases as molecular and biochemical targets of endocrine disrupters in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). **Cybium**, v. 32, n. 2, p. 34-36, 2008.

HOOFTMAN, R. N.; DE RAAT, W. K. Induction of Nuclear Anomalies (Micronuclei) in the Peripheral-Blood Erythrocytes of the Eastern Mudminnow *Umbra Pygmaea* by Ethyl Methanesulfonate. **Mutation Research**, v. 104, p. 147-152, 1982.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous inference in general parametric models. **Biometrical Journal**, v. 50, p. 346-363, 2008.

HUANG, G-Y.; YING, G-G.; LIANG, Y-Q.; LIU, S-S.; LIU, Y-S. Expression patterns of metallothionein, cytochrome P450 1A and vitellogenin genes in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) in response to heavymetals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 105, p. 97-102, 2014.

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384-389, 1992.

KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A Review on Endocrine Disruptors and their Possible Impacts on Human Health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 241-258, 2015.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.

KIME, D. E.; NASH, J. P. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. **The Science of the Total Environment**, v. 233, p. 123-129, 1999.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 182-186, 2003.

LEE, J-G.; MADDEN, M. C.; REED, W.; ADLER, K.; DEVLIN, R. The use of the Single Cell Gel Electrophoresis assay in detecting DNA single strand breaks in lung cells *in Vitro*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 141, 195-204, 1996.

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

LIMA, D. P.; SANTOS, C.; SILVA, R. S.; YOSHIOKA, E. T. O.; BEZERRA, R. M. Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassiporé, Estdo do Amapá, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 4, p. 405-414, 2015.

LOPEZ-MARTINEZ, G.; ELNITSKY, M. A.; BENOIT, J. B.; LEE JR, R. E.; DENLINGER, D. L. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica*, and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalase and heat shock proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 796-804, 2008.

LÜ, X. F.; LIU, F. Y.; ZHOU, X. P.; ZHOU, Q. F.; DENG, Y, L. Effects of cadmium, 17 $\beta$ -estradiol and their interaction in the male Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). **Chinese Science Bulletin**, v. 57, n. 8, p. 858-863, 2012.

LUO, Y.; SHAN, D.; ZHONG, H.; ZHOU, Y.; CHEN, W.; CAO, J.; GUO, Z.; XIAO, J.; HE, F.; HUANG, Y.; LI, J.; HUANG, H.; XU, P. Subchronic effects of cadmium on the gonads, expressions of steroid hormones and sex-related genes in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 10, p. 2213-2223, 2015.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 13-30, 2011.

- MARETTOVÁ, E.; MARETTA, M.; LEGÁTH, J. Toxic effects of cadmium on testis of birds and mammals: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 155, p. 1-10, 2015.
- MATSUOKA, M. P.; VAN NES, S.; ANDERSEN, Ø.; BENFEY, T. J.; REITH, M. Real-time PCR analysis of ovary- and brain-type aromatase gene expression during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) development. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 144, p. 128-135, 2006.
- MÉNDEZ-ARMENTA, M.; RÍOS, C. Cadmium neurotoxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 350-358, 2007.
- MILLS, L. J.; GUTJAHR-GOBELL, R. E.; ZAROOGIAN, G. E.; HOROWITZ, D. B.; LAWS, S. C. Modulation of aromatase activity as a mode of action for endocrine disrupting chemicals in a marine fish. **Aquatic Toxicology**, v. 147, p. 140-150, 2014.
- MØLLER, I. M.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; RAO, R. S. P. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 2228-2242, 2011.
- MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 370-374, 2002.
- MUÑOZ, L.; WEBER, P.; DRESSLER, V.; BALDISSEROTTO, B.; VIGLIANO, F. A. Histopathological biomarkers in juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to a sublethal lead concentration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 241-247, 2015.
- MURPHY, C. A.; ROSE, K. A.; THOMAS, P. Modeling vitellogenesis in female fish exposed to environmental stressors: Predicting the effects of endocrine disturbance due to exposure to a PCB mixture and cadmium. **Reproductive Toxicology**, v. 19, p. 395-409, 2005.
- NOGAMI, E. M.; KIMURA, C. C. M.; RODRIGUES, C.; MALAGUTTI, A. R.; LENZI, E.; NOZAKI, J. Effects of dietary cadmium and its bioconcentration in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p. 291-295, 2000.
- NORDBERG, G. F. Historical perspectives on cadmium toxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238, p. 192-200, 2009.
- OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. 2008. **Fundamentos da toxicologia**. Atheneu Editora, São Paulo, 3ª Ed, 2008.
- OKSANEN, J. F.; BLANCHET, G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; WAGNER, H. **vegan: Community Ecology Package**. R package, version 2.3-0, 2015.
- OLIVE, P. L.; FRAZER, G.; BANÁTH, J. P. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the Comet assay. **Radiation Research**, v. 136, n. 1, p. 130-136, 1993.

