



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

***“Parâmetros Sanguíneos de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) no
Monitoramento Ambiental do Chumbo”***

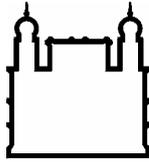
por

Ana Luiza Michel Cavalcante

*Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em
Ciências na área de Saúde Pública.*

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos

Rio de Janeiro, março de 2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Esta dissertação, intitulada

“Parâmetros Sanguíneos de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) no Monitoramento Ambiental do Chumbo”

apresentada por

Ana Luiza Michel Cavalcante

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto

Prof. Dr. Darcílio Fernandes Baptista

Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos – Orientadora

Dissertação defendida e aprovada em 30 de março de 2009

Catálogo na fonte

*Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública*

C376 Cavalcante, Ana Luiza Michel
Parâmetros sanguíneos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) no monitoramento ambiental do chumbo. / Ana Luiza Michel Cavalcante. Rio de Janeiro: s.n., 2009.
ix,59 f., il., tab., graf.

Orientador: Mattos, Rita de Cássia Oliveira da Costa
Dissertação (mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2009

1. Tilápia – sangue. 2. Chumbo – toxicidade.
3. Monitoramento Ambiental. 4. Substâncias Tóxicas.
5. Ambiente Aquático. I. Título.

CDD - 22.ed. – 363.7363

"Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário"
Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, Luiz e Rosaura, por sempre me apoiarem e incentivarem, permitindo a conclusão de mais uma etapa da minha vida profissional.
- À Yvone, que me conhece desde a barriga da minha mãe, e que insistiu e me incentivou a procurar a FIOCRUZ para estagiar na época da graduação, e que, graças à sua insistência, me fez descobrir o amor pela pesquisa.
- À minha orientadora Rita, pela oportunidade, incentivo, dedicação e amizade, desde a época da graduação, pela preciosa orientação na realização desse trabalho e na minha vida profissional.
- Ao Moacelio, pela dedicação desde o início desse projeto, pela atenção, orientação e ajuda em todas as etapas, pela experiência que me foi passada e pelos sábados e feriados, pois sem dúvida todo esse apoio foi fundamental e indispensável para a conclusão desse trabalho.
- Ao amigo e companheiro de bancada, Carlucio, que sempre esteve comigo me ajudando e passando sua experiência.
- Ao amigo Renato, que trabalhou no laboratório me ajudando a concluir meus objetivos, independente de ser final de semana ou feriado.
- Ao Mário, por toda a ajuda prestada, muito além das suas obrigações, que foram essenciais para a realização desse trabalho.
- Aos amigos do laboratório de toxicologia do CESTEH-ENSP-FIOCRUZ: Amanda, Carlucio, Daniele, Isabele, Francisco, Leandro, Vinicio, Simone, Ely, Nathália, Murata, Daniel e Helena, que me proporcionaram momentos alegres e leves durante o dia de trabalho, além de muitas vezes me ajudarem quando precisei.
- À Cooperativa dos Aqüicultores do Sul Fluminense Peixesul, pela atenção e assistência na obtenção dos peixes.
- Aos professores e amigos do mestrado, em especial à Sayonara, Wilma, Luciana, Priscila, Isabele e Francisco, que me acompanharam nessa jornada.
- A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

RESUMO

O despejo de substâncias químicas, tanto do lixo urbano quanto do industrial, é o principal responsável pelas altas concentrações de substâncias tóxicas no ambiente aquático. Os efeitos adversos e os riscos que essas substâncias podem causar ao ecossistema aquático e terrestre tem se tornado alvo de grande preocupação no momento. O chumbo é um metal largamente empregado em indústrias e por isso um dos contaminantes ambientais mais comuns, tóxico para os homens e para os animais. Um dos efeitos adversos do chumbo é a diminuição da biossíntese do radical HEME da hemoglobina, através da inibição da enzima ácido delta-aminolevulínico desidratase (ALAD). O chumbo inorgânico é considerado uma substância carcinogênica para animais e um provável carcinógeno para humanos. Os peixes têm sido utilizados como um importante modelo biológico para averiguar as interações bioquímicas dos xenobióticos que podem afetar o homem. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial do uso de exemplares comerciais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) como espécie sentinela no monitoramento *in situ* do chumbo no ambiente aquático. Exemplares machos de tilápia, pesando em torno de 450g, foram obtidos de um abatedouro próximo à cidade do Rio de Janeiro (Cooperativa Peixesul, Piraf-RJ) e transportados para o laboratório em sacos plásticos contendo água saturada com oxigênio. Cada peixe foi mantido em 50L de água potável filtrada por carvão ativado e celulose e aerada continuamente. Os peixes foram anestesiados com eugenol antes da injeção no peritônio de acetato de chumbo dissolvido em uma solução isotônica de glicose. Os peixes foram sangrados através da veia caudal com uma seringa lavada com uma solução de heparina e equipada com uma agulha bem fina (0,3mm), coletando-se um máximo de 200µL de sangue a cada dia depois da injeção do chumbo. Esse modelo permitiu o acompanhamento dos efeitos do chumbo no mesmo animal com até sete coletas de sangue durante nove dias. Foram testadas doses únicas de 1 e de 100mg de acetato de chumbo por quilograma de peixe, usando controles injetados com a mesma quantidade de solução de glicose por quilograma de peixe que foram tratados da mesma maneira. Imediatamente depois da coleta do sangue, alguns parâmetros foram determinados: hematócrito, hemoglobina, glicose e as atividades das enzimas ALAD, catalase e transaminases. Dois esfregaços de sangue foram feitos no mesmo momento para posterior observação de possíveis deformações nucleares. As duas únicas diferenças significativas entre peixes controles e expostos foram a inibição da ALAD e o aumento da glicose, nas duas doses testadas (1 e 100mg/kg). A inibição máxima de ALAD (50%) com a dose de 100mg/kg foi alcançada somente um dia depois da injeção do chumbo, sem nenhuma recuperação depois de quatro dias. O maior aumento da glicose (300-400%) com a dose de 1mg/kg foi alcançado dois dias depois da injeção do chumbo, com uma completa recuperação depois de nove dias. As necropsias mostraram um edema hepático na dose de 100mg/kg, mas as transaminases, biomarcadores bem conhecidos de lesão hepática, não foram alteradas. Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que a tilápia pode ser utilizada como importante ferramenta para o monitoramento ambiental *in situ* do chumbo.

ABSTRACT

The dumping of chemical substances, both urban and industrial wastes, is principally responsible for the high concentrations of toxic substances in the aquatic environment. There is great concern about the adverse effects and risks these substances cause to the terrestrial and aquatic ecosystem. Lead is a metal largely used in industry and is one of the most common environmental contaminants toxic to animals and men. One of lead's adverse effects is decreased biosynthesis of the HEME radical of hemoglobin through inhibition of the enzyme delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD). Lead is a carcinogenic substance to animals and probably to humans. Fish have been used as an important biological model to study the biochemical interactions of xenobiotics which can affect humans. We evaluated the potential of using a commercial fish (tilapia, *Oreochromis niloticus*) as a sentinel species for *in situ* monitoring of lead in aquatic environment. Male specimens of tilapia, weighing around 450g, were bought at a fish abattoir near Rio de Janeiro City (Cooperativa Peixesul, Pirai RJ) and transported to the laboratory in plastic sacs filled with oxygen saturated water. Each fish was maintained in 50L of filtered through charcoal and cellulose aerated potable water. Fish were anesthetized with eugenol before peritoneal injection with lead acetate dissolved into isotonic glucose solution. The caudal vein of each fish was punctured with a syringe rinsed with heparin using a very thin needle and a maximal of 200 μ L of blood was collected each day after lead injection. This model allowed the following the lead effects puncturing the same fish up to seven times during nine days. Single doses of 1 and 100mg of lead acetate per kilogram of fish were tested and controls injected with the same amount of glucose solution were treated in the same way. Immediately after collecting blood, some parameters were assayed: hematocrit, hemoglobin, glucose and the activity of the enzymes ALAD, catalase and transaminases. Two blood distentions were prepared at the same moment for further observation of possible nuclear deformations. The two main significant differences between exposed and control fish were ALAD inhibition and glucose rising, in the two doses tested. The maximum ALAD inhibition (50%) with 100mg/kg dose was reached only one day after lead injection, without any recovering until five days. The maximum glucose rising (300-400%) with 1mg/kg dose was attained two days after lead injection, with complete recovered after nine days. The necropsies showed a liver edema with 100mg/kg dose but the plasma transaminases, well known biomarkers of liver damage, were not affected. These results shown that tilapia has a good potential for *in situ* monitoring of aquatic xenobiotics.

LISTAS DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Avaliação da frequência (%) de aparecimento de lesões nucleares em eritrócitos de tilápias expostas ao acetato de chumbo	28
Tabela 2 - Avaliação da frequência (%) de aparecimento de alterações nucleares em hemácias de tilápias expostas por diferentes tempos a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo	29
Tabela 3 - Padronização do método para a determinação de ALAD em sangue de tilápias expostas ao acetato de chumbo.	30
Figura 1 - Exemplos de alterações nucleares que foram avaliadas nesse trabalho	31
Figura 2 - Massa e parâmetros sanguíneos de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo (Parte A)	32
Figura 3 - Parâmetros sanguíneos de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo (Parte B)	33
Figura 4 - Morfologia de tilápias expostas a 100mg/kg de acetato de chumbo....	34
Figura 5 – Massa e parâmetros sanguíneos de tilápias expostas a uma dose de 1mg/kg de acetato de chumbo (Parte A)	35
Figura 6 - Parâmetros sanguíneos de tilápias expostas a uma dose de 1mg/kg de acetato de chumbo (Parte B)	36
Figura 7 - Morfologia de tilápias expostas a 1mg/kg de acetato de chumbo	37
Figura 8 – Massa e parâmetros sanguíneos de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo (Parte A)	38
Figura 9 - Parâmetros sanguíneos de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo (Parte B)	39

ABREVIATURAS

ALA	Àcido delta aminolevulínico
ALAD	Ácido delta aminolevulínico desidratase
ALA-P	Ácido delta aminolevulínico plasmático
ALAS	Ácido delta aminolevulínico sintetase
ALA-U	Ácido delta aminolevulínico urinário
ALT/TGP	Alanina Amino Transaminase
AST/TGO	Aspartato Amino Transaminase
CAT	Catalase
CCE	Comissão da Comunidade Européia
CESTEH	Centro de Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
CEUA	Comitê Ético no Uso de Animais
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GR	Glutationa redutase
GSH-Px	Glutationa peroxidase
IARC	Agência Internacional para Pesquisa do Câncer
IC50	Concentração Inibitória de 50%
MN	Micronúcleo
NIOSH	Institute for Occupational Safety and Health
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
PAHs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Pb-S	Chumbo Sanguíneo

Pb-U	Chumbo Urinário
PCBs	Bifenilos policlorados
pH	Potencial Hidrogeniônico
SH	Grupamento Sulfidril
SOD	Superóxido redutase
TCA	Ácido tricloroacético
TOA	Total de outras alterações do núcleo
USP	United States Pharmacopeia
Vortex	Homogeneizador da marca Velp Scientifica
ZPP	Zincoprotoporfirina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos Gerais	1
1.2	O Chumbo	2
1.2.1	Fontes de contaminação ambiental	3
1.2.2	Cinética no meio ambiente	4
1.2.3	Aspectos da toxicidade	6
1.3	Biomarcadores	11
1.4	A Enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD)	14
1.5	O Teste de Micronúcleos	15
1.6	Aspectos da espécie <i>Oreochromis niloticus</i>	18
1.7	Objetivos	19
1.7.1	Objetivo geral	19
1.7.2	Objetivos específicos	19
2	MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1	Material	20
2.1.1	Reagentes	20
2.1.2	Equipamentos	20
2.1.3	Animais	20
2.2	Métodos	20
2.2.1	Lavagem e descontaminação da vidraria	20
2.2.2	Anestesia, biometria e exposição	21
2.2.3	Coleta do sangue	21
2.2.4	Parâmetros sanguíneos	22
2.3	Protocolos experimentais e padronizações	24
2.3.1	Exposição	24
2.3.2	Coleta do sangue	24
2.3.3	Determinação de ALAD em sangue total	25
2.3.4	Parâmetros morfológicos	25
3	RESULTADOS	26
3.1	Padronizações	26
3.2	Cinética de parâmetros sanguíneos na exposição ao chumbo	27
4	DISCUSSÃO	40
4.1	Conclusões	49
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

Os ambientes aquáticos devem ser monitorados por causa de contaminações resultantes de atividades industriais, agrícolas e outras atividades antropogênicas. O despejo de substâncias químicas, tanto do lixo urbano quanto do industrial, são os responsáveis pelas altas concentrações de substâncias tóxicas no ambiente aquático, embora muitos países tenham desenvolvido atividades reguladoras. O potencial efeito adverso e o risco que essas substâncias podem causar ao ecossistema aquático e terrestre tem se tornado alvo de grande preocupação. Esse despejo de diversos efluentes nos recursos hídricos leva a efeitos ecológicos diferentes e, conseqüentemente, a diferentes tipos de poluição. Minas e indústrias produzem efluentes tóxicos que se jogados nos rios podem causar efeitos tóxicos, diminuindo o número de espécies e indivíduos que habitam o local¹.

Metais pesados liberados no meio ambiente são importantes na poluição ambiental, podendo afetar lagos e rios e, por conseqüência, os peixes². Estes metais, como o chumbo (Pb), podem afetar mecanismos fisiológicos e bioquímicos nos peixes, que são animais extremamente importantes para o ecossistema e utilizados como fonte de alimento para o homem³.

Recursos naturais afetados pela contaminação ambiental por chumbo podem causar a diminuição da quantidade de espécies de vida livre. Em águas doces, algas, invertebrados e peixes coletados próximos a áreas industriais, áreas urbanas e minas de chumbo, têm apresentado uma concentração elevada deste metal nos seus tecidos, em comparação com animais coletados em áreas sem esse histórico⁴.

Os peixes têm sido utilizados como um importante modelo biológico para averiguar as potenciais interações químicas dos xenobióticos. Ao mesmo tempo, o estudo do metabolismo de substâncias químicas nos peixes permite compreender a toxicidade química nos diferentes níveis de organização biológica, tanto ao nível individual, como da população ou comunidade⁵. Apesar disso, o potencial dos efeitos, inclusive dos efeitos genotóxicos, em organismos aquáticos expostos a estes poluentes ainda é muito pouco compreendido⁶.

Os peixes têm sido considerados bons indicadores para a detecção de contaminação de recursos hídricos por substâncias genotóxicas^{7,8}. São vertebrados fáceis de manter em laboratório e de expor a substâncias tóxicas e, por esse

motivo, diversos ensaios laboratoriais têm utilizado o peixe, tanto *in vitro* como *in vivo*, como sistema modelo para estudos toxicológicos, carcinogênicos, bioquímicos, neurológicos, endocrinológicos e de desenvolvimento⁹. Além disso, os peixes respondem aos agentes tóxicos de forma similar aos mamíferos, podendo ser usados para testar os possíveis efeitos teratogênicos e carcinogênicos para humanos. Contudo, sua maior utilização tem sido para determinar a distribuição e os efeitos tóxicos de contaminantes químicos no ambiente aquático⁶.

A presença de poluentes no ambiente em concentrações elevadas pode gerar uma série de efeitos graves para diferentes organismos. Para se conhecer o impacto destas substâncias químicas no ambiente aquático têm sido utilizados os biomarcadores, que demonstram uma resposta biológica, ao nível molecular, celular, fisiológico e até comportamental, e que pode estar relacionada com a exposição a produtos químicos liberados no ambiente⁵.

Apesar do amplo uso do chumbo no Brasil durante os dois últimos séculos ter provocado a exposição, de forma direta ou indireta, da população moradora das áreas próximas às indústrias e minas, as pesquisas nacionais sobre os efeitos tóxicos em humanos e no ecossistema ainda são muito escassas e dispersas¹⁰.

Um estudo envolvendo biomarcadores em peixes, como a atividade da enzima ALAD e frequência de aparecimento de micronúcleos, pode prevenir que danos ambientais atinjam a saúde humana. Esses biomarcadores podem ser usados na avaliação ambiental, monitorando tanto a presença como o potencial genotóxico do chumbo muito antes do aparecimento de seus efeitos irreversíveis.

1.2 O Chumbo

O chumbo é um metal cinza azulado, maleável, com baixo ponto de fusão, altamente resistente à corrosão, com alta densidade, alta opacidade a raios X e gama, reativo eletroliticamente com ácido sulfúrico, com estabilidade química no ar, solo e água e com capacidade cumulativa. Ocorre naturalmente na crosta terrestre e normalmente se apresenta ligado a outro elemento¹¹. Devido às suas propriedades, tornou-se um metal de importância comercial e de ampla aplicação na indústria^{11, 12}.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece o chumbo como um dos elementos químicos mais perigosos à saúde humana¹³. O chumbo pode estar

presente no ambiente em duas formas: o chumbo inorgânico, que engloba os sais de chumbo e o chumbo metálico, e o chumbo orgânico¹⁴. O chumbo-tetraetila e o chumbo-tetrametila são exemplos importantes de compostos orgânicos sintetizados industrialmente em que o metal aparece ligado ao carbono. Estes compostos são usados como aditivos em combustíveis¹¹.

A reserva mundial de chumbo é estimada em $7,1 \times 10^7$ toneladas, com mais de um terço localizado na América do Norte. Nos últimos três séculos, os níveis de chumbo no ambiente (sem levar em consideração os depósitos de minério) aumentaram como resultado da atividade do homem. O maior uso do chumbo nos dias de hoje é para a produção de baterias usadas nas indústrias automobilísticas¹¹.

No Brasil, o chumbo foi retirado da gasolina na final dos anos de 1980 e a última mina de chumbo e principal fundição foram fechadas em 1995, deixando uma contaminação ambiental por chumbo residual. Além disso, existem centenas de pequenas fábricas de recuperação de baterias espalhadas pelo país e fundições que produzem contaminação por chumbo das áreas urbanas¹⁰.

A legislação brasileira, por meio da Norma Regulamentadora NR-7 (Portaria nº 24, de 29/12/94), estabelece que a concentração máxima de chumbo no sangue (Pb-S) deve ser igual ou inferior a $40\mu\text{g}/\text{dl}$ (Valor de Referência de Normalidade) e o limite de tolerância biológica (Índice Biológico Máximo Permitido), é de $60\mu\text{g}/\text{dl}$ ¹⁵.

1.2.1 Fontes de contaminação ambiental

As fontes de contaminação por chumbo podem ser antropogênicas ou naturais, sendo estas de menor importância. O chumbo é encontrado em todos os compartimentos da biosfera e em diversas formas químicas. As principais fontes naturais são emissões vulcânicas, intemperismo geoquímico e névoas aquáticas, estando presente naturalmente em plantas. Entre as fontes antropogênicas encontram-se as fábricas de baterias de automóveis, as ligas metálicas, os pigmentos de tinta, a munição, a mineração, a fundição e a gasolina¹¹.

