



Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS
EM PIAVAS (*Leporinus* sp.) EXPOSTAS AO
ZINCO E AO COBRE**

Carolina Rosa Gioda

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS
EM PIAVAS (*Leporinus* sp.) EXPOSTAS AO
ZINCO E AO COBRE**

por

Carolina Rosa Gioda

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2005

Universidade Federal de Santa Maria

**Centro de Ciências Naturais e Exatas
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM PIAVAS
(*Leporinus* sp.) EXPOSTAS AO
ZINCO E AO COBRE**

elaborada por

Carolina Rosa Gioda

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dra. Vania Lucia Pimentel Vieira
(Presidente/Orientadora)

Dr. Bernardo Baldisserotto

Dr. Adalto Bianchini

Santa Maria, 19 agosto de 2005.

Árvore de amigos...

Existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de terem cruzado o nosso caminho;

Algumas percorrem ao nosso lado, vendo muitas luas passarem, mas outras apenas vemos entre um passo e outro;

A todas elas chamamos de amigo;

Há muitos tipos de amigos...

Talvez cada folha de uma árvore caracterize um deles;

O primeiro que nasce do broto é o amigo pai e a amiga mãe;

Mostram o que é ter vida;

Depois vem o amigo irmão, com quem dividimos o nosso espaço para que ele floresça como nós;

Passamos a conhecer toda a família de folhas, a qual respeitamos e desejamos o bem;

Mas o destino nos apresenta outros amigos, os quais não sabíamos que iam cruzar o nosso caminho...

Muitos desses denominados amigos do peito, do coração;

São sinceros, são verdadeiros;

Sabem quando não estamos bem, sabem o que nos faz feliz...

Às vezes, um desses amigos do peito estala o nosso coração e então é chamado de amigo namorado...

Este dá brilho aos nossos olhos, música aos nossos lábios, pulos aos nossos pés;

Mas também há aqueles amigos por um tempo, talvez umas férias ou mesmo um dia ou uma hora....

Estes costumam colocar muitos sorrisos na nossa face, durante o tempo que estamos por perto...

Falando em perto, não podemos esquecer dos amigos distantes...

Aqueles que ficam nas pontas dos galhos, mas que, quando o vento sopra, sempre aparecem novamente entre uma folha e outra;

O tempo passa, o verão se vai, o outono se aproxima, e perdemos algumas de nossas folhas...

Algumas nascem num outro verão e outras permanecem por muitas estações;

Mas o que nos deixa mais feliz é que as que caíram continuam por perto, continuam alimentando a nossa raiz com alegria;

Lembranças de momentos maravilhosos enquanto cruzavam com o nosso caminho...

Dedico esta tese a minha família

À minha querida mãe, meu eterno agradecimento...
Com certeza seu apoio, sua dedicação e carinho...
foram e serão essenciais nas minhas conquistas;
Apesar do plano que nos separa, sei que tu torces
por minha felicidade, assim como eu rezo e te desejo
todos os dias, onde quer que estejas, que sejas feliz...

Meus sinceros agradecimentos a meu pai,
as minhas irmãs Adriana e Fabiane,
a meu cunhado Dênis,
a minha querida sobrinha Joana e
a meu namorado Leandro
pela força, apoio, amizade e
carinho em todas as horas...
À todos vocês meu eterno agradecimento!

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a energia que rege este universo e que contribuiu de forma excelente na realização deste trabalho;

Gostaria de agradecer a minha orientadora, prof^a. Vania, por sua ajuda e orientação na realização de minha monografia de bacharelado, bem como, de minha dissertação de mestrado e outros trabalhos. Muito obrigada pelos valiosos ensinamentos e pela compreensão.

À minha co-orientadora, prof^a. Vera Maria Morsch, pela ajuda de sempre, pela orientação na iniciação científica e por sua participação e colaboração na realização de diferentes trabalhos, muita obrigada!

À prof^a Maria Rosa, a qual suas aulas de bioquímica foram meu maior estímulo e minha inspiração para o ingresso na área, muito obrigada pela dedicação e pelos primeiros ensinamentos, com certeza seu incentivo foi essencial na minha escolha.

Ao prof. Everton Behr, por me mostrar a importância das pequenas coisas e a responsabilidade dos pequenos atos, por me fazer enxergar a biologia com outros olhos e pela ajuda prestada nos trabalhos. Além de te considerar um grande mestre, te considero um grande amigo, muito obrigada por tudo!

Ao meu namorado Leandro, os agradecimentos serão sempre infinitos, muito obrigada pelo companheirismo, carinho, dedicação, amizade, paciência, pelo suporte, pelos preciosos ensinamentos, pela ajuda de sempre, tanto profissional quanto pessoal; com certeza sua presença e participação foram essenciais no meu crescimento.

Aos colegas de laboratório, Márcia, Carine, Joseânia, Charlene, Milene, Bibiana, Alexandra, Lissandra, Vera, Gabrieli, Róli e Daiana, meu muito obrigada!

Gostaria de agradecer a querida e meiga Alexandra pela ajuda e disponibilidade de sempre, por sua amizade, dedicação e contribuição, muito obrigada! Sua participação foi essencial para a conclusão desta dissertação;

À Charlene e Milene, muito obrigada pela disponibilidade, participação e ajuda!