PEDRO, S.; DUARTE, B.; CASTRO, N.; ALMEIDA, P. R.; CAÇADOR, I.; COSTA, J. L. The Lusitanian toadfish as bioindicator of estuarine sediment metal burden: The influence of gender and reproductive metabolism. **Ecological Indicators**, v. 48, p. 370-379, 2015.

PEREIRA, L. S.; RIBAS, J. L. C.; VICARI, T.; SILVA, S. B.; STIVAL, J.; BALDAN, A.P.; VALDEZ DOMINGOS, F. X.; GRASSI, M. T.; CESTARI, M. M.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 29-36, 2016.

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

PRETTO, A.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; SANTI, A.; TONI, C. Alterations in carbohydrate and protein metabolism in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 188-192, 2014.

RAIMUNDO, J.; COSTA, P. M.; VALE, C.; COSTA, M. H.; MOURA, I. Metallothioneins and trace elements in digestive gland, gills, kidney and gonads of *Octopus vulgaris*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 152, p. 139-146, 2010.

RAMSDORF, W. A.; GUIMARÃES, F. S. F.; FERRARO, M. V. M.; GABARDO, J.; TRINDADE, E. S.; CESTARI, M. M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research**, v. 673, n. 1, p. 78–81, 2009.

RIETZLER, A. C.; FONSECA, A. L.; LOPES, G. P. Heavy metals in tributaries of Pampulha Reservoir, Minas Gerais. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, n. 3, p. 363-370, 2001.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SHARMA, B.; PATIÑO, R. Effects of cadmium, estradiol-17 $\beta$  and their interaction on gonadal condition and metamorphosis of male and female African clawed frog, *Xenopus laevis*. **Chemosphere**, v. 79, p. 499-505, 2010.

SIMONIELLO, P.; FILOSA, S.; SCUDIERO, R.; TRINCHELLA, F.; MOTTA, C. M. Cadmium impairment of reproduction in the female wall lizard *Podarcis sicula*. **Environmental Toxicology**, v. 28, n. 10, p. 553-562, 2013.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. In KEOHAVONG, P.; GRANT, S. G. **Methods in Molecular Biology**, Molecular Toxicology Protocols - Humana Press Inc., Totowa, v. 291, 2005.

- SZÖCS, E.; SCHÄFER, R. B. Ecotoxicology is not normal. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 13990-13999, 2015.
- TERRA, B. F.; ARAÚJO, F. G.; CALZA, C. F.; LOPES, R. T.; TEIXEIRA, T. P. Heavy metal in tissues of three fish species from different trophic levels in a tropical Brazilian river. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 187, p. 275-284, 2008.
- USEPA. Special report on environmental Endocrine Disruption: An effects assessment and analysis. **US Environmental Protection Agency**, EPA/630/R-96/012, 1997.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.
- VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N. V.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 0034.1-0034.11, 2002.
- VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Molecular Cell**, v. 26, p. 1-14, 2007.
- VENABLES, W.N., RIPLEY, B.D. **Modern Applied Statistics with S**. 4<sup>th</sup> ed. Springer, New York. 45p, 2002.
- VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; DONDERO, F.; MARRO, A.; FABBRI, R. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. **Biomarkers**, v.4, n. 6, p. 455-466, 1999.
- VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, v. 44, n. 1, p. 69–84, 1997.
- WITECK, L.; BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A.; OLIVEIRA, J. D. S.; BAGGIO, D. M.; SOUZA, B. E. Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos de jundiá em água contaminada por cádmio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 477-481, 2011.
- ZARCO-FERNÁNDEZ, S.; COTO-GARCÍA, A.M.; MUÑOZ-OLIVAS, R.; SANZ-LANDALUZE, J.; RAINIERI, S.; CÁMARA, C. Bioconcentration of ionic cadmium and cadmium selenide quantum dots in zebrafish larvae. **Chemosphere**, v. 148, p. 328-335, 2016.
- ZHU, Y.; WANG, J.; BAI, Y.; ZHANG, R. Cadmium, chromium, and copper induce polychromatocyte micronuclei in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 72, p. 78-86, 2004.