Até aproximadamente 1970, quase toda a gasolina utilizada no mundo continha chumbo como um de seus aditivos¹⁶. Mesmo com a redução, e em alguns países eliminação, do chumbo acrescentado à gasolina, além de seu emprego mais racional na indústria, a exposição ao mesmo ainda constitui-se um grave problema

de saúde ocupacional e ambiental. O maior volume dos compostos orgânicos do chumbo lançados na atmosfera resulta de processos industriais como o refinamento do chumbo primário (proveniente do minério) e secundário (oriundo da recuperação de sucatas ou baterias) e do uso da gasolina que contém o chumbo tetraetila como aditivo antidetonante¹¹.

1.2.2 Cinética no meio ambiente

O chumbo pode ser lançado no ar, água e solo. Na atmosfera o chumbo encontra-se na forma particulada. Essas partículas quando lançadas no ar podem ser removidas da atmosfera e transferidas para superfícies e compartimentos ambientais por deposição seca ou úmida. Cerca de 40 a 70% da deposição do chumbo ocorre por precipitação úmida, dependendo de fatores como localização geográfica, nível de emissão na área e índices pluviométricos, sendo esta forma de deposição mais significativa que a seca para a remoção do metal da atmosfera^{11,12}.

O tamanho da partícula constitui um fator importante na determinação do transporte atmosférico do metal. Partículas grandes, com diâmetro superior a 2µm, precipitam da atmosfera rapidamente e são depositadas relativamente próximas às fontes de emissão, enquanto que partículas pequenas podem ser transportadas a muitos quilômetros de distância¹¹.

O acúmulo de chumbo no solo ocorre principalmente em função da taxa de deposição (seca ou úmida) da atmosfera. Vários fatores irão interferir na disponibilidade do metal e, conseqüentemente, no transporte do chumbo para o interior do solo ou para a água, tais como pH, composição mineral do solo, quantidade de matéria orgânica, entre outros¹⁷.

O chumbo é fortemente adsorvido à matéria orgânica e, embora pouco sujeito à lixiviação, pode entrar nas águas superficiais como resultado da erosão do solo. O movimento do chumbo do solo para águas profundas é muito lento na maioria das condições naturais, exceto para situações de elevada acidez. São condições que induzem o escoamento do chumbo: a presença de chumbo no solo em concentrações que se aproximam ou excedem a capacidade de troca catiônica de tal meio; a presença de materiais que são capazes de formar quelatos solúveis com o chumbo; e o decréscimo do pH da solução de lixívia (como a chuva ácida)^{11,12}.

Os ecossistemas aquáticos, em geral, funcionam como os principais receptáculos finais de diferentes tipos de substâncias químicas, mesmo das que não são lançadas diretamente nos corpos de água. O chumbo que é depositado no ambiente aquático é proveniente da atmosfera, da lixiviação do solo e do despejo direto do contaminante. Neste meio, o metal se divide rapidamente entre o sedimento e a fase aquosa, dependendo do pH da água, dos sais nela dissolvidos e da presença de agentes complexantes orgânicos^{11,12}.

Um dos fatores mais importantes que influenciam a toxicidade do chumbo na água é a concentração de íons livres, que afeta a disponibilidade do chumbo aos organismos. Em sistemas aquáticos contaminados, uma pequena fração do chumbo está dissolvida na água, pois a maior parte do metal encontra-se fortemente ligado ao sedimento. Em organismos aquáticos, a captação e o acúmulo do chumbo da água e dos sedimentos são influenciados por vários fatores ambientais tais como: temperatura, salinidade e pH, além do conteúdo dos ácidos húmico e algínico^{17,18}.

O chumbo no meio ambiente encontra-se principalmente particulado e ligado a outros compostos, tornando-se relativamente pouco móvel e biodisponível. Bioacumula-se na maioria dos organismos, em particular na biota que se alimenta principalmente de partículas, como por exemplo, mexilhões e minhocas. Em geral, a biomagnificação (aumento da concentração) deste metal na cadeia trófica é muito baixa. Organismos aquáticos de baixos níveis na cadeia trófica apresentam uma maior acumulação de chumbo do que os de maiores níveis. Contudo, estes fatos não significam ausência de perigo¹⁹.

A captação de chumbo pelos peixes alcança um equilíbrio somente após algumas semanas de exposição. O chumbo acumula-se principalmente nas brânquias, no fígado, nos rins e nos ossos. Os ovos dos peixes mostram um aumento dos níveis de chumbo com o aumento da concentração de exposição e existem indicações de que o chumbo está presente na superfície do ovo, mas não é acumulado no embrião. Os organismos, geralmente, incorporam o chumbo do ambiente em proporção com o grau de contaminação. Concentrações de chumbo em alguns peixes marinhos são maiores nas brânquias e na pele do que em outros tecidos. No fígado, os níveis aumentam significativamente com a idade¹⁷.

Uma vez lançado no ambiente, o chumbo pode ser transformado de uma espécie inorgânica para outra, ou de um tamanho de partícula para outro, entretanto, o

elemento não está sujeito à degradação. Existe uma pequena evidência que sugere que a transformação natural de chumbo inorgânico para chumbo metilado não tem nenhuma importância ambiental, diferente de muitos metais que são convertidos para as formas orgânicas pelos microorganismos do solo¹⁹.

Em geral, compostos inorgânicos de chumbo apresentam toxicidade mais baixa para microrganismos do que os tri e tetraquil compostos. O chumbo tetraquilado torna-se tóxico pela decomposição em chumbo triquil iônico¹⁷.

1.2.3 Aspectos da toxicidade

A absorção do chumbo proveniente de fontes ambientais depende da quantidade do metal nas portas de entrada e de seu estado físico e químico, além de ser influenciada por fatores individuais como idade, estado fisiológico, condição nutricional e, possivelmente, fatores genéticos do indivíduo exposto^{12,14}.

O chumbo pode ser absorvido por via oral, inalatória e/ou cutânea, sendo esta última menos significativa para o chumbo inorgânico. Em relação ao chumbo orgânico, estudos com animais demonstraram uma boa absorção através da pele^{11,12,20}.

A absorção pela via respiratória consiste na inalação de aerossóis que se depositam no trato respiratório. Pode ser influenciada pelo tamanho da partícula, solubilidade e pela região do trato respiratório em que o aerossol foi depositado. Partículas maiores que 2,5µm são depositadas nas vias aéreas ciliadas (regiões nasofaríngea e traqueobrônquica) e podem ser transportadas pelo mecanismo mucociliar para o esôfago, onde serão deglutidas. Partículas menores que 1µm são depositadas na região alveolar, onde será absorvida¹¹.

A taxa de absorção gastrointestinal de chumbo inorgânico ingerido é influenciada pelo estado fisiológico do indivíduo, como idade, jejum, taxa de ferro e cálcio, gravidez e por características físico-químicas do meio ingerido, como tamanho da partícula, mineralogia, solubilidade, além da quantidade de chumbo ingerido. Adultos podem absorver 3-10% de uma dose oral de chumbo solúvel em água, enquanto crianças absorvem 40-50%^{11,12,20}.

A absorção cutânea de chumbo inorgânico pela pele íntegra é considerada mínima. Com relação a compostos orgânicos, como chumbo tetraquilado, estudos

em animais de experimentação indicaram que são absorvidos rapidamente pela pele em coelhos e ratos¹².

Uma vez absorvido, a distribuição do chumbo ocorre de forma similar, independente da via pelo qual foi absorvido. A distribuição do chumbo no organismo depende, inicialmente, de sua taxa de distribuição, através do fluxo sanguíneo, para os órgãos e tecidos. Uma subsequente redistribuição pode ocorrer baseada na relativa afinidade do metal pelos tecidos e na sua toxicodinâmica^{11,12}.

A distribuição do chumbo no organismo não ocorre de forma homogênea. Três compartimentos foram identificados nessa distribuição: o sangue, os ossos e os tecidos moles, tendo o chumbo diferentes tempos de meia vida nesses compartimentos¹². Além disso, o chumbo pode atravessar a membrana placentária provocando efeitos teratogênicos em fetos²⁰.

O chumbo absorvido chega à circulação sanguínea e é transportado através do plasma ligado a proteínas plasmáticas, como a albumina. Rapidamente é transportado para as células vermelhas do sangue (99%), consideradas como um dos maiores compartimentos para o armazenamento e transporte do chumbo no organismo. Nos eritrócitos grande parte do chumbo se liga à hemoglobina, e uma pequena fração se liga a proteínas de alto peso molecular e, principalmente, à enzima ácido delta-aminolevulínico desidratase (ALAD)¹¹.

Do sangue o chumbo distribui-se para os tecidos moles, como fígado, rins e cérebro, e para ossos. Em adultos, cerca de 94 % da quantidade corpórea de chumbo é encontrada nos ossos, tornando este o principal compartimento do chumbo. Este armazenamento não é homogêneo, se concentrando mais nos ossos corticais (compactos) e nas trabéculas ósseas, sendo este último a porção que mantém equilíbrio com o chumbo sanguíneo já que aí apresenta maior mobilidade. Ossos mantêm os níveis de chumbo no sangue mesmo depois de um longo tempo do término da exposição^{11,12}.

O metabolismo ou biotransformação do chumbo inorgânico consiste, principalmente, em reações de ligações reversíveis, incluindo a formação de complexos com aminoácidos e tiós não protéicos e ligações com várias proteínas. Os compostos alquílicos de chumbo são ativamente metabolizados no fígado por desalquilação oxidativa catalisada pelo citocromo P-450¹¹.

Independente da via de absorção, o chumbo é eliminado principalmente pelas fezes (excreção biliar) e urina, e por outras vias de menor eliminação, como saliva, suor, cabelo, unhas e leite materno^{11,12}. Cerca de 60% do chumbo absorvido são retidos pelo organismo e 40%, excretados¹².

O chumbo pode afetar uma série de sistemas nos organismos vivos cujos efeitos serão dependentes do nível e da duração da exposição¹². Este metal é extremamente tóxico para os sistemas nervoso central (SNC) e periférico, renal, hematopoiético e trato gastrintestinal. Pode afetar também o sistema cardiovascular, causar alterações endócrinas, imunológicas, danos reprodutivos e causar efeitos carcinogênicos e mutagênicos. A diversidade de sistemas afetados gera vários sintomas que, juntos, levam a um estado patológico denominado Saturnismo. Os sintomas mais comuns são: fraqueza, irritabilidade, astenia, náusea, dor abdominal com constipação e anemia^{11,21}.

Em relação aos peixes, os jovens são mais susceptíveis ao chumbo do que os peixes adultos ou ovos, que são menos sensíveis, pois o chumbo é absorvido pela superfície do ovo e não alcança o embrião. O limite máximo aceitável para chumbo inorgânico foi determinado em várias espécies sob diferentes condições, variando de 0,04 a 0,198mg/L. A toxicidade aguda do chumbo é altamente dependente de outros íons na solução e a medida do chumbo dissolvido nos testes de toxicidade é essencial para obtenção de resultados mais reais. Os compostos orgânicos são mais tóxicos para os peixes do que sais inorgânicos de chumbo¹⁹.

Sintomas típicos da toxicidade do chumbo nos peixes incluem: atrofia muscular, lordo-escoliose, paralisia, enegrecimento da região da cauda (sintoma neurotóxico), degeneração da nadadeira caudal, hiperatividade, natação errática, perda de equilíbrio e mortalidade. Os peixes adultos expostos por um longo tempo a chumbo inorgânico apresentam efeitos subletais na reprodução, no crescimento, no comportamento, na morfologia e na atividade de ALAD e de outras enzimas^{19,22}.

Dentre os efeitos citados é importante destacar as alterações mutagênicas e/ou carcinogênicas, de grande relevância para a saúde pública, e as hematopoiéticas, identificadas com baixas doses de exposição ao chumbo.

1.2.3.1 Efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos

Estudos genotóxicos em humanos, tentando correlacionar a exposição ao chumbo e ocorrência de câncer, têm mostrado pouco poder de predição específica do risco relacionado ao metal, devido às populações expostas sofrerem diversas outras exposições a carcinógenos sobrepostas, tais como: arsênio, dieta e tabagismo. Em função dos resultados obtidos em experimentos com animais foi demonstrado que os compostos de chumbo inorgânico são carcinogênicos e a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) classificou os compostos de chumbo da seguinte maneira²¹:

- Compostos de chumbo inorgânico:
 - Grupo 2A - prováveis carcinogênicos para humanos;
- Compostos de chumbo orgânico:
 - Grupo 3 - não classificáveis como carcinogênicos.

Experimentos realizados em células de mamíferos expostas ao chumbo inorgânico, como o acetato de chumbo, mostraram a formação de micronúcleos com baixas concentrações deste metal²¹.

As substâncias químicas mutagênicas têm uma grande probabilidade de induzir efeitos carcinógenos em várias espécies de peixes. Um estudo realizado por Harshbarger & Clark²³ demonstrou a presença de tumores em locais múltiplos e específicos nos peixes causados por herbicidas e pesticidas, porém pouco se sabe sobre este potencial genotóxico.

Genotoxicidade é um termo geralmente referente a alterações na estrutura ou conteúdo dos cromossomos (clastogenicidade) ou nas seqüências dos pares de base do DNA (mutagenicidade), causada pela exposição a agentes tóxicos⁶.

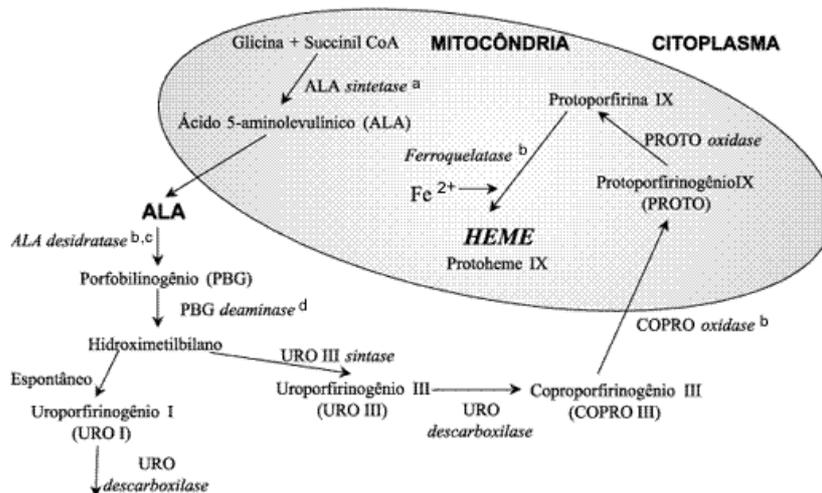
1.2.3.2 Efeitos no sistema hematopoiético

O chumbo afeta várias reações enzimáticas da síntese do HEME, alterando as concentrações dos precursores no sangue e na urina. Ele inibe essa biossíntese e diminui o tempo de vida dos eritrócitos, levando a uma anemia microcítica hipocrômica. Estes efeitos são observados tanto em homens como em animais^{11,12}.

As seguintes enzimas têm suas atividades alteradas pelo chumbo na biossíntese do HEME: ácido δ -aminolevulínico sintetase (ALAS), ácido δ -

aminolevulínico desidratase (ALAD) e ferroquelatase. Os resultados finais dessas alterações enzimáticas são expressos por: aumento urinário de porfirinas, coproporfirinas e ácido δ -aminolevulínico (ALA); aumento de ALA sanguíneo e plasmático; e pelo aumento da protoporfirinas eritrocitária livre e ligada ao zinco (zincoprotoporfirina – ZPP)^{11,20}.

O chumbo estimula indiretamente a enzima ALAS na mitocôndria, que catalisa a reação de condensação de moléculas de glicina e succinil CoA para formar o ALA. Posteriormente, no citoplasma, o chumbo inibe a enzima ALAD, que catalisa a reação de condensação de duas moléculas de ALA para formar o porfobolinogênio. Essa inibição ocorre de forma não competitiva pela ligação do chumbo com o radical sulfidrila do sítio ativo da ALAD, onde se liga o zinco. O chumbo também diminui a atividade da enzima ferroquelatase na mitocôndria, a qual é responsável por catalisar a inserção do ferro na protoporfirina IX para formar o HEME. O chumbo inibe esta enzima se ligando ao radical sulfidrila de seu sítio ativo, ou de forma indireta, prejudicando o transporte de ferro na mitocôndria, devido ao rompimento da estrutura mitocondrial. Outras enzimas da síntese do HEME possuem grupamento sulfidrila (SH), porém não são tão sensíveis a inibição pelo chumbo quanto a ALAD e a ferroquelatase^{11,14,20,24}. A biossíntese do HEME está esquematizada no Quadro 1 a seguir²⁵.



Quadro 1 - Biossíntese do HEME, adaptado de Onuki e colaboradores²⁵.

O “threshold” (limiar de concentração) de chumbo no sangue para a diminuição dos níveis de hemoglobina, em adultos ocupacionalmente expostos ao

chumbo, é estimado em 50µg/dL. Em crianças, esse limiar é estimado em torno de 40µg/dL^{11,12}. Porém, segundo Schwartz e colaboradores²⁶, os efeitos adversos no hematócrito podem ocorrer em concentrações mais baixas de chumbo no sangue de crianças (> 20µg/dL).

1.3 Biomarcadores

Os biomarcadores são muito importantes nas pesquisas ecotoxicológicas, pois identificam áreas contaminadas e potenciais estressores químicos que podem ser relacionados com as atividades humanas²⁷. O uso dos biomarcadores pode fornecer mais informações a respeito dos efeitos biológicos dos poluentes do que uma simples quantificação de seus níveis no ambiente, além de determinar alterações adversas precoces, que na grande maioria das vezes são reversíveis²⁸.

Várias definições já foram formuladas para o termo “biomarcador”, nas quais geralmente está inserida a interação entre o sistema biológico e um potencial perigo, o qual pode ser químico, físico ou biológico²⁹. Biomarcador é uma alteração na resposta biológica, desde níveis molecular, celular e fisiológico até comportamental, que pode estar relacionada com a exposição ou a efeitos tóxicos de substâncias químicas liberadas no ambiente⁵.

Os termos biomarcador e bioindicador têm sido definidos de diversas maneiras, causando uma certa confusão entre eles, esclarecida por alguns autores como Van Gestel & Van Brummelen³⁰. Segundo estes autores, biomarcador é qualquer resposta biológica a um químico ambiental ao nível subcelular, que pode ser medida em um organismo ou em seus produtos (urina, fezes, cabelo, etc), indicando uma alteração do estado normal que não pode ser detectada em um organismo intacto. Já bioindicador é definido como um organismo que fornece informações sobre as condições ambientais do seu habitat, através da sua presença ou ausência, ou mesmo pelo comportamento. Efeitos a nível fisiológico não se encaixariam nessa definição. Biomarcadores podem ser medidas de exposição, enquanto bioindicadores são definidos com menor precisão e podem ser vistos, tanto como entidades estruturais (espécie sentinela) ou mesmo serem considerados como efeitos funcionais em níveis de organização mais elevada⁵.