Ao Rafael e Fábio, meus sinceros agradecimentos pela amizade, parceria e disponibilidade de sempre; com certeza vocês facilitaram em muito meu trabalho.

Aos amigos Neiva e Ronaldo, pela atenção, boa vontade e ajuda.

Aos colegas de outros laboratórios, professores e funcionários, muito obrigada!

Gostaria de agradecer a três amigas em especial, Joseânia, Vera e Angélica pela amizade, apoio e coleguismo em todas as horas.

Às minhas colegas de faculdade Adriana, Daiana e Daniela, minhas amigas do coração; obrigada pelo apoio, amizade e incentivo. Suas amizades sinceras foram muito importantes, com certeza contem sempre comigo, assim como sempre pude e posso contar com vocês!

À banca examinadora, Bernardo Baldisserotto e Adalto Bianchini, pela participação nesta dissertação, objetivando a melhora do trabalho.

À UFSM, ao curso de Mestrado em Bioquímica Toxicológica e ao CNPq pela bolsa concedida e pela oportunidade, muito obrigada!

Meu agradecimento especial, a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivo específico	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Potencial de contaminação ambiental	5
3.2 Zinco e Cobre	6
3.3 Piava (<i>Leporinus</i> sp.)	8
3.4 Acetilcolinesterase (AChE)	9
3.5 δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D)	11
3.6 Peroxidação lipídica e sistema antioxidante	12
3.7 Parâmetros hematológicos	14
3.8 Acumulação de metais	15
4. Manuscritos.....	17
4.1 Manuscrito 1- Carolina Rosa Gioda, Leandro Ademar Lissner, Alexandra Pretto, Rafael Lazzari, João Batista Teixeira da Rocha, Maria Rosa Chitolina Schetinger, João Radünz Neto, Vania Lucia Pimentel Vieira Exposure to sublethal concentrations of Zn (II) and Cu (II) changes biochemistry parameters in <i>Leporinus</i> sp. (ANOSTOMIDAE)	18

4.2 Manuscrito 2- Carolina Rosa Gioda, Leandro Ademar Lissner, Alexandra Pretto, Vera Maria Morsch, Valderi Luiz Dressler, Érico Marlon de Moraes Flores, Bernardo Baldisserotto, Vania Lucia Pimentel Vieira	
Acetylcholinesterase activity and accumulation in different tissues of <i>Leporinus</i> sp. exposed to sublethal zinc and copper concentrations	41
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. ANEXO	75
Anexo 1- Figura de um exemplar de piava (<i>Leporinus</i> sp.)	75

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

TABLE 1- Zinc (1A) and copper (1B) effects on TBARS levels (nmol MDA/mg protein) in brain, liver and muscle of <i>Leporinus</i> sp. exposed for 30 and 45 days	26
--	----

TABLE 2-. Hematological parameters of <i>Leporinus</i> sp. after zinc(II) and copper(II) exposure for 45 days	27
---	----

MANUSCRITO 2

TABLE 1- Lethal concentrations (LC ₅₀), increased and decreased brain and muscle AChE activity (compared to control) in <i>Leporinus</i> sp. exposed to 2.3 and 4.6 mg/L of zinc and to 0.02 and 0.04 mg/L of copper after 30 and 45 days	49
---	----

TABLE 2- Zinc (2A) and copper (2B) accumulation in kidney, liver, muscle and brain of <i>Leporinus</i> sp. exposed for 30 and 45 days	50
---	----

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1- Reação da superóxido dismutase	6
FIGURA 2- Cobre doando elétrons ao peróxido de hidrogênio, via reação de Fenton, produzindo radicais livres	8
FIGURA 3- Catalase decompondo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio	13

MANUSCRITO 1

FIGURE 1- Catalase activity (E/min/mg of protein) in liver of <i>Leporinus</i> sp. exposed to 0.0, 2.3 and 4.6 mg/L of Zn(II) and 0.0, 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days experiment	28
FIGURE 2- Zinc and copper effects on δ - aminolevulinic acid desidratase (ALA-D) activity (nmol PBG mg tissue ⁻¹ h ⁻¹) in liver of <i>Leporinus</i> sp. exposed to 0.0, 2.3 and 4.6 mg/L of Zn(II) and 0.0, 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days	29
FIGURE 3- Zinc and copper effects on δ - aminolevulinic acid desidratase (ALA-D) activity (nmol PBG mg tissue ⁻¹ h ⁻¹) in kidney of <i>Leporinus</i> sp. exposed to 0.0, 2.3 and 4.6 mg/L of Zn(II) and 0.0, 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days	30
FIGURE 4- Zinc and copper effects on δ - aminolevulinic acid desidratase (ALA-D) activity (nmol PBG mg tissue ⁻¹ h ⁻¹) in brain of <i>Leporinus</i> sp. exposed to 0.0, 2.3 and 4.6 mg/L of Zn(II) and 0.0, 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days	31
FIGURE 5 - Zinc and copper effects on δ - aminolevulinic acid desidratase (ALA-D) activity (nmol PBG mg tissue ⁻¹ h ⁻¹) in muscle of <i>Leporinus</i> sp. exposed to 0.0, 2.3 and 4.6 mg/L of Zn(II) and 0.0, 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days	32