Os biomarcadores podem ser divididos em três categorias²⁹:

- Biomarcadores de Exposição - abrangem a detecção ou mensuramento de uma substância exógena ou de seus metabólitos na própria matriz biológica.
- Biomarcadores de Efeito - refletem alterações bioquímica, fisiológica ou outras alterações nos tecidos ou fluidos corporais de um organismo que podem ser associadas a algum prejuízo a saúde ou a uma doença.
- Biomarcadores de Susceptibilidade - referem a uma habilidade inerente ou adquirida de um organismo a responder a uma exposição a uma substância xenobiótica específica, incluindo fatores genéticos e mudanças nos receptores que alteram a susceptibilidade do organismo a uma determinada exposição.

Em relação ao chumbo, os biomarcadores mais utilizados têm sido: chumbo em sangue (Pb-S) e na urina (Pb-U), como exemplos de biomarcadores de exposição; determinação da concentração do ácido delta aminolevulínico na urina (ALA-U) e no plasma (ALA-P), Zinco protoporfirina (ZPP) e determinação da atividade da ALAD, exemplos de biomarcadores de efeito, além do de susceptibilidade que é o polimorfismo da ALAD, que fornece dois alelos designados de ALD-1 e ALAD-2³¹.

Em peixes, e no ecossistema aquático em geral, o estudo do impacto de xenobióticos tem sido analisado a partir de vários tipos de biomarcadores de exposição e efeito, divididos nos grupos a seguir²⁸:

Enzimas de biotransformação: São os biomarcadores de efeito mais sensíveis, cuja atividade nos peixes pode ser alterada após exposição a um químico. Como exemplos dessas enzimas têm a indução do citocromo P450 em peixes expostos a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e hidrocarbonetos clorados, como os bifenilos policlorados (PCBs)³².

Parâmetros do estresse oxidativo: Podem ser influenciados por diversas substâncias tóxicas presentes no ambiente ou por seus metabólitos³³. Embora a poluição aquática seja uma das principais responsáveis pelo estresse oxidativo, existe uma produção constante de espécies reativas de oxigênio (ERO) no organismo. A exposição a poluentes leva ao aumento da produção de ERO nos organismos, caracterizando o estresse oxidativo como uma resposta às condições ambientais³⁴. Em condições fisiológicas normais os efeitos maléficis das espécies

reativas de oxigênio, ou comumente chamadas de radicais livres, são efetivamente neutralizados por sistemas de defesas antioxidantes do organismo, ocorrendo um equilíbrio entre a taxa de produção e a taxa de eliminação de ERO. Se houver um excesso da produção de radicais livres, a redução do sistema de defesa ou a conjugação dos dois casos, ocorrerá o estresse oxidativo. Isso levará a danos em macromoléculas celulares e, possivelmente, à inativação de enzimas, ao aumento da peroxidação lipídica, ao dano no DNA e, por último, à morte celular. O sistema de defesa que inibe a formação de radicais livres inclui enzimas antioxidantes, como superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona redutase (GR), utilizadas freqüentemente em estudos ecotoxicológicos³³.

Produtos de biotransformação: Metabólitos nos fluidos corporais, usados muitas vezes quando não se pode determinar a presença de xenobióticos nos tecidos, também são bastante usados como biomarcadores²⁸.

Proteínas de estresse e metalotioneínas: Proteínas envolvidas na proteção e na reparação da célula contra o estresse e as condições adversas, incluindo altas temperaturas, luz ultravioleta, metais pesados e xenobióticos³⁵. As metalotioneínas fazem parte de um grupo especial de proteínas de estresse, que regulam determinados metais e participam da desintoxicação, muito utilizadas na biomarcação dos metais e do estresse por diversos autores^{36,37}.

Parâmetros hematológicos: Nos peixes são considerados importantes biomarcadores de efeito²⁸. Amostras de sangue podem ser regularmente obtidas de forma não destrutiva para a avaliação do efeito, porém parâmetros hematológicos típicos não são respostas específicas para estressores químicos. Por outro lado, fornecem o quadro geral da fisiologia do animal e o estado de saúde. A alanina amino transaminase (ALT ou TGP) e a aspartato amino transaminase (AST ou TGO) são exemplos de aminotransferases cujo aumento da atividade no plasma pode ser um sensível indicador de dano celular na membrana de certos órgãos, principalmente o fígado. Embora menos específicos, pois podem ser influenciados por fatores naturais, outros parâmetros hematológicos como o hematócrito, os teores de hemoglobina, proteína e glicose, podem ser sensíveis a certos tipos de poluentes²⁸. Em alguns estudos esses parâmetros têm sido úteis como biomarcadores de efeito de substâncias químicas em peixes^{38,39,40}.

Parâmetros imunológicos: O sistema imune pode ser deprimido por um grande número de poluentes ambientais, porém é importante destacar que essa depressão pode ser acarretada por outros fatores de estresse, tornando esses biomarcadores não específicos⁵.

Parâmetros reprodutivos e endócrinos: Sabe-se que alguns poluentes persistentes no ambiente diminuem a capacidade reprodutiva de organismos selvagens. Muitos xenobióticos liberados no ambiente possuem atividade endócrina, afetando a reprodução e ameaçando a sobrevivência de muitas espécies^{41,42}.

Parâmetros neuromusculares: Nessa categoria destaca-se a enzima acetilcolinesterase, que é sensível a pequenas concentrações dos pesticidas organofosforados e carbamatos⁴³.

Parâmetros genotóxicos: Substâncias genotóxicas normalmente causam distúrbios celulares que podem levar a modificações na estrutura do DNA, podendo assim causar uma cascata de eventos. A detecção e a quantificação desses eventos podem ser usadas como biomarcadores de exposição e efeito em organismos ambientalmente expostos a substâncias genotóxicas⁴⁴. Adutos de DNA⁴⁴, aberrações cromosômicas⁴⁵, ensaio cometa⁴⁶ e teste do micronúcleo⁴⁷ são alguns exemplos de parâmetros genotóxicos utilizados na toxicologia ambiental.

Parâmetros fisiológicos e morfológicos: Podem ser usados como biomarcadores a histopatologia, a investigação de lesões, alterações ou formação de tumores nos tecidos dos peixes, porém, normalmente, esses danos são irreversíveis²⁸.

1.4 A Enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD)

A enzima ALAD é a segunda enzima da via de biossíntese do HEME. Sua atividade catalítica é a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta aminolevulínico (ALA), com a formação de uma molécula de porfobilinogênio, primeiro precursor do HEME⁴⁸.

Estudos na população geral indicaram que a atividade da ALAD é inibida em concentrações muito baixas de chumbo no sangue, sem um “threshold” (limiar de concentração) aparente, sendo inversamente correlacionada com chumbo em sangue em uma faixa de 3-34 μ g/dL^{11,12}.

A inibição da atividade da ALAD no sangue é um dos efeitos adversos causados pelo chumbo, podendo ser usada como um biomarcador de efeito deste metal no monitoramento biológico^{29,31}. Entre todos os indicadores de exposição ao chumbo, a ALAD é o indicador de efeito mais sensível, e está presente em praticamente todos os seres vivos¹¹.

Na maioria das vezes os biomarcadores de efeito, como a ALAD, são alterações precoces e reversíveis que ocorrem nos órgãos ou tecidos alvos, podendo prever alterações estruturais ou funcionais dos tecidos que seriam irreversíveis e levariam a uma doença clínica³¹.

Alguns autores têm investigado o efeito tóxico do chumbo através da enzima ALAD de algumas espécies de peixe, tais como: *Oncorhynchus mykiss*²²; *Halobatrachus didactylus*³⁶.

A toxicidade do chumbo é dependente do alelo que codifica a produção da ALAD em cada organismo. Existe um polimorfismo genético da ALAD que altera a cinética de distribuição do chumbo nos órgãos alvo. Este polimorfismo codifica três isoenzimas na síntese do heme, ALAD 1-1, ALAD 1-2 e ALA 2-2. O fenótipo ALAD 1-2/2-2 encontra-se mais fortemente ligado ao chumbo no sangue, enquanto que o fenótipo ALAD 1-1 apresenta níveis de chumbo nos ossos mais elevados^{48,49,50,51}.

1.5 O Teste de Micronúcleos

O Teste de Micronúcleos foi originalmente desenvolvido em mamíferos, mas tem sido amplamente usado em estudos de genotoxicidade para estimar danos citogenéticos causados por agentes químicos ou físicos^{52,53}. Embora a maioria dos trabalhos publicados utilize espécies mamíferas, o teste de micronúcleos tem se demonstrado uma ferramenta muito útil quando usado em espécies que não são mamíferas⁵³.

O teste de micronúcleos pode ser usado em pesquisas laboratoriais, para avaliar a genotoxicidade dos xenobióticos^{8,54,55} em estudos *in situ*, para avaliar a qualidade da água^{47,56,57,58}.

Micronúcleos (MN) são formados por cromossomos inteiros ou por fragmentos de cromátides ou de cromossomos que não foram incorporados ao núcleo de célula-filha durante a divisão celular (mitose)^{6,29,52}. São considerados micronúcleos clássicos aquelas estruturas circulares de mesma refração que o

núcleo, não ligadas a esse, e que possuem um tamanho que corresponda de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula^{59,60}. No caso dos peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos cromossomos, a proporção de tamanho passa para a faixa de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo⁶.

O Teste do Micronúcleo serve como o primeiro passo no estudo de qualquer substância mutagênica. É um teste rápido e sensível, tanto para detectar alterações cromossômicas estruturais como numéricas⁵².

O Teste de Micronúcleos in vivo foi criado para distinguir citologicamente de forma fácil e rápida quebras ou perdas cromossômicas. No Teste de Micronúcleos, tanto a técnica de preparação quanto a análise do material, é mais simples e rápida do que nas análises cromossômicas. No monitoramento de quebras cromossômicas o teste do micronúcleo é tão sensível quanto à análise cromossômica, além de incluir efeitos no aparato do fuso. Todas essas propriedades conferem ao teste do micronúcleo uma alta adequação à rotina de estudos toxicológicos⁶⁰.

Técnicas metafásicas, como o ensaio de troca de cromátides irmãs e aberrações cromossômicas, não são práticas para muitas espécies de peixe, pois muitos possuem cariótipo com um grande número de cromossomos pequenos e irregulares⁶.

Uma vez que os peixes teleósteos apresentam eritrócitos nucleados, a presença de micronúcleos pode ser usada como medida da atividade clastogênica (quebra de cromossomos) ou aneugênica (segregação cromossômica anormal) de uma substância em ambiente aquático⁶.

A formação dos micronúcleos só pode ser observada após a ocorrência da divisão celular, sendo sua frequência dentro da população celular altamente dependente da cinética de divisão celular, do tipo de tecido, da espécie que está sendo usada para o teste e das condições ambientais^{6,52}. Em todos os ensaios com micronúcleos deve-se levar em consideração a sua ocorrência espontânea.

Em peixes, a formação de micronúcleos ocorre espontaneamente, porém em uma frequência menor do que em roedores⁶¹. A frequência espontânea de micronúcleos varia dependendo do método usado e da manipulação dos peixes. Os mecanismos pelos quais poluentes induzem micronúcleos em peixes, e a interação entre os efeitos e os poluentes, ainda não são completamente conhecidos⁶.

A grande limitação do uso de MN para a identificação de danos citogenéticos é que agentes ou substâncias que não quebram cromossomos, ou não causam a perda destes na anáfase, não serão detectados como, por exemplo, as aberrações que envolvem rearranjo cromossômico sem ocorrência de fragmento acêntrico⁵².

O uso de MN como marcador intermediário permite mensuração de forma acurada e objetiva da frequência de defeitos no DNA. Além disso, micronúcleos aparecem após o dano, antes mesmo de qualquer alteração pré-maligna clínica ou mesmo histológica⁶².

Estudos têm demonstrado que a formação de MN pode ser reversível. Depois de cessada a exposição a carcinógenos, tem-se observado que a contagem de células com MN reduz rapidamente, sugerindo que, sem a ação do agente genotóxico, o processo de reparo do DNA se torna eficaz⁶³.

Esse teste tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos e aneugênicos requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito^{64,65}.

No Brasil, os testes de ecogenotoxicidade para avaliações ambientais têm sido empregados desde a década de 80. Nos últimos 20 anos, tem-se verificado que os testes de toxicidade com organismos aquáticos constituem uma ferramenta efetiva para avaliação de efeitos de poluentes sobre os organismos vivos, para avaliação do risco/periculosidade de agentes químicos, para o monitoramento da qualidade da água e para o estabelecimento de limites permissíveis de lançamento de efluentes líquidos nos corpos hídricos⁶⁶.

O Teste do Micronúcleo em peixes parece ser um teste promissor nas investigações de mutagênese ambiental⁶ e um indicativo de danos citogenéticos de curta duração⁵⁸.

Além da presença de MN, outras alterações morfológicas nucleares foram relatadas em humanos⁶⁷ e em peixes^{54,56}. Estas alterações apresentam uma relação com a instabilidade genômica, podendo representar uma maneira de eliminar o excesso de material genético do núcleo da célula^{68,69,70}.

1.6 Aspectos da espécie *Oreochromis niloticus*

Oreochromis niloticus Linneaus (Tilápia do Nilo) é uma espécie de peixe originária da África, introduzida em quase todo o Brasil. Tilápia é o nome comum dado a vários gêneros de peixes ciclídeos de água doce pertencentes à sub-família Pseudocrenilabrinae. São amplamente distribuídas em ecossistemas tropicais, e um dos peixes mais importantes na atividade da piscicultura no Brasil, possuindo grande capacidade de inserção e adaptação a diversos tipos de habitat⁷¹.

A tilápia do Nilo foi introduzida na região nordeste do Brasil em 1971, e então disseminada pelo resto de país. O interesse pelo cultivo desta espécie, no sul e sudoeste do país, cresceu rapidamente nos últimos oito anos pela introdução da tecnologia da reversão sexual. A tilápia é criada em diversos sistemas desde a cultura semi-intensiva em tanques que recebem dejetos animais como em cultivo intensivos em "raceways" e tanques-rede. Acredita-se que, no Brasil, metade da produção anual de peixes cultivados seja de tilápias⁷².

Essa espécie é a segunda mais cultivada no mundo nos dias de hoje, atrás apenas da cultura de carpas e salmonídeos. As suas características, que contribuem para esse bom resultado, são: rusticidade; extrema resistência a condições adversas do meio e enfermidades; crescimento rápido e adaptação ao confinamento; hábito alimentar onívoro; e aceitação de rações com grande facilidade, desde o período de pós-larva até a fase de terminação. Além disso, entre as espécies de peixes mais cultivadas é a que melhor resiste a alta temperatura, a baixa concentração de oxigênio dissolvido e a alta concentração de amônia na água^{72,73}.

Alguns estudos têm sido realizados com essa espécie para avaliação da sua resposta toxicológica a diversas substâncias^{3,56,71,74,75}. Segundo Rashed⁷⁶, a tilápia do Nilo mostrou-se um bom indicador biológico para águas poluídas com chumbo e cádmio.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo geral

Avaliar o uso de exemplares comerciais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) para o monitoramento *in situ* do chumbo no ambiente aquático.

1.7.2 Objetivos específicos

- 1 - Avaliar a utilização de um mesmo animal para coletas sucessivas de sangue.
 - 2 - Avaliar o impacto de diferentes doses intraperitoneais de chumbo na atividade da enzima ALAD e na formação de alterações nucleares nos eritrócitos.
 - 3 - Correlacionar alguns parâmetros sanguíneos com esses dois biomarcadores.
-

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Reagentes

Padrão de ALA cloridrato (Sigma-Aldrich, artigo A3785); Heparina Sódica-5000UI/mL (uso humano, USP); Eugenol (uso odontológico); Giemsa (Merck, artigo 1092041022)

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.1.2 Equipamentos

Espectrofotômetro marca Shimadzu modelo UV 160A; Centrífuga marca Eppendorf modelo 5415R; Microscópio marca Olympus modelo BX 51; Vortex mixer marca Velp Científica.

2.1.3 Animais

Foram utilizados cerca de 80 peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, conhecida no Brasil como tilápia-do-nilo, que são animais amplamente cultivados no Estado do Rio de Janeiro. Exemplares machos de tilápia foram obtidos na Cooperativa dos Aquicultores do Sul Fluminense Peixesul Ltda (Peixesul), localizada no município de Piraí no Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram adquiridos no abatedouro, independentemente de sua origem e foram transportados em sacos de plástico com água potável saturada com oxigênio para o Laboratório de Toxicologia do CESTEJ. Cada saco tinha no máximo cinco animais que foram acondicionados no laboratório em dornas de plástico previamente lavadas contendo 50 litros de água potável de abastecimento público previamente purificada pela passagem por filtro de celulose e carvão ativado. Cada peixe foi acondicionado em uma dorna. O tempo de aclimação foi de 3 dias. A água de cada dorna foi trocada a cada 48 horas. Os animais não foram alimentados durante o período que permaneceram no laboratório. Esse trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA) sob a licença N° L0033/08.

2.2 Métodos

2.2.1 Lavagem e descontaminação da vidraria

As vidrarias utilizadas, tanto no preparo dos reagentes quanto na realização dos ensaios, foram lavadas e imersas em solução de detergente por 24 horas. Em

seguida, foram cuidadosamente enxaguadas com água corrente e com água ultrapura para a retirada de todo o detergente. A vidraria utilizada nos ensaios da atividade da enzima ALAD foi posteriormente descontaminada em uma solução de ácido nítrico 10% por 48 horas, para retirada de qualquer traço de chumbo, e novamente enxaguadas com água ultrapura.

2.2.2 Anestesia, biometria e exposição

Os animais foram anestesiados com eugenol em água potável na concentração final de $30\mu\text{L/L}^{77}$, a partir de uma solução de eugenol a 50% (v/v) em etanol hidratado. Os peixes foram considerados anestesiados quando sua posição na água se tornou aleatória, com prevalência da posição dorsal e sem resposta corporal a estímulos externos. Em seguida os animais foram pesados, medidos (comprimento furcal^a, conforme ilustração a seguir^b) e expostos por uma única injeção intraperitoneal de concentrações diferentes de uma solução de acetato de chumbo em glicose 0,24M isotônica. A solução isotônica de glicose foi utilizada como alternativa ao soro fisiológico para evitar a precipitação do cloreto de chumbo. No grupo controle foi realizado a injeção intraperitoneal de glicose 0,24M.



2.2.3 Coleta do sangue

Para a coleta de sangue os peixes foram previamente anestesiados com eugenol, conforme descrito anteriormente. A coleta de sangue foi realizada com seringas lavadas com heparina sódica de uso farmacêutico. Para reduzir as lesões provocadas pela coleta, foi utilizada uma agulha calibre de 0,3mm, normalmente utilizada para a aplicação de insulina. Antes de todas as coletas de sangue os

^a Foi adotado como comprimento, todas as vezes que for mencionado, a definição descrita na Instrução normativa do IBAMA n° 53, de 22 de novembro de 2005 para o comprimento furcal.

^b Foto de exemplar utilizado no presente estudo

peixes foram pesados. No último dia do experimento, ou quando os animais demonstraram sinais de perda de atividade e controle da flutuação, foram sacrificados através da secção da medula.

2.2.4 Parâmetros sanguíneos

ALAD

A atividade da enzima ALAD foi determinada usando um protocolo estabelecido pelo CESTEH, tendo por base as metodologias descritas por Sakai⁷⁸ e Wigfield & Farant⁷⁹. Nesse método, a atividade da enzima ALAD é medida através da quantificação do composto colorido produzido pela reação entre o reativo de Erlich e o porfobilinogênio formado pela ALAD a partir do substrato ALA. Este protocolo envolve: (1) lise celular por Triton 0,1%; (2) incubação por uma hora a 37°C na presença do substrato (ALA 16mM); (3) paralisação da reação por adição de uma solução de TCA 0,37M contendo cloreto mercurioso (Hg₂Cl₂) 59mM; (4) centrifugação, coleta do sobrenadante, adição do reativo de Erlich e leitura da absorvância a 555nm após 45 minutos. A atividade enzimática foi expressa em Unidades (U) sendo 1U a quantidade de enzima que gera como produto 1micromol de porfobilinogênio por hora por litro de sangue. Todas as determinações dessa enzima foram conduzidas a 37°C, consideradas a correção para a diluição e a absortividade molar (ϵ) de 0,062nmoles.cm⁻¹.L⁻¹ a 555nm para o produto corado formado⁷⁹.

Catalase

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada conforme descrito por Aebi⁸⁰. O método tem por base a quantificação espectrofotométrica a 240nm da cinética de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para tanto, 5µL de sangue foram transferidos para um frasco contendo 10mL de água destilada. Em seguida, 2mL deste hemolisado foram transferidos para tubos de ensaio adicionando-se 1mL de uma solução de H₂O₂ em tampão fostato 50mM pH 7,0 preparada no momento do uso, tendo como referência uma alíquota de 2mL do mesmo hemolisado mais 1mL do mesmo tampão sem o peróxido. A atividade enzimática foi expressa em Unidades (U) de CAT sendo 1U a quantidade de enzima por mL de sangue que é capaz de decompor 1µmol/min do peróxido. Essa enzima foi determinada na temperatura ambiente do laboratório^c.

^c O laboratório possui ar-condicionado central mantido entre um mínimo de 22 e um máximo de 26°C

Hematócrito

Foi utilizado capilar heparinizado com comprimento de 75mm e diâmetro interno de 1,0mm (Perfecta). Os capilares contendo sangue foram centrifugados por 10 minutos (Quimis modelo Q-22M) e as leituras foram feitas imediatamente depois da centrifugação por comparação visual.

Hemoglobina

A quantificação da hemoglobina foi realizada através do método da cianometahemoglobina, em que os compostos de hemoglobina, com exceção da sulfahemoglobina, são rapidamente convertidos a cianometahemoglobina sob ação do cianeto de potássio e do ferricianeto de potássio. Cinco microlitros de sangue foram colocados em 1mL de solução de Drabkin modificada^d. Depois de 10 minutos foram feitas as leituras no espectrofotômetro a 540nm tendo como padrão uma solução comercial contendo 11,3mg/dL de hemoglobina (Bioclin).

Glicose

A glicose foi quantificada através de um kit comercial (Bioclin) enzimático com leitura de ponto final. A amostra utilizada foi de 10 μ L de plasma, obtido por centrifugação do sangue heparinizado (10.000g/5min), para 1mL do reagente do kit. Depois de 20 minutos foram feitas as leituras espectrofotométricas a 505nm e a quantidade de glicose foi determinada tendo por base o padrão de 100mg/dL fornecido junto com o kit.

Alanina-amino-transferase (ALT ou TGP) e Aspartato-amino-transferase (AST ou TGO)

As atividades de ALT e AST foram determinadas utilizando um kit comercial (Bioclin) tendo por base o método cinético de medida espectrofotométrica do consumo de NADH. Esse kit foi testado com um homogeneizado de fígado preparado da seguinte forma: uma proporção de 1g de fígado de um animal não-exposto para 10mL de tampão fosfato 50mM pH 7.5 foi homogeneizada (Ultraturrax a 20.000rpm por 1 minuto) e centrifugada a 10.000g por 5 minutos. Alíquotas de 2 μ L do sobrenadante desse homogeneizado foram diluídas com 8 μ L de água destilada e 120 μ L do reagente do kit. A leitura foi realizada durante 100 segundos em um espectrofotômetro a 340nm. Esse teste teve

^d Solução de Drabkin (modificada): 200mg de ferricianeto de potássio, 38g de cianeto de sódio, 140g de fosfato diácido de potássio, 0,5mL Triton X-100 para 1.000mL de água destilada.

o seguinte resultado, em absorvância/minuto: ALT = -0,283 e AST = -0,209, indicando que a medida no plasma seria indicativa de lesão hepática. Para a determinação no plasma, uma alíquota de 10µL de plasma, obtido por centrifugação do sangue heparinizado (10.000g/5min), foi adicionada a 100µL do reagente do kit. Essas enzimas foram determinadas na temperatura ambiente.

Teste do Micronúcleo

Antes da realização da distensão sanguínea as lâminas foram limpas por imersão em etanol e secagem com gaze. Após a coleta do sangue periférico da veia caudal, uma gota de sangue fresco foi colocada em uma lâmina e distendida com uma lâmina própria. Essa distensão foi deixada durante toda a noite na temperatura ambiente para secar. Depois de seca a distensão foi fixada pela imersão em etanol absoluto por 1 hora. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente, coradas com solução comercial de Giemsa a 10% por 20 minutos, novamente lavadas em água corrente e secas durante toda a noite na temperatura ambiente. Foi realizado duas distensões por animal. A contagem das células normais, micronúcleos e de outras alterações morfológicas foi realizada por microscopia óptica com objetiva de imersão, totalizando 2.000 células por animal.

2.3 Protocolos experimentais e padronizações

2.3.1 Exposição

Não foram encontrados trabalhos com o DL50 da exposição intraperitoneal ao chumbo para tilápias. Assim sendo, foi usada como dose máxima 100mg de acetato de chumbo por quilograma de peixe. Esse valor foi escolhido tendo por base a DL50 para ratos do chumbo tetrametílico, que é da ordem de 105mg/kg de animal^{12,81}.

2.3.2 Coleta do sangue

A concentração de heparina para evitar qualquer coagulação do sangue foi testada experimentalmente assim como a via de acesso para a coleta do sangue e o número de coletas para cada animal de 450 gramas. Foi utilizada uma solução comercial de heparina para uso humano (5000UI/mL). Foram testadas como vias de acesso, a artéria dorsal acessada pelo flanco do animal na altura da coluna vertebral abaixo da linha lateral, e a veia caudal, logo após o orifício anal, que se mostrou muito mais adequada.

2.3.3 Determinação de ALAD em sangue total.

Foram comparados os resultados obtidos com 100 μ L (macrométodo) e 10 μ L (micrométodo) de sangue total, mantidas as mesmas proporções para os demais reagentes. Este estudo foi realizado com o objetivo de reduzir o volume de sangue na determinação da ALAD. A determinação da ALAD com 100 μ L de sangue foi padronizada anteriormente no laboratório do CESTEH⁸². Wigfield & Farant⁷⁹ descrevem um método empregando 10 μ L de sangue. Essa redução foi testada para garantir a determinação da atividade dessa enzima em um mesmo peixe por diversos dias consecutivos.

Os testes foram realizados com peixes expostos à maior dose de acetato de chumbo (100mg/kg) depois de 24 horas de uma única injeção. A rotina dessa determinação foi a seguinte: duas alíquotas de sangue de cada amostra (100 e 10 μ L) foram transferidas para tubos e identificadas como Branco e Amostra. Em cada tubo foi adicionada uma solução de Triton X-100 a 0.1% (250 e 25 μ L), para lise celular, seguindo-se a adição de água desionizada (150 e 15 μ L) e agitação (Vortex) por um minuto. A mistura foi colocada em banho de gelo por cinco minutos adicionando-se água destilada (500 e 50 μ L) para completar a hemólise. Todos os tubos foram agitados (Vortex) por 30 segundos antes da adição de tampão fosfato de potássio 0,3M, pH 6,4 (500 e 50 μ L). Logo em seguida, acrescentou-se a solução de ácido tricloroacético 60g/L contendo 60mmol/L de cloreto de mercúrio (TCA) no tubo branco (1000 e 100 μ L). Posteriormente, adicionou-se em todos os tubos a solução de ALA 16mM (500 e 50 μ L). Todos os tubos foram incubados a 37°C por uma hora. Ao final desse período de incubação, as reações dos tubos com as amostras foram paralisadas pela adição do TCA (1000 e 100 μ L). A mistura foi centrifugada a 2.500g durante cinco minutos e uma alíquota do sobrenadante (1000 e 100 μ L) foi retirada e misturada com o Reagente de Erlich (1000 e 100 μ L). Após 45 minutos foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 555nm.

2.3.4 Parâmetros morfológicos

O animais foram sacrificados por secção da medula e foi feita uma necropsia com atenção especial para as alterações de morfologia nas brânquias, no fígado e no baço.

3 RESULTADOS

3.1 Padronizações

Nesse trabalho, cerca de oitenta peixes foram adquiridos na Cooperativa Peixesul e 73 foram usados nos diversos experimentos. Esses peixes tinham $453,50 \pm 99,95$ (média \pm 1 desvio padrão) gramas de peso e $23,05 \pm 2,32$ centímetros de comprimento (média \pm 1 desvio padrão). A relação massa-comprimento dos animais utilizados apresentou um coeficiente de correlação de 0,897, que foi considerado satisfatório para amostras de tilápia vindas de fazendas de produção comercial prontas para o abate^{83,84}. A relação massa/comprimento foi usada como critério de homogeneidade de cada um dos grupos de animais que foram usados em cada experimento⁸⁴.

A coleta de sangue foi feita na veia caudal com seringa de insulina contendo heparina, de modo a permitir que um mesmo animal pudesse ser sangrado várias vezes. O uso da agulha com calibre 0,3mm gerou poucas lesões provocadas pela coleta e o uso da veia caudal diminuiu os efeitos que uma possível lesão pudesse causar na circulação sanguínea do peixe. O volume de cada coleta foi de aproximadamente 200 μ L de sangue, utilizando-se 2 μ L de uma solução comercial de heparina (500UI/mL) como anticoagulante. Nessas condições foi possível realizar até sete coletas de um mesmo em um período de 9 dias.

As alterações morfológicas dos núcleos das hemáceas foram classificadas de acordo com Carrasco e colaboradores⁸⁵ e Shimizu e colaboradores⁶⁹. As alterações diferentes de micronúcleo (MN) foram englobadas em uma única categoria (Total de Outras Alterações - TOA). Alguns exemplos dessas alterações e de MN estão mostrados na Figura 1.

A padronização do teste de micronúcleos foi realizada expondo animais às doses de 1, 10 e 100mg de acetato de chumbo por quilograma de peixe (1, 10 e 100mg/kg) e os resultados estão descritos na Tabela 1.

Com base nos resultados obtidos nessa padronização, optou-se por utilizar a maior concentração de acetato de chumbo (100mg/kg) para os próximos experimentos, tendo em vista não ter sido possível encontrar uma variação importante nas frequências de aparecimento de deformidades nucleares. O momento para a coleta de sangue nesse experimento foi determinado levando em consideração o tempo de vida dos animais expostos e também o pico de

aparecimento de micronúcleos descrito na literatura^{6,53}. Esses resultados estão descritos na Tabela 2.

Para a padronização da determinação da atividade da enzima ALAD em sangue foram conduzidos experimentos com peixes expostos à dose de 100mg/kg por 24 horas. A coleta de sangue também foi realizada antes da exposição (controle sem injeção de glicose). Os testes estatísticos utilizados para a análise da atividade da ALAD usando 100 μ L (macrométodo) e 10 μ L de sangue (micrométodo) não revelaram diferenças significativas entre os métodos. Esses resultados estão descritos na Tabela 3.

3.2 Cinética de parâmetros sanguíneos na exposição ao chumbo

De posse de métodos de coleta e de determinação de alguns parâmetros do sangue, experimentos foram montados para avaliar as alterações depois da exposição ao chumbo tirando amostras consecutivas de um mesmo animal. Os parâmetros analisados foram: hematócrito, hemoglobina, glicose e as atividades das enzimas ALAD, catalase e transaminases. Esfregaços de sangue também foram feitos para avaliação das deformidades nucleares. Em todos os momentos de coleta os animais foram anestesiados e pesados.

Os resultados estão descritos na ordem em que foram realizados, primeiro com a dose de 100mg/kg (Figuras 2, 3 e 4), depois com a dose de 1mg/kg (Figuras 5, 6 e 7) e, por último, a repetição do experimento com a dose de 100mg/kg (Figuras 8 e 9). Os gráficos representam o resultado de cada animal ao longo do tempo indicado. As Figuras 4 e 7 representam fotos das necropsias que foram realizadas em todos os animais, no fim do experimento ou no momento da morte do animal. Em algumas situações a morte do peixe ocorreu durante a noite e a necropsia não foi realizada, mas em algumas situações as indicações de perda de alinhamento e de flutuação permitiram a decisão do sacrifício do animal, garantindo boas condições para uma avaliação morfológica entre os animais expostos e os controles.

Tabela 1 - Avaliação da frequência (%) de aparecimento de lesões nucleares em eritrócitos de tilápias expostas ao acetato de chumbo

Cada N representa a avaliação de 2.000 células em 2 lâminas preparada com o sangue de um animal. Os animais foram sangrados 72 horas depois da exposição.

ANOVA = Análise de variância seg. Dunnet (Graphpad 5.0, Prism, $p = 0,05$); * = média do resultado dos peixes controles inferior à media dos peixes expostos; SIM = com diferença significativa; NÃO = sem diferença significativa.

MICRONÚCLEOS

	Controle	1mg/kg	10mg/kg	100mg/kg
N	14	10	3	7
Mínimo	0.05	0	0.1	0.25
Máximo	0.95	0.1	0.2	1.05
Média	0.33	0.02	0.13	0.61
Desvio Padrão	0.29	0.03	0.06	0.31
ANOVA		*	*	Sim

TOTAL DE OUTRAS ALTERAÇÕES

	Controle	1mg/kg	10mg/kg	100mg/kg
N	14	10	3	7
Mínimo	5.65	2.85	9.2	7.8
Máximo	16.75	10	12.2	12.20
Média	9.90	4.65	11.02	10.52
Desvio Padrão	3.51	2.03	1.60	1.57
ANOVA		*	Não	Não

Tabela 2 - Avaliação da frequência (%) de aparecimento de alterações nucleares em hemácias de tilápias expostas por diferentes tempos a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo

Cada N representa a avaliação de 2.000 células em 2 lâminas preparadas com o sangue de um animal. Os resultados dos animais que não foram injetados foram agrupados como um único resultado

A Análise de Variância segundo Dunnet (Graphpad 5.0, Prism, $p = 0,05$) não revelou diferenças significativas em nenhum dos tempos apresentados entre os 3 grupos.

Condições	Dias após exposição	Micronúcleo			Outras Alterações		
		N	MD	DP	N	MD	DP
Não-exposto		16	0.16	0.14	16	4.71	2.91
Glicose							
	1	5	0.23	0.24	5	7.48	5.51
	2	5	0.37	0.45	5	7.13	6.19
	3	6	0.23	0.23	6	5.64	4.92
	4	4	0.20	0.23	4	4.55	3.90
	7	4	0.18	0.22	4	4.66	4.62
Glicose + Pb							
	1	9	0.40	0.32	9	7.77	3.49
	2	5	0.43	0.37	5	6.88	4.28
	3	9	0.17	0.21	9	5.37	3.37
	4	2	0.08	0.11	2	2.70	1.13
	7	1	0.00		1	14.85	

Tabela 3 - Padronização do método para a determinação de ALAD em sangue de tílapias expostas ao acetato de chumbo.

Nesse experimento foram utilizados 11 animais, conforme descrito na tabela (N). Todos os animais foram sangrados depois de 24 horas de exposição e a determinação de ALAD foi feita conforme indicado a seguir: Macrométodo = Metodologia padrão utilizando 100µL de amostra de sangue e Micrométodo = Metodologia padrão utilizando 10µL de sangue com a redução proporcional de todos os reagentes.

A Análise de Variância segundo Dunnet (Graphpad 5.0, Prism, $p = 0,05$) só revelou diferenças significativas entre controle e exposto, não havendo diferença significativa entre as metodologias empregadas.