MANUSCRITO 2

FIGURE 1 - Brain and muscle specific AChE activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) in *Leporinus* sp. exposed to 0.0, 2.3 and 4.6 mg/L of Zn(II) for 30 and 45 days 51

FIGURE 2 - Brain and muscle specific AChE activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) in *Leporinus* sp. exposed to 0.0, 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days 52

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE- Acetilcolinesterase

ALA- Ácido aminolevulínico

δ - ALA- D- Delta aminolevulinato desidratase

Ca²⁺- Cálcio

CAT- Catalase

Cu²⁺- Cobre

CL₅₀- Concentração letal média

CuSO₄- Sulfato de Cobre

ERO- Espécies reativas de oxigênio

SOD- Superóxido dismutase

TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Zn²⁺- Zinco

ZnSO₄- Sulfato de zinco

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM PIAVAS (*Leporinus* sp.) EXPOSTAS AO ZINCO E AO COBRE

Autora: Carolina Rosa Gioda
Orientadora: Vania Lucia Pimentel Vieira
Local e data de defesa: Santa Maria, 19 de agosto de 2005.

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos do zinco e do cobre, metais freqüentemente encontrados em ecossistemas aquáticos, sobre o metabolismo de piavas (*Leporinus* sp.). Neste trabalho verificou-se a concentração letal média (CL₅₀) para os diferentes metais e foram medidas as atividades de diferentes enzimas como acetilcolinesterase (AChE) (cérebro e músculo); catalase (fígado); delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) (fígado, rim, cérebro e músculo); formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (fígado, cérebro e músculo); parâmetros hematológicos e acumulação dos metais em diferentes tecidos (fígado, rim, cérebro e músculo). Juvenis de *Leporinus* sp. foram expostos ao zinco e ao cobre para a determinação da CL₅₀ que foi de 23.4 mg/L para zinco e 0.2 mg/L para o cobre. A partir desta determinação, os peixes foram expostos durante 30 e 45 dias a 10% e 20% destas concentrações que corresponderam a 2.3 mg/L e 4.6 mg/L para o zinco e 0.02 mg/L e 0.04 mg/L para o cobre. A atividade da δ -ALA-D foi alterada em resposta à exposição aos metais, sendo sua atividade no cérebro inibida pelo zinco após 45 dias de exposição às duas concentrações testadas e, no fígado e rim, inibida em ambas concentrações e tempos de exposição testados. Já o tecido muscular, demonstrou inibição na atividade da δ -ALA-D somente na concentração 4.6 mg/L depois dos 45 dias de exposição ao zinco. A exposição ao cobre também demonstrou uma inibição da atividade da δ -ALA-D no fígado, rim e músculo em ambas concentrações e tempos de exposição testados. No cérebro, em geral, a

atividade da δ -ALA-D não foi alterada quando comparada aos controles. Os parâmetros hematológicos também mostraram alterações após exposição a ambos metais depois dos 45 dias de experimento. A redução no hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos demonstram que os peixes expostos ao zinco e ao cobre apresentavam sinais de anemia. A atividade da catalase no fígado aumentou para ambos metais em ambas concentrações e tempos de exposição. Os níveis de TBARS nos peixes expostos ao zinco encontraram-se aumentados no fígado e cérebro após 45 dias de exposição em ambas concentrações e, no músculo, em ambos tempos de exposição e concentrações testadas. O cobre reduziu os níveis de TBARS no fígado em ambas concentrações e tempos de exposição. Já no cérebro, houve uma redução destes níveis somente após 45 dias de exposição e, no músculo, após 30 dias de exposição a ambas concentrações testadas. A atividade da AChE aumentou em músculo (30 e 45 dias) e cérebro (30 dias) para os peixes expostos ao zinco em ambas concentrações. Entretanto, nos 45 dias de exposição ao zinco, a atividade da AChE cerebral encontrou-se reduzida na concentração 2.3 mg/L e aumentada na concentração 4.6 mg/L. Já para o cobre, a atividade da AChE aumentou no músculo e cérebro em ambas concentrações e tempos testados. Os peixes expostos ao zinco demonstraram acumulação do metal no fígado e rim em ambas concentrações testadas, após os 30 e 45 dias de exposição. Já para o cobre, foi observada acumulação do metal somente no cérebro, em ambas concentrações testadas após 45 dias. Este estudo demonstrou que o zinco e o cobre, apesar de serem microelementos importantes para a função celular, mesmo em concentrações subletais, podem alterar a atividade de diversas enzimas de interesse toxicológico, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, e se acumular, de diferentes formas, nos tecidos.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post - Graduate Course on Toxicological Biochemistry
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM PIAVAS (*Leporinus* sp.) EXPOSTAS AO ZINCO E AO COBRE (TOXICOLOGICAL PARAMETERS EVALUATION IN (*LEPORINUS* SP.) EXPOSED TO ZINC AND TO COPPER)

Author: Carolina Rosa Gioda
Adviser: Vania Lucia Pimentel Vieira
Place and date of defense: Santa Maria, august 19th, 2005.