Grupo	N	Macrométodo			Micrométodo		
		Média	DP	CV%	Média	DP	CV%
Controle sem injeção de glicose	3 peixes e 5 replicatas	2735	539	20	3164	550	17
Controle com injeção de glicose	3 peixes e 2 replicatas	2619	670	26	2711	620	23
Exposto	5 peixes e 2 replicatas	751	172	23	826	182	22

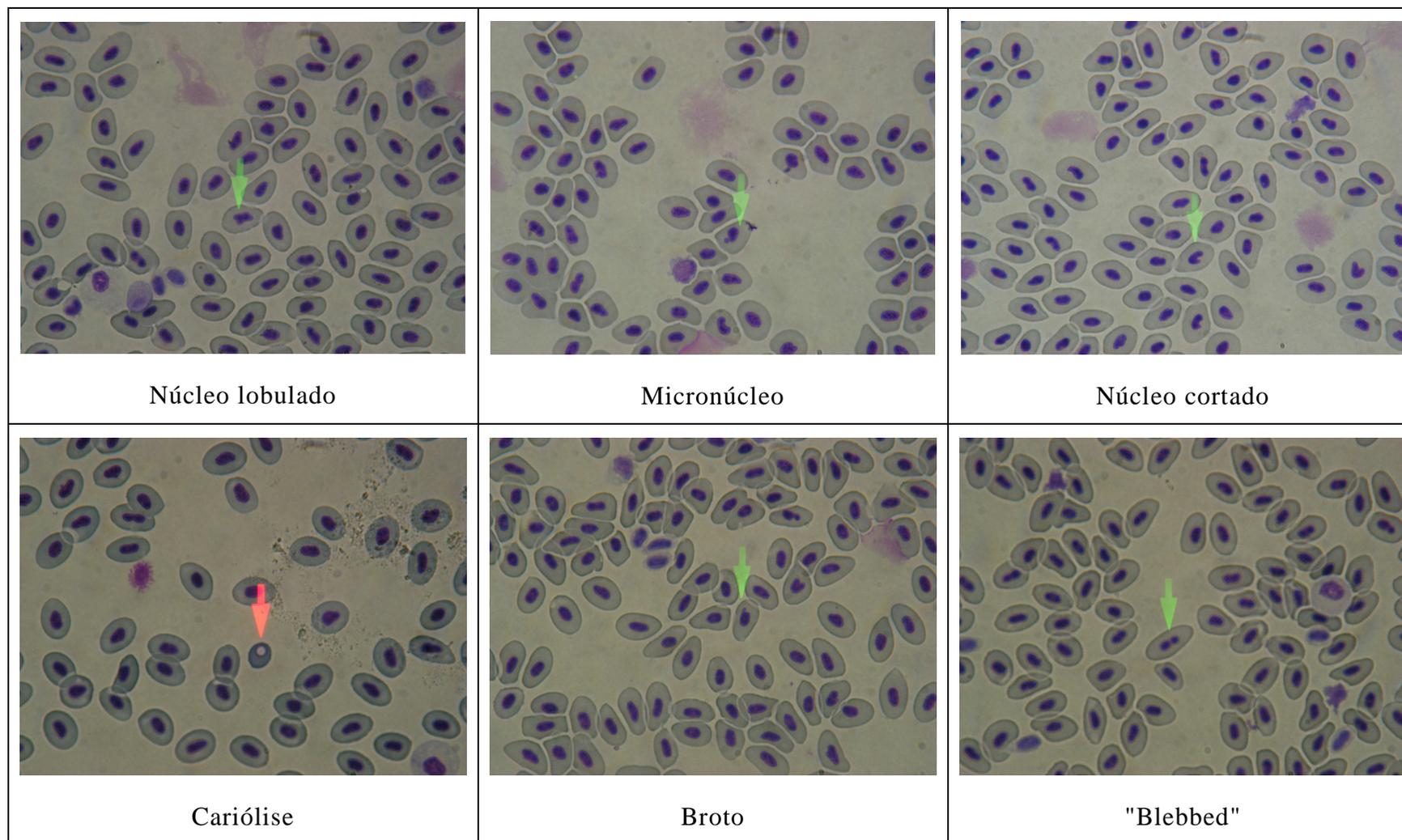


Figura 1 - Exemplos de alterações nucleares que foram avaliadas nesse trabalho

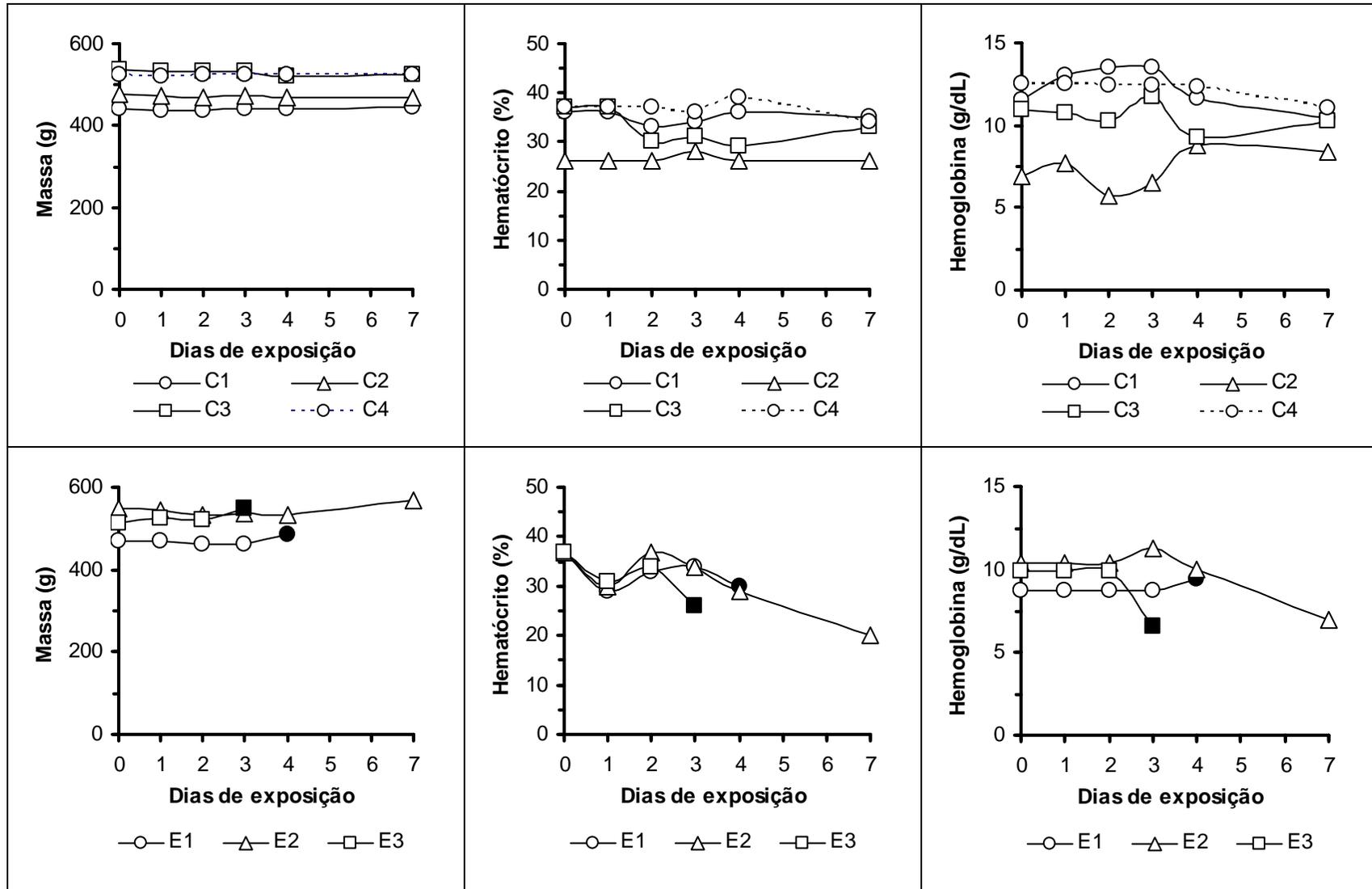


Figura 2 - Massa e parâmetros sanguíneos de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo (Parte A)

C = Controle; E = Exposto; Cada símbolo representa o resultado do parâmetro em um animal. Os símbolos cheios representam o último resultado de um peixe que veio a morrer entre esse momento e a próxima coleta.

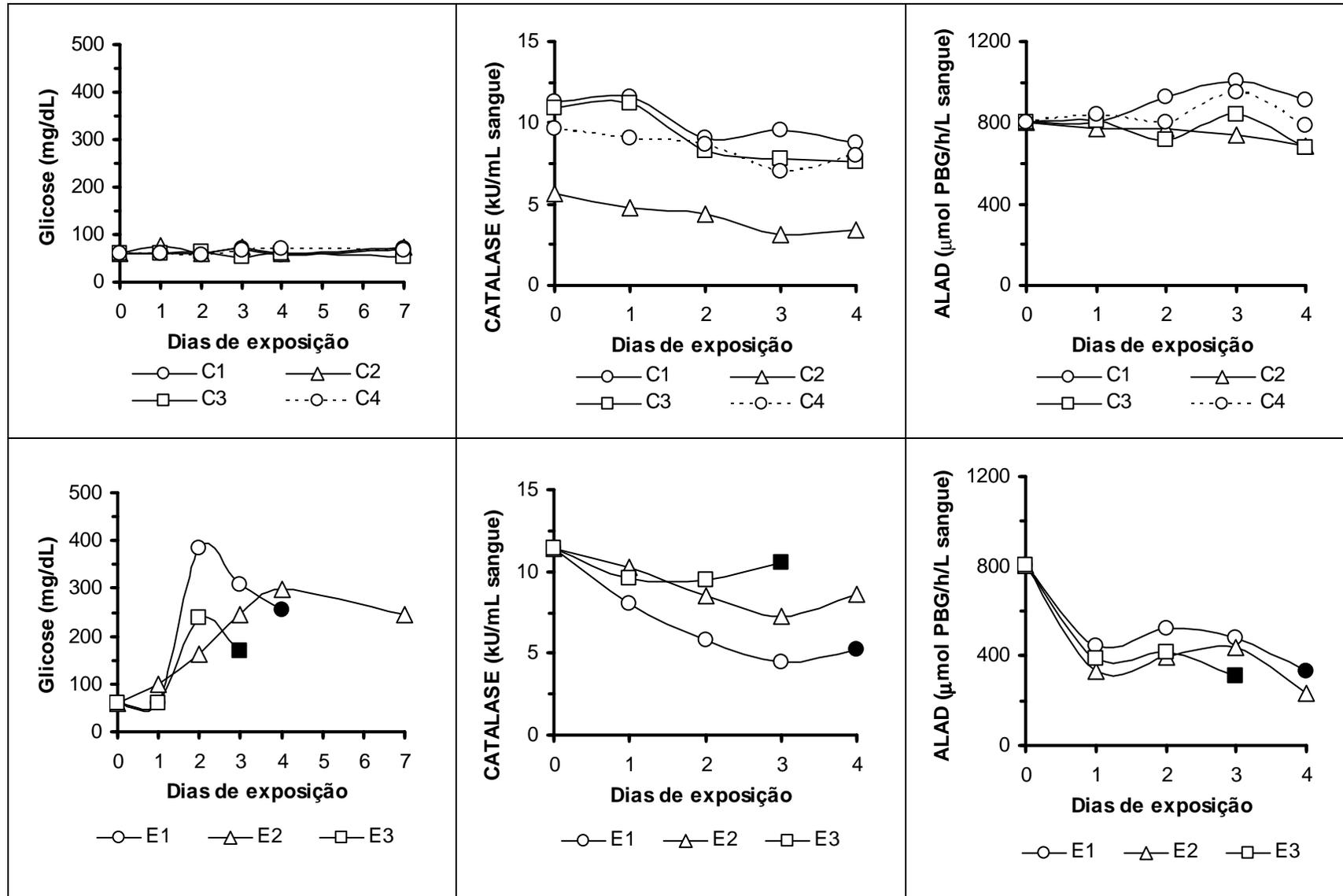


Figura 3 - Parâmetros sanguíneos de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo (Parte B)

C = Controle; E = Exposto; Cada símbolo representa o resultado do parâmetro em um animal. Os símbolos cheios representam o último resultado de um peixe que veio a morrer entre esse momento e a próxima coleta.

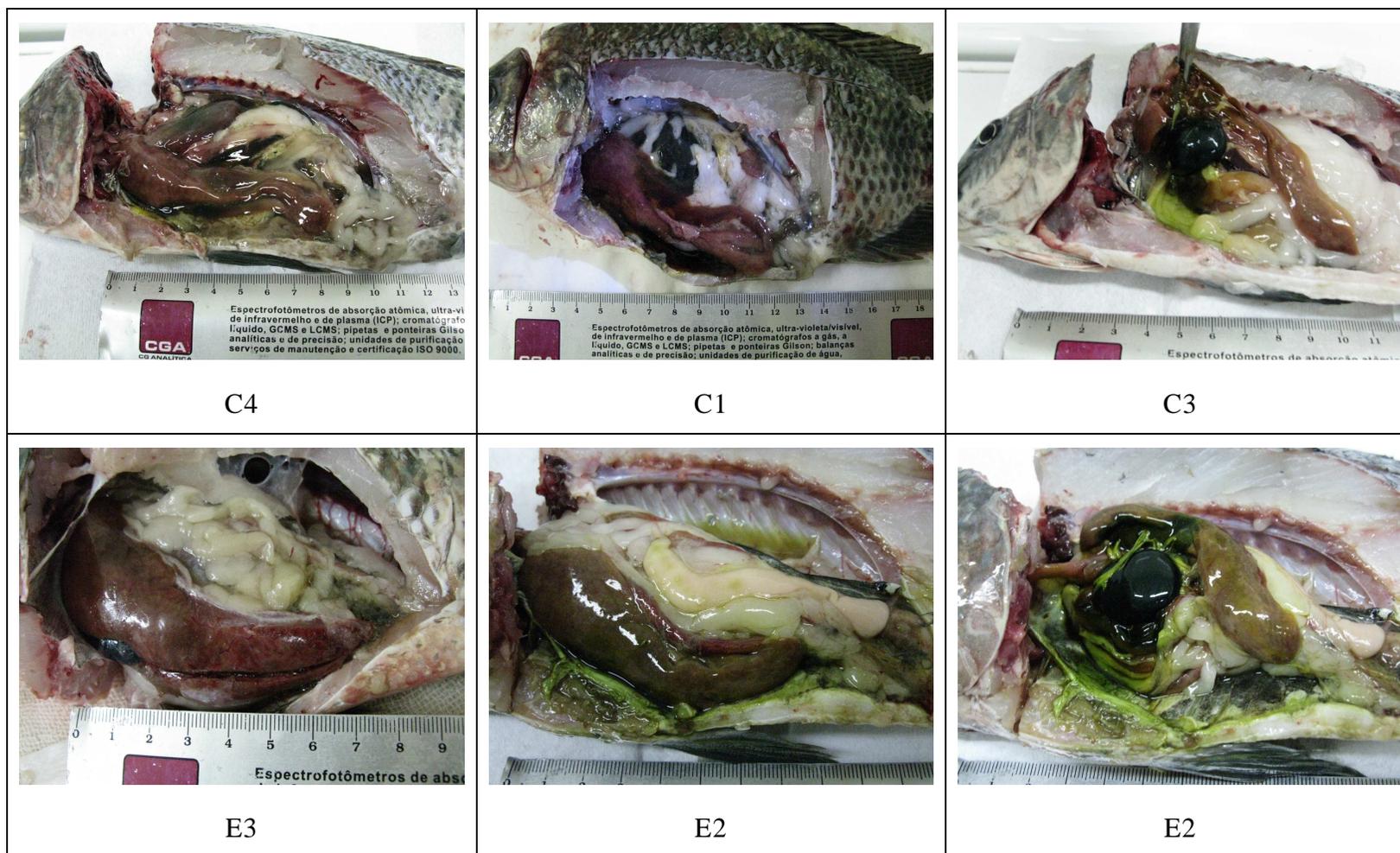


Figura 4 - Morfologia de tilápias expostas a 100mg/kg de acetato de chumbo

C = Controle; E = Exposto

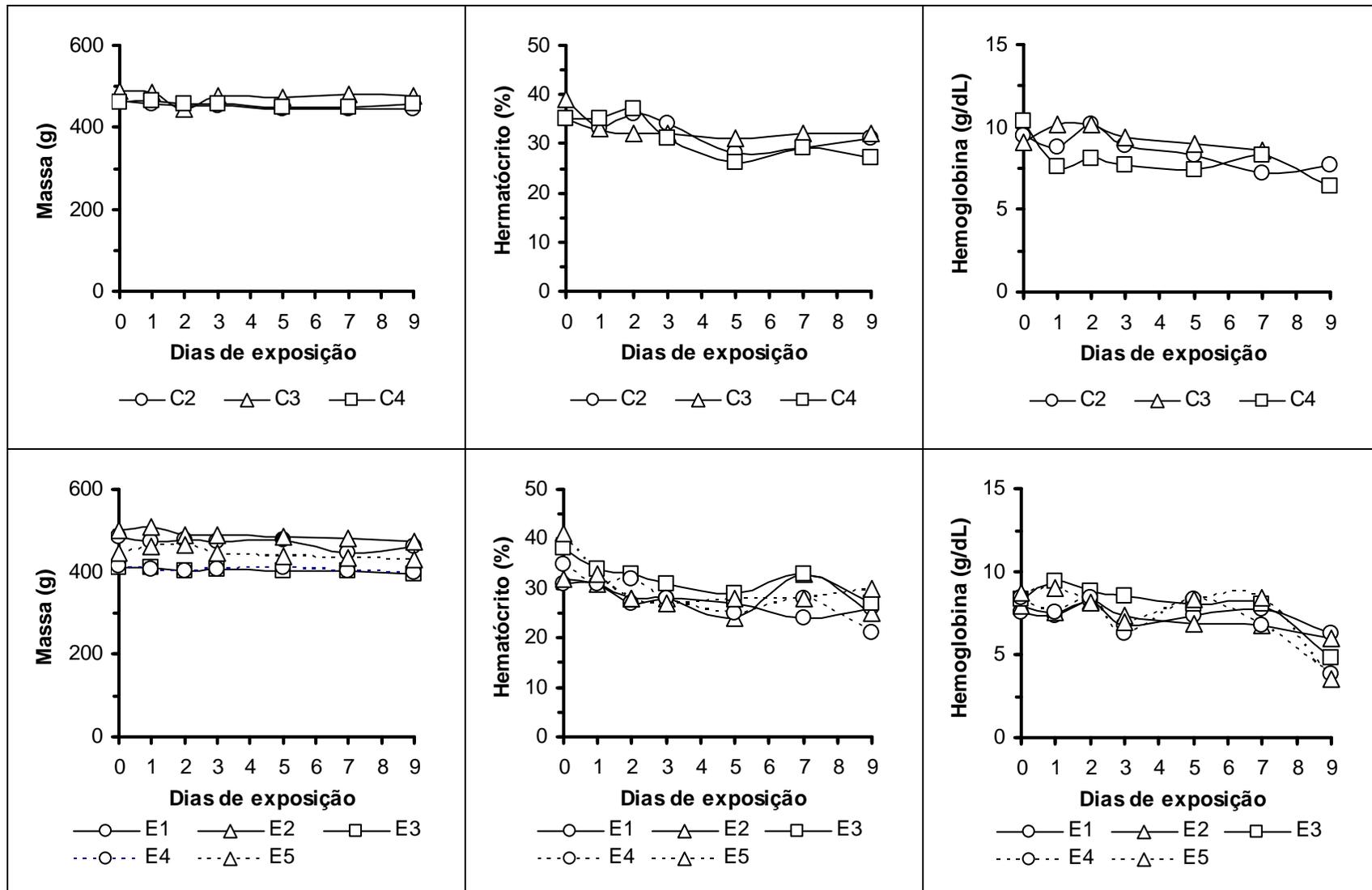


Figura 5 – Massa e parâmetros sanguíneos de tilápias expostas a uma dose de 1mg/kg de acetato de chumbo (Parte A)
 C = Controle; E = Exposto; C = Controle; E = Exposto; Cada símbolo representa o resultado do parâmetro em um animal.

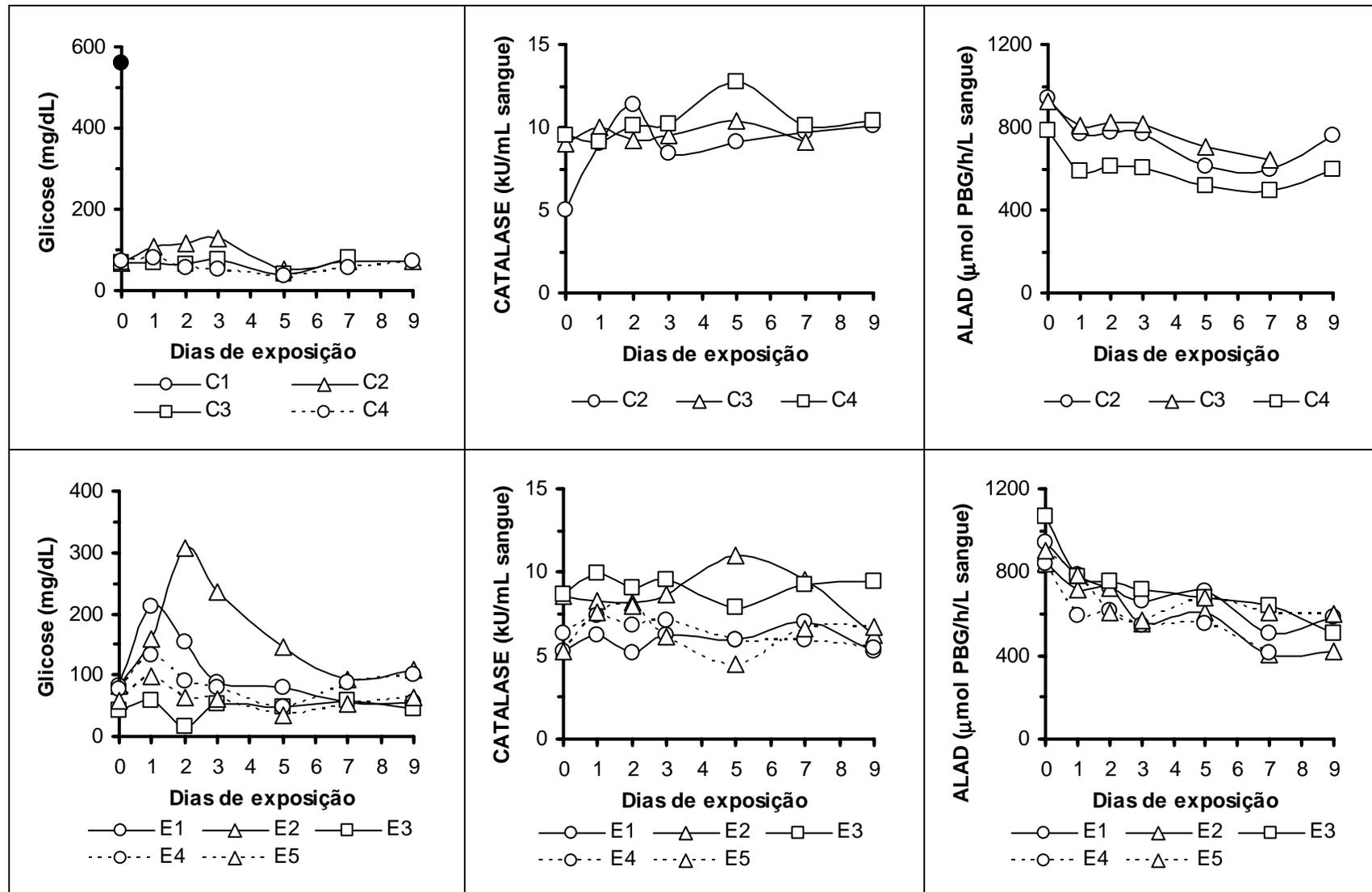


Figura 6 - Parâmetros sanguíneos de tilápias expostas a uma dose de 1mg/kg de acetato de chumbo (Parte B)

C = Controle; E = Exposto; Cada símbolo representa o resultado do parâmetro em um animal. Os símbolos cheios representam o último resultado de um peixe que veio a morrer entre esse momento e a próxima coleta.

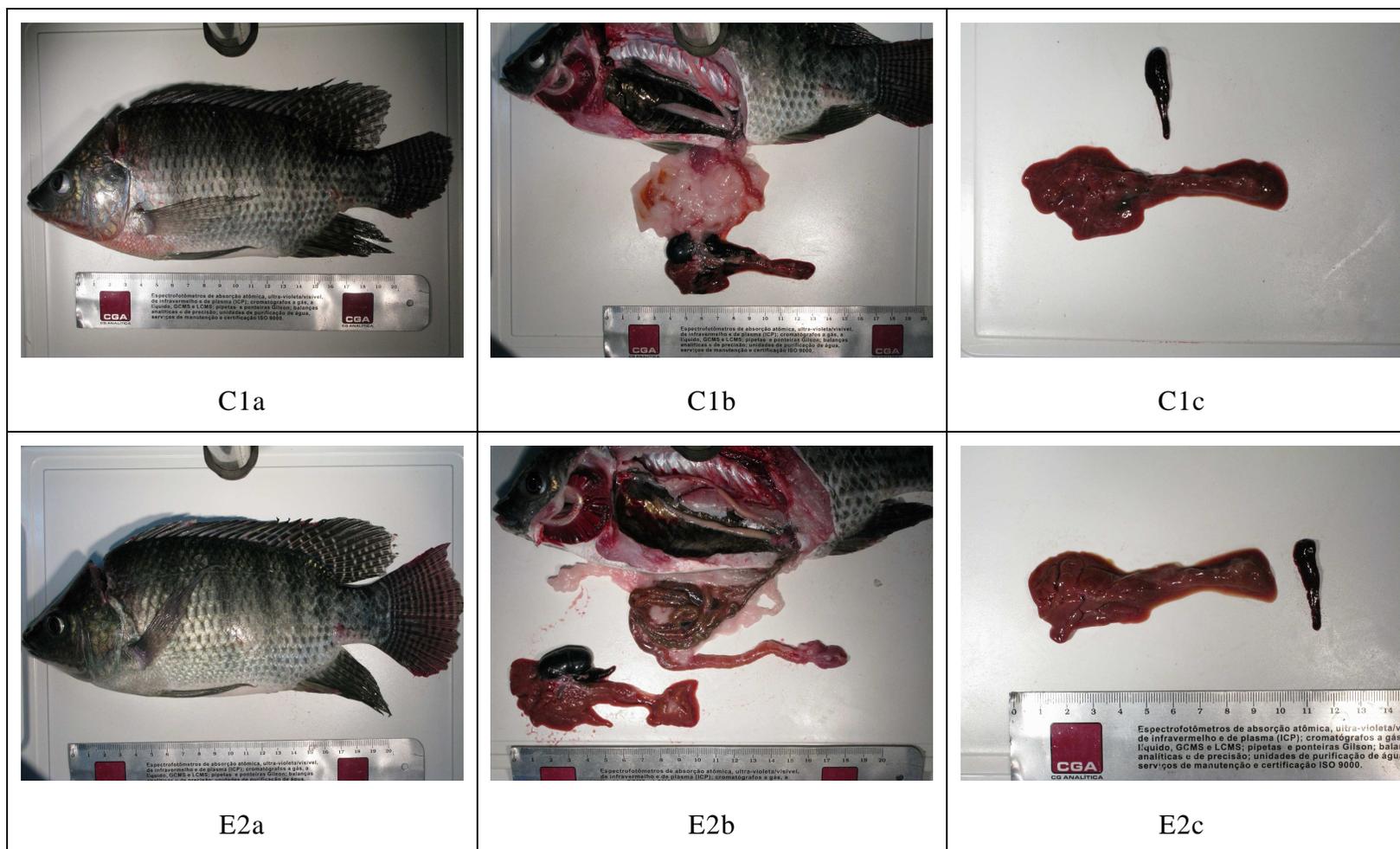


Figura 7 - Morfologia de tilápias expostas a 1mg/kg de acetato de chumbo

C = Controle; E = Exposto

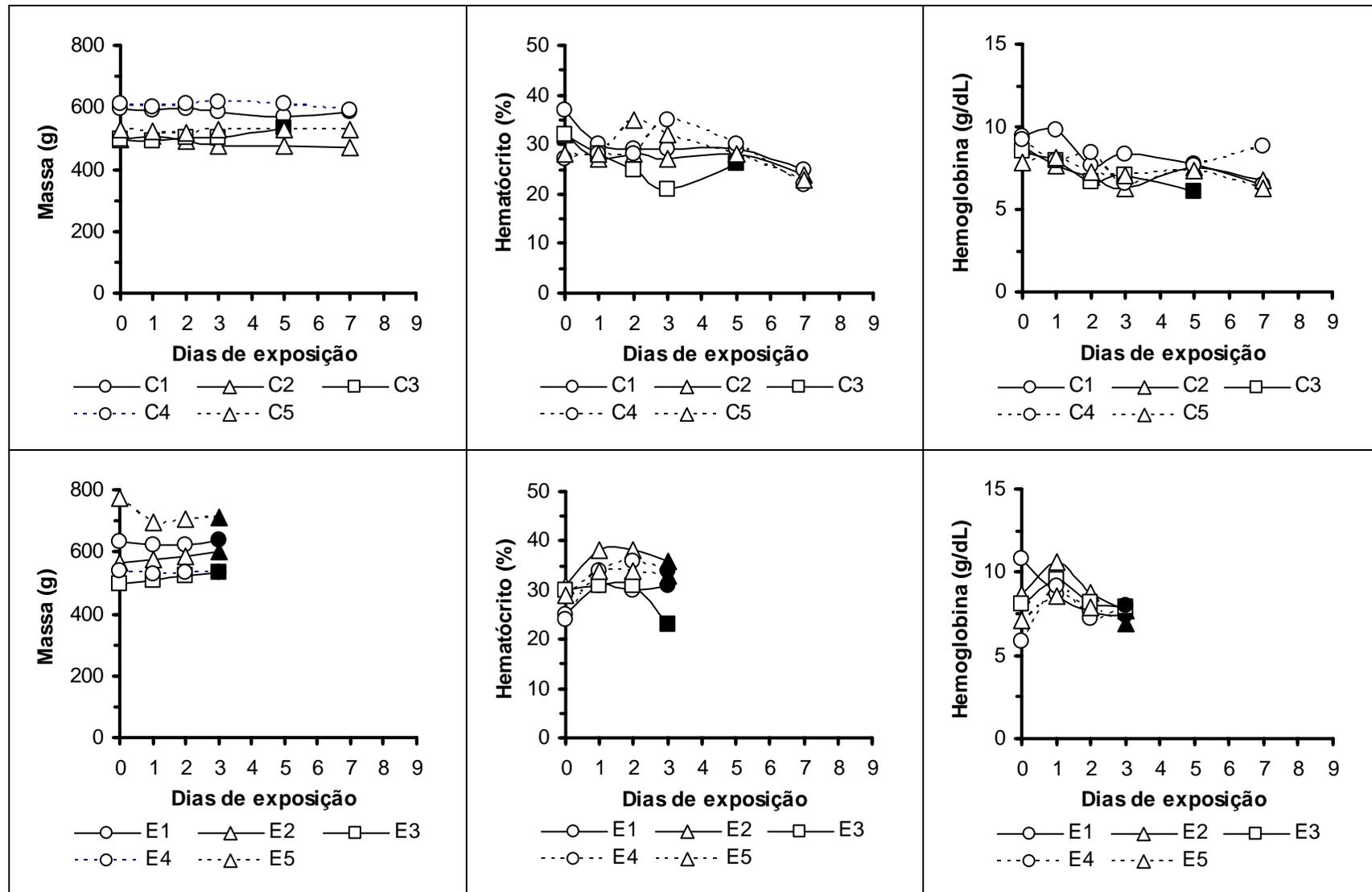


Figura 8 – Massa e parâmetros sanguíneos de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo (Parte A)

C = Controle; E = Exposto; Cada símbolo representa o resultado do parâmetro em um animal. Os símbolos cheios representam o último resultado de um peixe que veio a morrer entre esse momento e a próxima coleta.

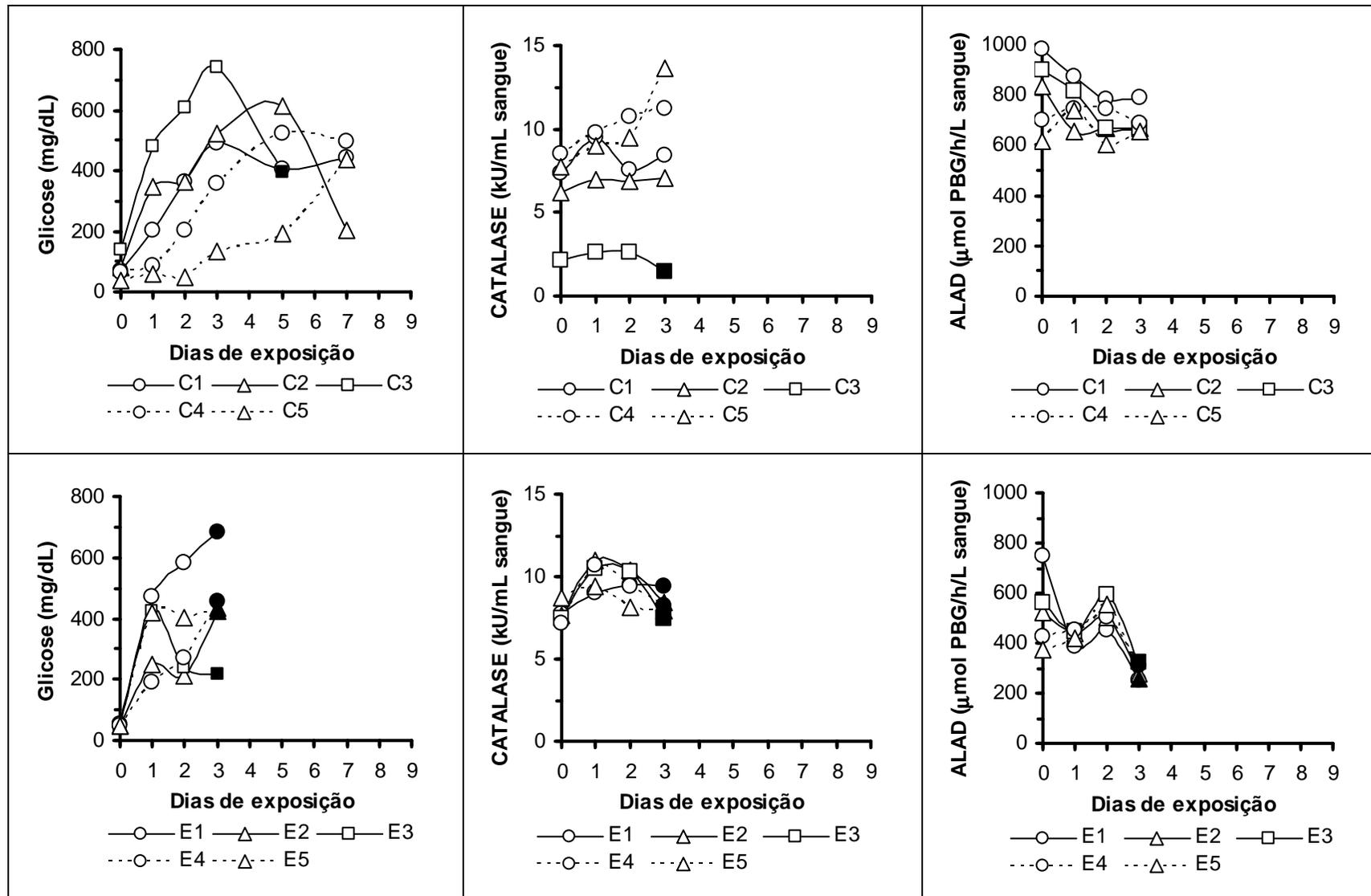


Figura 9 - Parâmetros sanguíneos de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo (Parte B)

C = Controle; E = Exposto; Cada símbolo representa o resultado do parâmetro em um animal. Os símbolos cheios representam o último resultado de um peixe que veio a morrer entre esse momento e a próxima coleta.

4 DISCUSSÃO

Acondicionamento e manejo dos peixes

O transporte dos animais em água saturada com oxigênio e o acondicionamento individual no laboratório em 50 litros de água potável aerada garantiram a sobrevivência de tilápias com 400 a 600g por até 48 horas. Apesar do sistema de acondicionamento dos peixes não possuir filtros para limpeza, a troca de água realizada a cada 48 horas foi suficiente para garantir a qualidade da água, pois os peixes já vinham do abatedouro com 24 horas de jejum e não eram alimentados até o final dos experimentos. A qualidade da água foi acompanhada através dos níveis de cloro total, antes da colocação dos peixes, e de amônia livre e pH, a cada troca de água. O tamanho dos peixes também foi considerado aceitável para o tipo de acondicionamento adotado e para as sucessivas coletas de sangue que foram programadas. Como o padrão para abate de tilápias começa em 400 gramas, animais desse peso podem ser encontrados em diversos estabelecimentos comerciais por todo o país.

A exposição de peixes a agentes tóxicos usualmente é feita pela água ou pela alimentação^{3,86,87}. Mas, tendo em vista as dificuldades para descarte dos resíduos de chumbo na água depois de uma exposição, optou-se pela injeção intraperitoneal como forma de exposição. Além disso, o chumbo poderia aderir na superfície da dorna.

O anticoagulante utilizado foi a heparina sódica. O EDTA não pode ser utilizado, pois por ser um agente quelante poderia retirar o chumbo das proteínas comprometendo a avaliação da inibição da atividade da ALAD pelo chumbo. Além disso, o EDTA pode levar à deterioração das células vermelhas do sangue e à quelação do zinco, metal necessário para a atividade da ALAD^{88,89}. Santos⁸² testou diferentes concentrações de heparina e verificou que esse anticoagulante altera muito pouco a atividade de ALAD de sangue de voluntários humanos. Na determinação de ALAD envolvendo um volume de sangue de 10µL foi necessário utilizar 2µL de heparina 5000UI/mL, pois o uso de heparina diluída não conseguia prevenir a coagulação. Além disso, as seringas e agulhas precisam ser molhadas com solução de heparina em salina com no mínimo 500UI/mL. A punção da veia caudal, como esperado, foi a melhor opção para coleta do sangue, especialmente para coletas sucessivas no mesmo animal.

A determinação dos parâmetros sanguíneos antes da exposição foi de grande importância para uma melhor avaliação do estado de saúde dos animais, tornando cada peixe controle dele mesmo, antes da avaliação dos efeitos do chumbo nos mesmos parâmetros.

Alterações nucleares

O Teste de Micronúcleo não consiste apenas na observação da frequência de aparecimento de MN, mas na avaliação da variação dessa frequência, normalmente obtida pela comparação de animais controles com animais expostos⁵³. No presente trabalho, essa comparação não demonstrou nenhuma diferença significativa para nenhuma das doses testadas, apesar das análises terem sido feitas nos dias citados como pico de formação de MN. Mas, como os nossos experimentos foram conduzidos com uma exposição por dose única pode ter ocorrido o reparo do material nuclear^{6,53,63}. O Coeficiente de Variação para a frequência de aparecimento de MN nos animais sem qualquer exposição foi de 88% para MN e 61% para TOA (N=16), o que demonstrou que esse teste possui uma grande variação entre os peixes mesmo antes de qualquer exposição (Tabela 2).