The aim of this study was to verify the zinc and copper effects, metals frequently found in aquatic ecosystems, on the metabolism of piavas (*Leporinus* sp.). In this work, it was verified the average lethal concentrations (LC₅₀) for the different metals. Activities of different enzymes such as AChE (brain and muscle), catalase (liver), δ -ALA-D (liver, kidney, muscle and brain), TBARS formation (liver, brain and muscle), hematological parameters and metals accumulation in different tissues (liver, kidney, brain and muscle) were also analyzed. Juvenile of *Leporinus* sp. was exposed to zinc and copper for LC₅₀ determination, which was estimated as 23.4 mg/L for Zn(II) and 0.2 mg/L for Cu(II). Based on these results, fish were exposed for 30 or 45 days to concentrations equivalent to 10% and 20% of the LC₅₀ which corresponded to 2.3 and 4.6 mg/L for Zn(II) and 0.02 and 0.04 mg/L for Cu(II), respectively. δ -ALA-D activity was modified in response to metal exposure, being inhibited by zinc in the brain after 45 days of exposure in both metals concentrations tested. In liver and kidney, it was inhibited by both metals concentrations and times of exposure. Muscle demonstrated inhibition in δ -ALA-D activity only in 4.6 mg/L concentration after 45 days exposure to Zn(II). Copper exposure also inhibited the δ -ALA-D activity in liver, kidney and muscle in both metal concentrations and exposure time tested. In the brain, in general, δ -ALA-D activity was not altered when compared to controls.

Hematological parameters also showed alterations after exposure to both metals after 45 days experiment. Reduction of hematocrit, erythrocyte, hemoglobin content demonstrated that fish exposed to zinc and copper showed anemic signs. Liver catalase activity increased after zinc or copper exposure in both concentrations and exposure times tested. TBARS levels increased in liver and brain of fish exposed to Zn(II) for 45 days in both metal concentrations. In muscle, it did in both exposure times and concentrations tested. Cu(II) exposure reduced the TBARS levels in liver in both concentrations and time of exposure tested. In brain, there was a decreased in TBARS levels only after 45 days of exposure. In muscle, this decreased was observed after 30 days of exposure in both concentrations. AChE activity increased in muscle (30 and 45 days exposure) and brain (30 days exposure) in fish exposed to Zn(II) in both concentrations tested. However, after 45 days of exposure to zinc, cerebral AChE activity decreased at 2.3 mg/L of Zn(II) and increased at 4.6 mg/L of Zn(II). For Cu(II), both muscle and brain AChE activity increased in both concentrations and exposure time tested. Fish exposed to zinc showed metal accumulation in the liver and kidney in both concentrations and time of exposure tested. For copper, the metal accumulation was only observed in brain and after 45 days of exposure in both concentrations tested. This study showed that although zinc and copper are required as microelements in the normal metabolism of cells, sublethal concentrations of these metals can affect the activity of several enzymes of toxicological interest, increase the production of oxygen reactive species which can cause stress and accumulate in different manners in the tissues.

1. INTRODUÇÃO

Processos naturais e atividades antropogênicas liberam para o ambiente aquático uma grande variedade de produtos tóxicos, dentre eles metais como o zinco (Zn^{2+}) e o cobre (Cu^{2+}), que podem vir a causar danos ao ecossistema (Bentley, 1992; Rashed, 2001; Bordajandi et al., 2003). O zinco e o cobre são classificados como micronutrientes, sendo em alguns casos requeridos para a função celular (Karan et al., 1998; McGeer et al., 2000). Porém em concentrações elevadas, Zn^{2+} e Cu^{2+} podem se tornar tóxicos aos peixes e a outros organismos aquáticos (Bentley, 1992; Romani et al., 2003; Celik & Oehlenschlager, 2004).

Dentre os parâmetros utilizados para avaliar a toxicidade por metais em peixes, cita-se a medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). As colinesterases são amplamente distribuídas nos tecidos animais e estudos demonstraram alterações na atividade da enzima AChE em resposta à exposição a metais em peixes (Nemcsók et al., 1984; de la Torre et al., 2000; Lionetto et al., 2003; Romani et al., 2003). Alterações fisiológicas, causadas em peixes devido à exposição a compostos tóxicos, também podem ser avaliadas pelo estudo de parâmetros hematológicos como o hematócrito, a concentração de hemoglobina e número de leucócitos, dentre outros, que podem indicar respostas de estresse associado ao desenvolvimento de enfermidades (Roméo et al., 2000; Tavares-Dias et al., 2002; Barcellos et al., 2004).

Poluentes ambientais também podem provocar estresse oxidativo em um grande número de organismos aquáticos, incluindo peixes, e levar a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Lionetto et al., 2003; Siraj Basha & Usha Rani, 2003; Dautremepuits et al., 2004). Um dos parâmetros utilizados para avaliar estresse oxidativo é a medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Oakes & Van Der Kraak, 2003). Alterações na atividade da enzima catalase também podem indicar a intoxicação por metais, já que esta é uma importante enzima antioxidante (Roméo et al., 2000; Lionetto et al., 2003; Siraj Basha & Usha Rani, 2003; Avci et al., 2005).