O motivo de não ter ocorrido nenhuma diferença significativa entre controles e expostos pode ser explicado pelo fato da aplicação desse biomarcador ser mais indicada para exposições crônicas, já que os eritrócitos com micronúcleos encontrados na circulação periférica refletem eventos que ocorreram durante a vida útil dos eritrócitos⁵³. Em peixes teleósteos, grupo que abrange a tilápia, a eritropoiese ocorre principalmente no rim cefálico e secundariamente no baço, que é mais ativo na fase embrionária ou na submissão à hipóxia. Outros tecidos também apresentam essa habilidade, principalmente na fase embrionária, tais como: endotélio cardíaco e vascular; timo; fígado e intestino⁹⁰. O tempo médio de vida das hemácias nos peixes depende muito da espécie e de fatores ambientais (jejum prolongado, hipóxia, temperatura). Acredita-se que, de uma forma geral, esse tempo seja de 300 dias⁹⁰. Sánchez-Galán e colaboradores⁹¹ demonstraram que alguns metais pesados (cádmio e mercúrio), com uma única exposição no laboratório aumentam, a frequência de micronúcleos na enguia *Anguilla anguilla* L., porém o teste de micronúcleo foi realizado no rim cefálico, principal órgão da

hematopoiese em peixes. Por outro lado, nesse mesmo estudo, a frequência de aparecimento de MN nesses mesmos animais expostos *in situ* não se mostrou um método sensível para o monitoramento da poluição por metais pesados.

Outra possibilidade que explica esse resultado é a ocorrência de uma pausa na produção de eritrócitos e, conseqüentemente, na formação de MN, especialmente no caso da concentração mais alta de chumbo testada nesse estudo, pois, segundo Udroi⁵³, alguns agentes citogenéticos interrompem a eritropoiese em certas concentrações. Por outro lado, em amostras de animais de laboratório é muito comum ocorrer estimulação da produção, resultando em um grande aumento de eritrócitos imaturos na circulação periférica fazendo com que a frequência de MN previamente formados diminua⁵³.

Segundo Pereira e colaboradores⁹², quando substâncias que dão resultados positivos para MN são testadas em doses muito próximas da dose letal, o Teste de Micronúcleo costuma não ser suficientemente sensível. Essa pode ter sido a situação nesse trabalho com a dose mais alta de acetato de chumbo, 100mg/kg, que foi extrapolada da DL50 de ratos. Çavas⁹³ realizou o Teste de Micronúcleo em eritrócitos de sangue periférico, brânquias e células epiteliais da barbatana de *Carassius auratus auratus* expostos ao acetato de chumbo e ao acetato de mercúrio, utilizando a coloração laranja de acridina. Essa metodologia é usada para diferenciar eritrócitos policromáticos, que são imaturos, dos normocromáticos, que são maduros, usando microscopia de fluorescência, e encontraram resultados promissores. Os peixes foram expostos a três doses diferentes de acetato de chumbo na água: 10µg/L, 50µg/L e 100µg/L durante 2, 4 e 6 dias e a frequência de MN foi mais alta nos animais expostos. Além disso, o chumbo diminuiu a porcentagem de eritrócitos policromáticos nos peixes expostos à maior dose, sugerindo que o acetato de chumbo, além de interferir na proliferação dos eritrócitos, também inibe a liberação dessas células na circulação periférica. Em outro estudo, Koca e colaboradores⁹⁴ coletaram peixes (*Chondrostoma nasus* e *Barbus capito pectoralis*) de três locais diferentes onde detectaram chumbo na água e em alguns tecidos dos animais. A frequência de MN não foi significativamente diferente entre os três locais impactados e os controles. Outro estudo, realizado com tilápia do Nilo exposta a nitrato de chumbo por 7, 14

e 21 dias, também demonstrou a sensibilidade e a susceptibilidade da frequência de MN, e das outras alterações nucleares, como biomarcadores de chumbo na água⁹⁵. É preciso ressaltar que todos esses resultados positivos para MN foram realizados com exposições crônicas através da presença do chumbo na água. Esse estudo foi feito com uma única injeção.

Parâmetros sanguíneos

Eritropoiese

Um dos efeitos bem conhecidos do chumbo nos organismos é a inibição da eritropoiese. O presente trabalho indica esse mesmo efeito quando analisamos os resultados do hematócrito e da hemoglobina (Figuras 2, 5 e 8). Em todos os experimentos é possível identificar uma tendência de queda desses dois biomarcadores se compararmos os resultados de animais que foram expostos ao chumbo com os animais que só receberam a injeção de glicose. No entanto, analisando os resultados apresentados, é possível verificar que os valores do hematócrito estão dentro da faixa já descrita por outros autores para essa espécie^{96, 97,98}. Ates e colaboradores⁹⁹ encontraram uma diminuição nos valores de hematócrito e de hemoglobina em *Oncorhynchus mykiss* (trutas) expostas a nitrato de chumbo por 72 horas. Da mesma forma, Lohner e colaboradores¹⁰⁰ indicam que peixes expostos a metais apresentam redução nos valores de hematócrito e hemoglobina. No entanto, Gill & Pant¹⁰¹ demonstraram que em exposição aguda ao cromo o peixe *Barbus conchoniis* apresentou um aumento nos valores de hematócrito e hemoglobina em relação aos controles, mas em uma exposição crônica ocorreu ao contrário, houve inibição desses valores. No presente trabalho, o teor de hemoglobina nos peixes expostos não variou muito em relação aos controles, apesar da clara inibição da ALAD. Nesse momento é preciso ressaltar, como já mencionado anteriormente, que o tempo de vida de um eritrócito de peixe pode ser de 300 dias⁹⁰.

Glicose

Vários metais são capazes de estimular a atividade inter-renal, níveis de corticoesteróides no plasma e glicose em peixes. Assim, o estresse em peixes,

como em outros animais, resulta, tipicamente, em dois tipos de respostas endócrinas: a resposta via eixo hipotálamo - hipófise e células inter-renais, que culmina com o aumento do cortisol plasmático; e a resposta adrenérgica, que resulta em aumento de catecolaminas plasmáticas. A hipersecreção de catecolaminas e corticoesteróides são consideradas respostas primárias ao estresse, que dispara uma ampla variedade de alterações bioquímicas e fisiológicas, denominadas coletivamente de respostas secundárias ao estresse. Os efeitos metabólicos podem incluir: hiperglicemia, depleção das reservas teciduais de glicogênio, lipólise e inibição da síntese protéica. Esta resposta endócrina generalizada, que resulta em rápida mobilização de reservas energéticas, pode ser considerada um mecanismo adaptativo que permite ao organismo um aumento na demanda energética durante a exposição aguda a fatores estressantes. Ao contrário, peixes cronicamente expostos a contaminantes químicos podem apresentar uma redução da glicemia, provavelmente devido à combinação de alguns efeitos como depleção do glicogênio hepático, redução da alimentação e até perda de glicose na urina^{102,103}. Por exemplo, Winkaler e colaboradores³⁸ observaram que lambaris provenientes dos locais potencialmente mais contaminados apresentaram redução da glicemia. Martinez e colaboradores³⁹ relataram que peixes *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações de nitrato de chumbo em água (24 e 71mg/L por 96 horas) apresentaram resposta clássica ao estresse: hiperglicemia associada ao decréscimo dos lipídeos e proteínas plasmáticas. A magnitude da resposta ao estresse foi dose-dependente: a resposta apresentada na concentração mais baixa representa um processo adaptativo (mudanças em vários processos fisiológicos permitindo o retorno da homeostase), enquanto que a maior concentração caracteriza a exaustão (pode ocorrer se o nível de estresse for suficiente e caracterizado por depleção do glicogênio hepático, diminuição nos níveis de cortisol e outras mudanças que levam à debilidade do organismo).

Os resultados encontrados por Martinez e colaboradores³⁹ foram muito similares aos resultados do presente estudo com tilápia, especialmente em relação à glicose. No primeiro experimento de exposição de tilápias à dose de 100mg/kg (Figura 3) ficou bastante evidente o aumento dos níveis de glicose nos animais expostos, se esse resultado for comparado com o dos animais que só receberam a injeção de glicose. É importante destacar que essa injeção de glicose não alterou os

níveis desse metabólito nos animais que só receberam glicose. No segundo experimento com essa mesma dose, no entanto, diversos animais que não foram expostos ao chumbo elevaram seus níveis plasmáticos de glicose, ocorrendo, inclusive, uma morte entre os animais que não foram expostos (Figura 9). Um fato semelhante ocorreu com o grupo de animais que foram expostos no experimento com a dose de 1mg/kg (Figura 6). Um dos animais estava com uma leitura inicial de glicose cerca de 10 vezes maior que a média dos demais peixes, média essa que foi mantida durante os 9 dias do experimento. Esse animal veio a morrer (veja a Figura 9, Glicose, Controles, símbolo cheio) no dia seguinte, o que demonstra a importância da glicemia para a indicação do estado de saúde dos peixes.

Estes resultados, mesmo sendo necessário considerar que o estado inicial de saúde dos animais não foi exatamente o mesmo, indicam claramente o poder estressor do chumbo, revelado pelo aumento dos níveis de glicose. Analisando os animais que foram usados no segundo experimento com a dose de 100mg/kg, que elevaram seus níveis de glicose sem a exposição ao chumbo, podemos destacar duas questões: o fornecedor dessas tilápias foi diferente do fornecedor para o primeiro experimento; e o tamanho médio dos animais foi um pouco maior (ver o gráfico das massas nas Figuras 2 e 8). Essas questões levantam o problema do estudo de fisiologia de peixes, cuja resposta ao estresse é, normalmente, aguda e com diversos agentes estressores agindo simultaneamente. No caso do presente trabalho, fica claro que os animais usados no segundo experimento com a dose de 100mg/kg, apesar de estarem enquadrados nos limites da relação massa/comprimento que foi adotada como critério mínimo de seleção dos animais, não estavam com o mesmo estado fisiológico no início dos experimentos. Por questões operacionais, o tempo de adaptação dos animais às condições do laboratório foi de no máximo 3 dias. Para estudos de fisiologia é necessário pensar em um tempo muito mais prolongado, alimentando os animais nas condições do laboratório, antes de iniciar um estudo de exposição.

Catalase

Tecidos aeróbicos geram, constantemente, radicais superóxido e peróxido de hidrogênio na membrana das mitocôndrias e retículo endoplasmático, como um subproduto do metabolismo oxidativo. Nesses organismos é essencial o equilíbrio entre os agentes oxidantes e o sistema de defesa antioxidante (enzimático ou não).

A principal defesa antioxidante é proveniente das enzimas superóxido dismutase e catalase, que eliminam os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente. As enzimas glutathione peroxidase e o sistema glutathione-S-transferase catalisam a conjugação da glutathione reduzida com xenobióticos nucleofílicos¹⁰⁴. Com a descoberta da importância de reações de radicais livres (ou espécies reativas de oxigênio – ERO) nos processos biológicos, e nos mecanismos de toxicidade de substâncias químicas, diversas pesquisas têm sido realizadas sobre processos pró-oxidantes e antioxidantes em peixes¹⁰⁵.

No presente estudo só foi avaliada a atividade da enzima catalase no sangue das tilápias expostas ao chumbo. Segundo Wilhelm e colaboradores¹⁰⁵, o nível mais alto de catalase em peixes ocorre no sangue e no fígado e a quantidade de enzimas antioxidante no sangue, fígado, coração e músculo vermelho parece estar relacionada com as atividades metabólicas e natatórias do peixe. A catalase decompõe o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), produto tóxico do metabolismo, em água e oxigênio, porém quando o H₂O₂ está presente em baixas concentrações (condição fisiológica normal) a glutathione peroxidase é quem se encarrega de transformá-lo em água¹⁰⁴. O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio e, portanto, causador do estresse oxidativo, que é definido como um acúmulo de ERO que causam danos à estrutura de DNA, de lipídios, de carboidratos e de proteínas, além de outros componentes celulares¹⁰⁶.

Não foi observada diferença entre a atividade da catalase sanguínea dos animais que foram expostos ao chumbo em comparação aos animais que só receberam a injeção de glicose, nas duas doses que foram testadas. Esses resultados demonstram que a exposição aguda ao chumbo, através de uma dose única no peritônio, não foi capaz de gerar uma situação de estresse oxidativo. Em outro estudo com tilápias, expostas a diferentes concentrações de sulfato de cobre na água por 96 horas, para avaliação do estresse oxidativo, foi observada uma diminuição da atividade da catalase nas brânquias¹⁰⁶. Outro trabalho com a mesma espécie encontrou diminuição da atividade da catalase em eritrócitos, brânquias, fígado e rim de peixes de ambientes contaminados quando comparado com os níveis dessa enzima em animais que foram coletados em ambientes considerados limpos¹⁰⁷. Hansen e colaboradores¹⁰⁸ e Viléla¹⁰⁹, demonstraram em seus estudos que metais, tais como o chumbo, podem levar ao aumento da atividade da catalase em peixes. De acordo com Atli e colaboradores⁷⁵, a resposta da atividade da catalase em diferentes tecidos de tilápias expostas a diversas concentrações de Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺ varia bastante, dependendo do tecido, do metal e das suas concentrações, e que a atividade da catalase pode ser aceita como um sensível biomarcador para o biomonitoramento do ambiente aquático. É preciso ressaltar

que esses estudos foram realizados em condições de uma exposição crônica, com a dose administrada na água de forma contínua, seja em experimentos controlados no laboratório ou em situações de campo, onde o estressor pode estar na água ou nos alimentos. A injeção intraperitoneal, adotada no presente trabalho, é uma condição de estresse agudo, mesmo com a menor dose empregada (1mg/kg).

ALAD

A determinação da atividade da ALAD com amostras reduzidas de sangue pode não ser muito precisa e reprodutiva. No entanto, nos testes conduzidos no presente trabalho (Tabela 3), só foi encontrado diferença significativa entre os grupos expostos e não-expostos. Mesmo os controles sem e com injeção de glicose não mostraram diferenças significativas, com os dois métodos testados. Somente a exposição dos animais ao acetato de chumbo mostrou resultados significativamente diferentes, novamente sem diferenças entre os dois métodos utilizados. Com base nesses resultados, foi possível concluir a atividade da ALAD com somente 10µL de sangue, garantindo a determinação desse biomarcador nas amostras de 200µL de sangue que foram projetadas para os estudos de coleta de sangue do mesmo animal. A dispersão inter-ensaio, expressa pelo coeficiente de variação (CV%), para ambos os métodos, demonstrou a grande variação existente entre os peixes, que pode ser explicada pelo polimorfismo da ALAD, que altera a cinética de distribuição do chumbo nos órgãos alvo. Wigfield & Farant⁷⁹, realizaram análise da variância de dois métodos, com 200 e 10µL de sangue humano, e não encontraram diferenças significativas entre os resultados. Logo, mesmo com a alta dispersão dos resultados, com 10µL de sangue foi possível garantir as determinações sucessivas no mesmo animal, transformando cada peixe no controle dele mesmo.

O acetato de chumbo injetado no peritônio mostrou ser capaz de inibir a atividade da ALAD em todos os experimentos realizados e nas duas doses empregadas, 1 e 100mg/kg de peixe (Tabela 3 e Figuras 3, 6 e 9). Diversos autores também encontraram resultados que confirmam a inibição da ALAD em peixes. Costa¹¹⁰ demonstrou inibição significativa da atividade da ALAD eritrocitária após a exposição experimental trófica e subcrônica de *Hoplias malabaricus* ao Pb⁺⁺. Dwyer e colaboradores¹¹¹ e Schmitt e colaboradores³⁷ verificaram que quanto maior a concentração de chumbo no sangue, menor é a atividade da ALAD em algumas espécies de peixes expostos ambientalmente. Rodrigues e colaboradores¹¹² demonstraram que a atividade da ALAD no sangue de *Pimelodus maculatus* é inibida *in vitro*, nessa ordem, por Cd²⁺ > Pb²⁺ > Hg²⁺ > Cu²⁺ > Zn²⁺.

No fígado a ordem de sensibilidade foi $Pb^{2+} > Cd^{2+} > Hg^{2+} > Cu^{2+} = Zn^{2+}$ mostrando uma diferença de sensibilidade para a inibição de ALAD entre os dois tecidos.

Transaminases

A ALT é encontrada predominantemente no fígado, em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos. A AST é encontrada em concentração muito alta no músculo cardíaco, no fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas. Qualquer lesão (injúria) tissular ou doença afetando o parênquima hepático (ou uma lesão tecidual nos rins, coração e nos músculos esqueléticos) liberará uma maior quantidade destas enzimas para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos destas enzimas^{113,114}. Assim, o aumento observado na atividade destas enzimas no plasma dos peixes pode estar associado a alguma lesão celular em algum destes tecidos, decorrente da exposição dos animais a algum agente estressor. Neste estudo não foi encontrada nenhuma atividade de transaminases no plasma dos peixes, tanto controles como expostos, em nenhum momento depois da exposição, apesar de ter sido observado na necropsia de alguns peixes expostos um aumento no tamanho do fígado (Figura 4).

No entanto, biomarcadores histopatológicos são utilizados extensivamente para documentar e quantificar tanto a exposição quanto os efeitos de poluentes ambientais³⁸. A utilização de alguns desses parâmetros pode ser uma ferramenta bastante útil para a avaliação dos efeitos da contaminação ambiental nas populações de peixes, além de servir para uma avaliação do quadro de saúde dos animais.

4.1 Conclusões

O chumbo é um dos contaminantes ambientais mais comuns, tóxico para homens e animais, e sem nenhuma função fisiológica conhecida nos organismos. No Brasil, o controle das fontes de emissão de chumbo é praticamente inexistente, devido à falta de dados sobre a real exposição. Por isso, são necessários estudos que forneçam as informações indispensáveis para o melhor conhecimento da nossa realidade, como o uso de biomarcadores ambientais, que podem melhor relacionar a exposição com os efeitos adversos nas atividades humanas e, dessa forma, fornecer informações necessárias aos órgãos de Saúde Pública e Meio Ambiente nas ações de controle. Os resultados desse trabalho permitiram concluir que:

- 1 - É possível usar tilápias comerciais prontas para o abate, com peso médio ao redor de 400g, para estudos de parâmetros sanguíneos com até 7 coletas de sangue de um mesmo animal após 9 dias, indicando o potencial de uso desse animal para o monitoramento *in situ* do ambiente aquático;
 - 2 - A exposição de tilápias comerciais a doses únicas de 1, 10 e 100mg de acetato de chumbo por quilograma de peixe (1, 10 e 100mg/kg), por injeção intraperitoneal, não provoca alterações nucleares significativas que indiquem um efeito genotóxico de coleta em eritrócitos colhidos 24 horas depois da exposição;
 - 3 - A exposição de tilápias comerciais a uma dose única de 1mg/kg de acetato de chumbo não provoca a morte de nenhum peixe depois de 9 dias de exposição mas, com uma dose única de 100mg/kg, é possível que todos os animais morram antes de completar 4 dias de exposição; e que
 - 4 - Durante os primeiros 3 dias da exposição de tilápias a uma dose única de 100mg/kg de acetato de chumbo, ou durante os primeiros 9 dias de uma exposição a 1mg/kg, é possível identificar uma clara inibição da atividade da ALAD de eritrócitos e uma também nítida elevação dos níveis de glicose do plasma, sem alterações importantes no hematócrito, nos níveis de hemoglobina e nas atividades de catalase e de transaminases de amostras de sangue.
 - 5 - Nossos resultados demonstram, mais uma vez, que a tilápia é uma espécie bastante resistente às condições laboratoriais, mesmo manipuladas diariamente, indicando sua utilidade no monitoramento ambiental.
-

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Hawkes HA. Biology of Water Pollution: Effects and Control. *Biochem J.* 1972; 128(4).
 - 2- Basha PS, Rani AU. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2003; 56: (2) 218–221.
 - 3- Atli G, Canli M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* 2007; 145: 282–287.
 - 4- Eisler R. Lead Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. *Contaminant Hazard Reviews, Biological Report.* 1988; 85 (1.14).
 - 5- Fontáinhas-Fernandes A. The use of Biomarkers in Aquatic Toxicology Studies. *Revista Portuguesa de Zootecnia.* 2005; ano/vol XII, (1): 67-86.
 - 6- Ai-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research.* 1995; 343: 121-135.
 - 7- Sánchez-Galán S, Linde AR, Izquierdo JI., García-Vásquez E. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mutation Research.* 1998; 412: 219-225.
 - 8- Farah MA, Ateeq B, Ali MN, Ahmad W. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2003; 54: 25–29.
 - 9- Powers DA. Fish as model systems. *Science.* 1989; 246: 352-358.
 - 10- Paoliello MMB, Capitani EM. Environmental Contamination and Human Exposure to Lead in Brazil. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* 2005; 184: 59-96.
 - 11- ASTDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological Profile for Lead.* 2007. Atlanta, Georgia.
 - 12- WHO. World Health Organization. IPCS. Environmental health criteria 165 – Inorganic Lead. Geneva: WHO, 1995. 300p. Publish under the joint sponsorship of the United Nations Environment programme, the International Labour Organization, and the World Health Organization.
 - 13- Vanz A, Mirlean N, Baisch P. Avaliação de poluição do ar por chumbo particulado: Uma abordagem geoquímica. *Química Nova.* 2003; 26(1): 25-29.
 - 14- Klaassen CD, autor. *Metais Pesados e seus Antagonistas.* Rio de Janeiro; 2007. 1061p. (Bruton LL, Lazo JS, Parker KL, editores. Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica).
-

- 15- Jacob LCB, Alvarenga KF, Morata TC. Os efeitos da exposição ocupacional ao chumbo sobre o sistema auditivo: uma revisão da literatura. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2002; 68 (4): 564-569.
 - 16- UNEP - United Nations Environment Programme. Phasing lead out of gasoline: an examination of policy approaches in different countries (1999). <http://www.unep.fr/energy/act/tp/ldgas/index.htm> (acessado em 04/ março/ 2008).
 - 17- WHO. World Health Organization. IPCS. Environmental health criteria 85 – lead-environmental aspects. Geneva: WHO, 1989. 106p. Publish under the joint sponsorship of the United Nations Environment programme, the International Labour Organization, and the World Health Organization.
 - 18- Paoliello MMB, Capitana EM, autores. Chumbo. São Paulo; 2003. 353p. (Azevedo FA, Chasin AM, editores. *Metais: Gerenciamento da Toxicidade*).
 - 19- WHO. World Health Organization. Lead Review. Nordic Council of Ministers, 2003. Report n° 1, Issue n° 4.
 - 20- Sadao, M. Intoxicação por chumbo. *Revista de Oxidologia.* 2002; 37-42.
 - 21- IARC - International Agency for Research on Cancer. IARC, 2006. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 87 - Inorganic and Organic Lead Compounds. Summary of Data Reported and Evaluation Inorganic and Organic Lead Compounds.
 - 22- Burden VM, Sandheinrich MB, Caldwell CA. Effects of lead on the growth and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Pollution* 1998; 101: 285-289.
 - 23- Harshbarger JC, Clark JB. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America. *The Science of the Total Environment.* 1990; 94: 1-32.
 - 24- Goyer RA, Clarkson TW, autores. Toxic effects of metals. New York; 2001. 830p. (Klaassen CD, Amdur MO, Doull J, editores. *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*).
 - 25- Onuki J, Teixeira PC, Medeiros MHG, Di Mascio P. Danos ao DNA promovidos por ácido δ -aminolevulínico: possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente. *Quim. Nova.* 2002; 25, (4): 594-608.
 - 26- Schwartz J, Landrigan PJ, Baker EL, Orenstein WA, Von Lindern IH. Lead-induced anemia: dose-response relationships and evidence for a threshold. *American Journal of Public Health.* 1990; 80: (2) 165-168.
 - 27- Adams SM, Giesy JP, Tremblay LA, Eason CT. The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology. *Biomarkers.* 2001 jan; 6 (1): 1-6.
-

- 28- Van der Oost R, Byer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003; 13: 57-149.
- 29- WHO. World Health Organization. IPCS. Environmental health criteria 155 - Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva: WHO, 1993. 114p. Publish under the joint sponsorship of the United Nations Environment programme, the International Labour Organization, and the World Health Organization
- 30- Van Gestel CAM, Van Brummelen TC. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*. 1996; 5: 217-225.
- 31- Sakai T. Biomarkers of Lead Exposure. *Industrial Health*. 2000; 38: 127-142.
- 32- Stegeman JJ, Lecht JJ. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environmental Health Perspectives*. 1991; 90: 101-109.
- 33- Winston GW, Di Giulio RT. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol*. 1991; 19: 137-161.
- 34- Ahmad I, Hamid T, Fatima M, Chand HS, Jain SK, Athar M, Raisuddin S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1523: 37-48.
- 35- Sanders BM. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol*. 1993; 23:49-75.
- 36- Campana O, Sarasquete C, Blasco J. Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003; 55:116-125.
- 37- Schmitt CJ, Whyte JJ, Roberts AP, Annis ML, Maya TW, Tillitt DE. Biomarkers of metals exposure in fish from lead-zinc mining areas of Southeastern Missouri, USA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2007; 67:31-47.
- 38- Winkaler EU, Silva AG, Galindo HC, Martinez CBR. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Maringá*. 2001; 23 (2): 507-514.
- 39- Martinez CBR, Nagae MY, Zaia CTBV, Zaia DAM. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol*. 2004; 64(4): 797-807.
-

- 40- Boon JP, Everaarts JM, Hillebrand MTJ, Eggens ML, Pijnenburg J, Goksøyr A. Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenyl mixture (Clophen A40). *Sci. Total Environ.* 1992; 114: 113-133.
 - 41- Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 1993; 101: 378-384.
 - 42- Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. Developmental and reproductive toxicity of dioxin and related compounds: crossspecies comparisons. *Crit. Rev. Toxicol.* 1993; 23: 283-335.
 - 43- Payne JF, Mathieu A, Melvin W, Fancey LL. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 1996; 32: 225-231.
 - 44- Shugart LR. DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology.* 2000; 9: 329-340.
 - 45- Ferraro MVM, Fenocchio AS, Mantovani MS, Ribeiro CO, Cestari MM. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology.* 2004; 27 (1): 103-107.
 - 46- Bombail V, Aw D, Gordon E, Batty J. Application of the comet and micronucleus assay to butterfish (*Polis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere.* 2001; 44: 383-392.
 - 47- Çavas T, Ergene-Gözükara S. Micronucleus Test in Fish Cells: A Bioassay for In Situ Monitoring of Genotoxic Pollution in the Marine Environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2005; 46: 64-70.
 - 48- Wetmur JG, Bishop DF, Cantelmo C, Desnick RJ. Human δ -aminolevulinic acid dehydratase: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83 (20): 7703-7707.
 - 49- Wu MT, Kelsey K, Schwartz J, Sparrow D, Weiss S, HU H. A δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase (ALAD) Polymorphism May Modify the Relationship of Low-Level Lead Exposure to Uricemia and Renal Function: The Normative Aging Study *Environmental Health Perspectives.* 2003; 111 (3).
 - 50- Hu H, Wu MT, Cheng Y, Sparrow D, Weiss S, Kelsey K. The δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism and bone an blood lead levels in community-exposed men: the normative aging study. *Environmental Health Perspectives.* 2001; 109: 8.
-

- 51- Rajan P, Kelsey KT, Schwartz JD, Bellinger DC, Weuve J, Sparrow D, Spiro A, Smith TJ, Nie H, Hu H, Wright RO. Lead Burden and Psychiatric Symptoms and the Modifying Influence of the δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase (ALAD) Polymorphism: The VA Normative Aging Study. *Am J Epidemiol.* 2007; 166:1400–1408.
 - 52- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, Macgregor JT, Newell GW, Salamone MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research.* 1983; 123: 61-118.
 - 53- Udroi I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. Review. *Aquatic Toxicology* 2006; 79: 201-204.
 - 54- Lopes-Poleza SCG. Avaliação do efeito do metilmercúrio (CH_3Hg^+) em *Hoplias malabaricus* através da frequência de Aberrações Cromossômicas e dos ensaios Cometa e Micronúcleo. [Dissertação]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2004. 70p.
 - 55- Moron SE, Polez VLP, Artoni RF, Ribas JLC, Takahashi HK. Estudo de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida atrazina. *Braz. Soc. Ecotoxicol.* 2006; 1: (1) 27-30.
 - 56- Souza TS, Fontanetti CS. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research.* 2006; 605: 87–93.
 - 57- Andrade VM, Silva J, Silva FR, Heuser VD, Dias JF, Yoneama ML, Freitas TRO. Fish as Bioindicators to Assess the Effects of Pollution in Two Southern Brazilian Rivers Using the Comet Assay and Micronucleus Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2004; 44: 459-468.
 - 58- Minissi S, Ciccotti E, Rizzoni M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research.* 1996; 367: 245-251.
 - 59- Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research.* 1973; 18: 187-190.
 - 60- Schmid W. The Micronucleus Test. *Mutation Research.* 1975; 31: 9-15.
 - 61- Williams RC, Metcalfe CD. Development of an in vivo hepatic micronucleous assay with rainbow trout. *Aquatic Toxicology.* 1992; 23: 193-202.
 - 62- Majer BJ, Laky B, Knasmüller S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res.* 2001; 489 (2-3): 147-72.
-

- 63- Barth TJ, Zöller J, Kübler A, Born IA, Osswald H. Redifferentiation of oral dysplastic mucosa by the application of the antioxidants beta-carotene, atocopherol and vitamin C. *Int J Vitamin Nutr Res.* 1997; 67 (5): 368-76. Retraction in: Andrade MGS, Reis SRA, Robinson WM, Borges-Osório MR. *Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS* 2005; 20: n. 48.
- 64- Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research.* 2000; 455: 81-95.
- 65- Salvadori DMF, Ribeiro LR, Fenech M, autores. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. Canoas-RS; 2003. 201-223. (Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, editores. *Mutagênese Ambiental*).
- 66- Bucker A, Carvalho, W, Alves-Gomes JA. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazônica.* 2006; 36 (3): 357 – 364.
- 67- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research.* 1992; 271: 69-77.
- 68- Serrano-García L, Montero-Montoya R. Micronuclei and Chromatid Buds Are the Result of Related Genotoxic Events. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2001; 38: 38–45.
- 69- Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J. Cell. Biol.* 1998; 140: 1907-1320.
- 70- Shimizu N, Shimura T, Tanaka T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research.* 2000; 448: 81–90.
- 71- Rodríguez-Fuentes G, Gold BG. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Marine Environmental Research.* 2004; 58: 505–509.
- 72- Boscolo WR, Hayashi C, Soares CM, Furuya WM, Meurer F. Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento. *Rev. bras. zootec.* 2001; 30 (5): 1391-1396.
- 73- El-Sayed AFM. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* *Aquaculture.* 1999; 179: 149–168.
- 74- Jos A, Pichardo S, Prieto AI, Repetto G, Vázquez CM, Moreno I, Cameán NA. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology.* 2005; 72: 261–271.
-

- 75- Atli G, Alptekin O, Tükel S, Canli M. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 2006; 143: 218–224.
- 76- Rashed MN. Cadmium and Lead Levels in Fish (*Tilapia Nilotica*) Tissues as Biological Indicator for Lakewater Pollution. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2001; 68: 75–89.
- 77- Waterstrat PR, Pinkham L. Evaluation of eugenol as an anesthetic for the American Lobster *Homarus americanus*. *Journal of The World Aquaculture Society*. 2005; 36 (3): 420-424.
- 78- Sakai T, Yanagihara S, Ushio K. Restoration of lead inhibited δ aminolevulinate dehydratase activity in whole blood by heat, zinc ion and (or) dithiothreitol. *Clin. Chem*. 1980; 26: 625 - 628.
- 79- Wigfield DC, Farant JP. Assay of δ -Aminolevulinate Dehydratase in 10 μL of Blood. *Clin. Chem*. 1981; 27(1): 103-104.
- 80- Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 121-126.
- 81- NIOSH - National Institute for Occupational Safety and Health. Documentation for Immediately Dangerous to Life or Health Concentrations (IDLH): NIOSH Chemical Listing and Documentation of Revised IDLH Values (as of 3/1/95). Tetramethyl lead (as Pb). NIOSH, EUA, Maio 1994. Disponível em: <http://www.cdc.gov/NIOSH/IDLH/intridl4.html>. Acessado em: 02 mar. 2007.
- 82- Santos CR. Ácido delta aminolevulínico desifratase (ALAD) de tilápias (*Oreochromis niloticus*) na biomarcação do impacto ambiental por chumbo. [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz; 2008. 48 p.
- 83- Packard GC, Boardman TJ. The use of percentages and size-specific indices to normalize physiological data for variation in body size: wasted time, wasted effort? *Comp. Biochem. Physiol., Part A*. 1999; 122: 37-44.
- 84- Silva Filho MV. Sensibilidade in vitro da acetilcolinesterase cerebral ao metilparaoxon como critério de avaliação toxicológica em peixes. [Tese]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2004. 79p.
- 85- Carrasco K, Tilbury KL, Myers MS. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1990; 47: 2123–2136.
- 86- Almeida JA, Diniz YS, Marques SFG, Faine LA, Ribas BO, Burneiko RC, Novelli ELB. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International*. 2002; 27: 673–679.
-

- 87- Shaw BJ, Handy RD. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aqua. Toxicol.* 2006; 76: 111-121.
- 88- Kiereś H. Effect of EDTA on the activity of aminolevulinic dehydratase *in vitro* and *in vivo*. *Med. Pr.* 1977; 28 (3): 201-205.
- 89- Saxena G, Flora SJ. Lead-induced oxidative stress and hematological alterations and their response to combined administration of calcium disodium EDTA with a thiol chelator in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2004; 18 (4): 221-33.
- 90- Soldatov AA. Peculiarities of organization and functioning of the Fish red blood system. *Journal of Biochemistry and Physiology.* 2005; 41 (3): 272-281.
- 91- Sánchez-Galán S, Linde AR, Ayllon F, Garcia-Vazquez E. Induction of Micronuclei in Eel (*Anguilla anguilla* L.) by Heavy Metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2001; 49: 139-143.
- 92- Pereira EVP; Kroll BL; Souza EB. Análise da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em camundongos (*Mus domesticus domesticus*), tratados com Enzicoba (cobamamida). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama.* 2004 8(1): 31-37.
- 93- Çavas T. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology.* 2008; 46: 352–358.
- 94- Koca S, Koca YB, Yildiz Ş, Gürcü B. Genotoxic and Histopathological Effects of Water Pollution on Two Fish Species, *Barbus capito pectoralis* and *Chondrostoma nasus* in the Büyük Menderes River, Turkey. *Biol Trace Elem Res.* 2008; 122:276–291.
- 95- Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Kangwanrangsang N, Zakaria S. The protective influence of ascorbic acid against the genotoxicity of waterborne lead exposure in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Biology.* 2008; 73: 355–366.
- 96- Bittencourt NLR, Molinari LM, Scoaris DO, Pedroso RB, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, Abreu Filho BA, Dias Filho BPD. Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. *Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá.* 2003; 25, (2): 385-389.
- 97- Azevedo TMP, Martins ML, Yamashita MM, Francisco CJ. Hematologia de *Oreochromis Niloticus*: Comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do Rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. *B. Inst. Pesca, São Paulo.* 2006; 32 (1): 41-49.
-

- 98- Martins ML, Pilarsky F, Onaka EM, Nomura DT, Fenerick Jr. J, Ribeiro K, Myiazaki DMY, Castro MP, Malheiros EB. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis Niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. B. Inst. Pesca, São Paulo. 2004; 30(1): 71 – 80.
- 99- Ates B, Orun I, Talas ZS, Durmaz G, Yilmaz I. Effects of sodium selenite on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb²⁺ and Cu²⁺. Fish Physiol Biochem. 2008; 34: 53–59.
- 100- Lohner TW, Reash RJ, Willet VE, Rose LA. Assessment of Tolerant Sunfish Populations (*Lepomis* sp.) Inhabiting Selenium-Laden Coal Ash Effluents 1. Hematological and Population Level Assessment. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2001; 50: 203-216.
- 101- Gill TS; Pant JC. Hematological and pathological effects of chromium toxicosis in the freshwater fish, *Barbus conchoniis*. Water, Air, and Soil Pollution. 1987; 35: 241-250.
- 102- Bonga, SEW. The stress response in fish. Physiol. Rev. 1997; 77 (3): 591-625.
- 103- Barton BA. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. Integ. And Comp. Biol. 2002; 42: 517–525.
- 104- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs Physiological reviews. 1979; 59 (3): 527-589.
- 105- Wilhelm D Filho, Giulivi C, Boveris A. Antioxidant defences in marine fish- I. Teleosts. Comp. Biochem. Physiof. 1993; 106C (2): 409-413.
- 106- Lucarelli ACT. Biomarcadores de estresse oxidativo em tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (Teleostei; Cichlidae), expostas ao sulfato de cobre aquático. [dissertação]. São Carlos (SP): Universidade Federal de São Carlos; 2006. 74p.
- 107- Bairy ACD, Saito E, Carvalho PSM, Junqueira VBC. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. Aquatic Toxicology. 1996; 34: 151-162.
- 108- Hansen BH, Rømme S, Garmo Ø.A, Olsvik PA, Andersen RA. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C . 2006; 143: 263–274.
- 109- Viléla MBFA. Estresse oxidativo em *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo. [monografia]. Londrina (PR): Universidade Estadual de Londrina; 2007. 59 p.
-

- 110- Costa JRMA. Padronização de metodologias para o uso de biomarcadores de contaminação ambiental em Traíra (*Hoplias malabaricus*, erythrinidae): δ -Alad, metalotioneína e vitelogenina. [Tese]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 2006. 132p.
- 111- Dwyerc FJ, Schmitts CJ, Finger SE, Mehrle PM. Biochemical changes in longear sunfish, *Lepomis megalotis*, associated with lead, cadmium and zinc from mine tailings. J. Fish Biol. 1988; 33: 307-317.
- 112- Rodrigues AL, Bellinaso ML, Dick T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinate dehydratase of *Pimelodus maculatus* (pisces, pimelodidae). Comp. Biochem. Physiol. 1989; 9411 (1): 65-69.
- 113- Sparling DW, Vann S, Groves RA. Blood changes in mallards exposed to white phosphorus. Env. Toxic. and Chem. 1998; 17 (12): 2521-2539.
- 114- Olsen RE, Sundell K, Ringø E, Myklebust R, Hemre GI, Hansen T, Karlsen Ø. The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Aquaculture. 2008; 280: 232–241.
-