A delta aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), segunda enzima da via de biossíntese do heme, possui grupos tióis (-SH) essenciais para sua atividade (Wilson et al., 1972). Esta enzima é amplamente distribuída no fígado, cérebro, rim e células eritrocitárias e sua atividade tem sido utilizada como um biomarcador para exposição a metais (Conner et al., 1994; Burden et al., 1998; Campana et al., 2003).

Considerando a escassez de estudos bioquímicos e toxicológicos em peixes nativos do Brasil, o presente estudo visa contemplar uma espécie de interesse para a piscicultura na região Sul. A piava (*Leporinus* sp.) é um peixe amplamente distribuído na Colômbia, Guianas, Amazônia e no Rio Grande do Sul (Andrian et al., 1994). Este gênero apresenta um bom potencial econômico, sendo relevante o desenvolvimento de pesquisas que propiciem um melhor conhecimento sobre possíveis alterações bioquímicas frente à contaminantes aquáticos, já que estes podem vir a comprometer a sobrevivência de espécies aquáticas. O estudo torna-se mais relevante para a região uma vez que a piava foi escolhida como o peixe bioindicador das bacias do Vacacaí e Vacacaí-Mirim.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo verificar a toxicidade aguda letal e os efeitos crônicos das concentrações subletais de zinco e cobre sobre parâmetros hematológicos, enzimáticos e níveis de peroxidação lipídica em piavas (*Leporinus* sp.). Outro aspecto a ser avaliado é a acumulação destes metais nos tecidos;

2.2 Objetivos específicos:

1. Determinar as concentrações letais médias (CL₅₀), aos referidos metais, para o gênero em questão.
2. Avaliar o efeito da exposição subletal ao zinco e ao cobre sobre a atividade da enzima AChE cerebral e muscular de piavas.
3. Verificar o efeito da exposição subletal ao zinco e ao cobre sobre a atividade da enzima δ -ALA-D em fígado, rim, cérebro e músculo de piavas.
4. Investigar a ocorrência de estresse oxidativo pela medida de TBARS em músculo, cérebro e fígado de piavas, expostas a concentrações subletais de zinco e cobre.
5. Investigar uma possível resposta antioxidante, induzida pelo zinco e pelo cobre, através da avaliação da atividade da enzima catalase em fígado de piavas expostas a estes metais.

6. Verificar os efeitos do zinco e do cobre sobre parâmetros hematológicos (hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e leucócitos) de piavas.

7. Determinar a acumulação dos metais em diferentes tecidos de piavas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Potencial de contaminação ambiental

A contaminação de águas por metais é geralmente oriunda da descarga de poluentes da agricultura e das atividades industriais e urbanas (Bentley, 1992; Rashed, 2001; Bordajandi et al., 2003; Siraj Basha & Usha Rani, 2003). As águas são drenadas para os rios transportando diferentes resíduos e uma variedade de produtos tóxicos que podem causar danos ao ecossistema e aos organismos que aí vivem (Barak & Manson, 1990; Hamilton et al., 1998; Bordajandi et al., 2003; Romani et al., 2003). O aumento da contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais tem causado diversas alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em organismos aquáticos (Dethloff et al., 1999; Bordajandi et al., 2003; Campana et al., 2003; Siraj Basha & Usha Rani, 2003; Dautremepuits et al., 2004).

Poluentes aquáticos também podem influenciar negativamente na reprodução de peixes. Além disso, os efeitos subletais deixam peixes juvenis e adultos mais suscetíveis a predação e/ou menos capazes de tolerar outro agente estressante, como baixas concentrações de oxigênio dissolvido (Muller & Lloyd, 1996).

Atualmente, diversos estudos indicam que Hg, Pb, Cd, Cu, Zn, Al, Mn e Cr são os principais metais presentes no ambiente aquático (Schlenk & Benson, 2001). A toxicidade de metais, em peixes, depende das características físico-químicas da água, da concentração, do tipo de metal, bem como do tempo de exposição. Além disso, a toxicidade pode variar de acordo com a espécie de peixe, estágio de vida e hábito alimentar (Campana et al., 2003; Papagiannis et al., 2004; Sanchez et al., 2004).

Peixes têm sido freqüentemente usados como indicadores de poluição ambiental em sistemas aquáticos, pois são sensíveis a mudanças nos diferentes ambientes (Paris-Palacios et al., 2000; Roméo et al., 2000; Whitfield & Elliott, 2002). Eles são geralmente considerados o topo da cadeia alimentar aquática e podem concentrar grandes quantidades de metais em seus tecidos (Barak & Manson, 1990;

Mansour & Sidky, 2002). Diferentes espécies de peixes capturadas em lagos, próximos a áreas urbanas, apresentaram altas concentrações de zinco e cobre em diferentes tecidos analisados (Bordajandi et al., 2003; Papagiannis et al., 2004).

A absorção de metais como zinco e cobre pode se dar diretamente através da água ou indiretamente através da cadeia alimentar (Bentley, 1992; Hamilton et al., 1998). Nos peixes, as brânquias são um importante alvo de metais, mas, estes também podem ser absorvidos pelo trato gastrintestinal e revestimento epitelial (Watanabe et al., 1997; Schlenk & Benson, 2001). Nas brânquias, os metais podem causar danos ao epitélio branquial, resultando assim em distúrbios respiratórios e osmoregulatórios (Hogstrand & Wood, 1995; McGeer et al., 2000; Handy, 2003).

3.2 Zinco e cobre

Zn^{2+} e Cu^{2+} são metais de transição, considerados micronutrientes essenciais, sendo em alguns casos requeridos para a função celular (Karan et al., 1998; McGeer et al., 2000). Apesar do Zn^{2+} ser menos tóxico que o Cu^{2+} , em altas concentrações ambos podem vir a ser prejudicial ao organismo (Bentley, 1992; Camakaris et al., 1999; Schlenk & Benson, 2001; Celik & Oehlenschager, 2004). O Zn^{2+} é considerado o mais abundante elemento traço intracelular e está envolvido na estrutura e função de mais de 300 enzimas, sendo essencial para a função celular e metabólica. Este íon também é parte integral de metaloenzimas tais como a fosfatase alcalina, álcool desidrogenase e anidrase carbônica (Watanabe et al., 1997, Celik & Oehlenschager, 2004). O Zn^{2+} exerce função antioxidante por ser cofator da superóxido dismutase CuZnSOD, uma enzima que defende a célula contra a ação do ânion superóxido (figura1) (Ho, 2004).

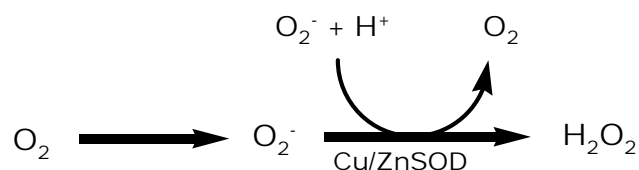


Figura 1- Reação da superóxido dismutase.

Esta enzima tem como função a remoção do ânion superóxido.

Hogstrand & Wood (1995) demonstraram que um dos mais importantes efeitos subletais do Zn^{2+} em peixes é a inibição da absorção de cálcio (Ca^{2+}), já que estes íons competem pelos mesmos sítios de absorção nas brânquias. Conseqüentemente, o excesso de zinco pode levar a uma hipocalcemia. Então, uma redução da concentração de Ca^{2+} seria prejudicial ao organismo, já que este elemento é essencial para a integridade da membrana celular e na estabilização da permeabilidade branquial (de la Torre et al., 2000).

O cobre, assim como o zinco, é considerado um importante elemento para os animais, pois é utilizado como cofator enzimático, além de estar envolvido no processo de transferência de elétrons na cadeia respiratória (Watanabe et al., 1997, Camakaris et al., 1999; Celik & Oehlenschlager, 2004) e em reações redox em enzimas tais como citocromo oxidase e superóxido dismutase (figura 1) (Watanabe et al., 1997, Camakaris et al., 1999; Paris-Palacios et al., 2000). A monoamina oxidase, responsável pela maturação do colágeno e elastina, também é uma enzima dependente de cobre (Sharma et al., 2005). Acrescenta-se ainda, a ceruloplasmina, uma importante enzima que está envolvida na mobilização e na utilização de ferro estocado no fígado (Sharma et al., 2005). Órgãos como o fígado, cérebro e coração contêm quantidades consideráveis de cobre (Watanabe et al., 1997).

Estudos demonstraram que efeitos adversos foram observados em peixes expostos ao Cu^{2+} . Por exemplo, pode-se citar alterações nas funções respiratórias e ionoregulatórias devido aos danos em órgãos alvos como as brânquias. Esta modificação no metabolismo aeróbico aumentou o consumo de oxigênio e este aumento, por sua vez, reduziu o desempenho natatório (McGeer et al., 2000; Handy, 2003). Além disso, McGeer et al. (2000) demonstraram que a exposição crônica ao Cu^{2+} aumentou a atividade da Na^+K^+ -ATPase branquial, implicando em um maior custo energético para a osmorregulação. Pelgrom et al. (1995) expuseram exemplares de *Oreochromis mossambicus* a 50, 100, 200 μg Cu/ L e observaram um aumento no número de células de cloreto conforme se aumentava a concentração do metal. Neste estudo também foi observado um diâmetro aumentado destas células e um aumento das concentrações de cobre nas brânquias e no plasma. Além

disso, vários estudos mostram que altos níveis de cobre diminuem o crescimento e prejudicam a conversão alimentar em peixes (Marr et al., 1996; Schlenk & Benson, 2001).

O cobre pode se oxidar $\text{Cu(I)} \leftrightarrow \text{Cu(II)}$ e assim doar elétrons, por exemplo, ao peróxido de hidrogênio via reação de Fenton, produzindo radicais livres que podem vir a danificar a célula (figura 2) (Camakaris et al., 1999; Ho, 2004).



Figura 2- Cobre doando elétrons ao peróxido de hidrogênio, via reação de Fenton, produzindo radicais livres.

Em geral, os organismos, incluindo peixes, têm desenvolvido uma variedade de mecanismos para se protegerem dos efeitos tóxicos de metais essenciais e não-essenciais, bem como, de outros xenobióticos (Siraj Basha & Usha Rani, 2003).

3.3 Piava (*Leporinus* sp.)

O gênero *Leporinus* inclui peixes conhecidos popularmente como piava, piapara e piau (Santos, 2000). Este gênero está amplamente distribuído na Colômbia, Guianas, Amazônia e rios Araguaia, São Francisco, Paraguai, Paraná, Grande, Pardo, Parnaíba, Tietê, Mogi-Guaçu, da Prata e Uruguai (Nomura, 1984; Godoy, 1987). A piava é um peixe nativo que pertence à família dos Anostomídeos e abrange um grande número de espécies. As espécies do gênero *Leporinus* são essencialmente onívoras alimentando-se de vegetais, insetos e briozoários. Elas apresentam um grande potencial para a pesca, pois atingem um porte de médio a grande e um bom valor comercial em virtude da palatabilidade de sua carne (Nomura, 1984; Andrian et al., 1994; Mello et al., 1999; Santos, 2000).

Dias Júnior & Mourgués- Schurter (2001) avaliaram o comportamento alimentar de *Leporinus obtusidens* em cativeiro e observaram que esta espécie alimenta-se

em todos os horários de fornecimento da ração (10, 14, 22, 24 horas), sendo que nenhuma diferença foi observada entre os períodos claro e escuro do dia. Este trabalho demonstra que esta espécie mantém seu consumo de alimentos independente do horário de fornecimento da ração, podendo ser alimentada a qualquer hora do dia, adaptando-se bem às condições de cativeiro. Acrescenta ainda, que o alimento é apanhado pelos peixes a qualquer altura da coluna de água, inclusive no fundo. Além disso, o comportamento observado nesta espécie demonstra que houve formação de hierarquia logo após o fornecimento da ração.

A sobrevivência de uma espécie está diretamente relacionada com a fecundidade, sendo que a determinação desta fornece informações a respeito do potencial reprodutivo. Souza et al. (2001) determinaram a fecundidade de *Leporinus copelandii* (piauí-vermelho), já que esta espécie tem sido pouco encontrada em ambientes naturais em consequência da pesca predatória e também devido à poluição que prejudica a qualidade das águas, devido às suas alterações físicas, químicas e biológicas. Os peixes em estudo foram coletados no rio Paraíba do Sul-RJ, de acordo com o período reprodutivo. Neste trabalho foi estimado que o valor da fecundidade absoluta média era de 17343 ± 7607 ovócitos e que esta apresentou relação linear com o peso das gônadas e o peso total das fêmeas, sendo que, a relação foi melhor obtida com o peso das gônadas.

No Brasil, poucos estudos avaliaram os efeitos de metais em peixes, principalmente em espécies nativas como as piavas.

3.4 Acetilcolinesterase (AChE, EC. 3.1.1.7)

O estudo de parâmetros bioquímicos, tais como a medida da atividade de enzimas, reflete as condições funcionais da célula, tecidos e órgãos, e no caso de exposições a compostos tóxicos, as possíveis alterações causadas por estes.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima que tem sido usada como um biomarcador, indicando estresse em organismos não alvos como peixes, pela presença de agentes tóxicos, como metais (Nemcsók et al., 1984; de la Torre et

al., 2000; Fernández-Vega et al., 2002; Lionetto et al., 2003). A AChE é uma classe de serina hidrolase que catalisa a hidrólise da acetilcolina, envolvida na neurotransmissão colinérgica do tecido nervoso e muscular (Voet et al., 2000; Romani et al., 2003). Em vertebrados, as colinesterases são classificadas como acetilcolinesterases (AChE, EC. 3.1.1.7) e butirilcolinesterases (BuChE, EC 3.1.1.8) com base no substrato específico e sensibilidade a agentes inibidores (Massoulié et al., 1993; Chuiko, 2000). A importância em se estudar esta enzima se deve ao fato de que o sistema nervoso é um dos tecidos mais vulneráveis do organismo, e que quando danificado pode provocar anormalidades comportamentais, afetando até mesmo a sobrevivência de peixes (de la Torre et al., 2000).

Nemcsók et al. (1984) estudaram a atividade da AChE em cérebro, coração, músculo e soro de *Cyprinus carpio* L. expostos a 1, 10 e 50 ppm de cloreto de zinco e sulfato de cobre. Os peixes expostos ao cloreto de zinco não demonstraram alterações na atividade da AChE. Porém, aqueles expostos ao sulfato de cobre demonstraram inibição na atividade desta enzima. Por outro lado, Romani et al. (2003) também observaram mudanças na atividade da AChE nos tecidos cerebrais e musculares de *Sparus auratus* após 20 dias de exposição a concentrações subletais de cobre (100 e 500 µg/L). Porém, este estudo demonstrou que a exposição ao cobre conduziu a um aumento da atividade específica da AChE, melhorando a eficiência catalítica. Este resultado foi confirmado por ensaios “in vitro”. Em *Cyprinus carpio* expostos a 1.6 mg/L de cádmio, de la Torre et al. (2000) demonstraram que a atividade da AChE cerebral não variou significativamente durante os 14 dias de experimento. Além destes estudos, Lionetto et al. (2003) avaliaram a atividade da AChE em organismos marinhos, tentando verificar suas alterações pela ação de diferentes agentes químicos, tais como metais pesados e pesticidas. A espécie de peixe estudada, *Mullus barbatus*, apresentou inibição na atividade da AChE no cérebro dos peixes coletados próximos a áreas urbanas, provavelmente pela presença de metais pesados.

As exposições a diferentes herbicidas, inseticidas e pesticidas também inibiram a atividade da AChE em cérebro, músculo e brânquias em diversos estudos com

peixes, sendo que, esta inibição pode resultar em excessiva estimulação dos nervos colinérgicos. Os animais expostos apresentaram sinais de tumores, letargia, decréscimo do movimento, aumento do ritmo respiratório, aumento da amplitude opercular e convulsões (Cerón et al., 1996; Sancho et al., 1997; Fernández-Vega et al., 2002).

3.5 δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D, EC. 4.2.1.24)

A delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) é uma importante enzima citoplasmática também conhecida como porfobilinogênio sintase ou 5-aminolevulinato hidrolase. Esta enzima catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico com perda de duas moléculas de água para formar o composto porfobilinogênio (Jaffe, 1995). A reação catalisada pela δ -ALA-D faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes). A grande importância destes compostos reside na sua função como grupos prostéticos de proteínas. O heme, por exemplo, faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), transporte de elétrons (citocromos a, b e c), biotransformação de xenobióticos (citocromo P₄₅₀) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases) (Timbrell, 1991).

A enzima δ -ALA-D requer um íon metálico bivalente para estar ativa, sendo que a δ -ALA-D presente em tecidos animais é uma enzima dependente de zinco. A δ -ALA-D, independente de sua fonte, é uma enzima de natureza sulfidrílica (Finelli et al., 1974; Bevan et al., 1980), sendo, portanto, inibida por agentes bloqueadores de grupos tiólicos, como metais pesados tais como chumbo, cobre e mercúrio, os quais possuem elevada afinidade por grupamentos sulfidrílicos, podendo oxidá-los. (Finelli et al., 1975; Rodrigues et al., 1989; Rocha et al., 1995; Emanuelli et al., 1996). Esta enzima está amplamente distribuída, sendo encontrada no fígado, cérebro, rim e células eritrocitárias. Sua atividade tem sido utilizada como um biomarcador para

indicar exposição a metais em peixes (Conner et al., 1994; Burden et al., 1998; Campana et al., 2003).

A importância em se estudar esta enzima deve-se ao fato de sua inibição poder prejudicar a rota biossintética do heme, resultando em conseqüências patológicas (Sassa et al., 1989). Além da insuficiente produção de heme, a inibição da δ -ALA-D pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, com conseqüente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA está relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (Monteiro et al., 1989; Bechara et al., 1993).

Burden et al. (1998) avaliaram a atividade da δ -ALA-D sangüínea em peixes juvenis de *Oncorhynchus mykiss* expostos ao chumbo durante 29 dias, e observaram um decréscimo significativo em sua atividade. Além disso, Campana et al. (2003) observaram os efeitos do chumbo em fígado e rim de *Halobatrachus didactylus*, sendo que nenhuma alteração foi observada na atividade da δ -ALA-D.

3.6 Peroxidação lipídica e sistema antioxidante

Diversas classes de poluentes, incluindo metais, são conhecidas por acentuar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Organismos aquáticos, como peixes, têm desenvolvido uma variedade de mecanismos para se protegerem dos efeitos tóxicos de metais, já que estes podem vir a causar estresse oxidativo, prejudicando a saúde e a sobrevivência dos mesmos (Almeida et al., 2002; Lionetto et al., 2003; Oakes & Van Der Kraak, 2003; Siraj Basha & Usha Rani, 2003; Dautremepuits et al., 2004).

Metais podem alterar a estrutura de membranas celulares por estimulação do processo de peroxidação lipídica, uma complexa seqüência de reações bioquímicas, amplamente definidas como uma deterioração oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados (Viarengo, 1989). A peroxidação lipídica resulta na produção de radicais lipídicos e na formação de uma mistura complexa de produtos de degradação lipídica, como o malondialdeído e outros aldeídos. A concentração de

malondialeído é um dos mais freqüentes indicadores de peroxidação lipídica (Nielsen et al., 1997; Roméo et al., 2000; Stehbens, 2003).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) incluem os radicais hidroxil ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) (Matés, 2000; Stehbens, 2003). ERO são produzidas durante a função celular normal em baixas proporções, mas, quando organismos são expostos a compostos tóxicos, as ERO são produzidas em maior quantidade (Matés, 2000; Almeida et al., 2002; Stehbens, 2003; Dautremepuits et al., 2004). Desse modo, danos celulares podem acontecer pelo fato do sistema antioxidante não conseguir combater totalmente as espécies reativas de oxigênio. No metabolismo de células aeróbicas, a geração de ERO é derivada das reações de transferência de elétrons na mitocôndria e retículo endoplasmático (Stehbens, 2003). O cérebro é especialmente suscetível aos danos oxidativos, devido às altas taxas de produção de ERO associadas ao elevado metabolismo oxidativo, a abundância de ácidos graxos insaturados na membrana celular e à relativamente menor capacidade antioxidante (Matés, 2000).

Para proteger o organismo, órgãos como o fígado e o rim são dotados de defesas celulares como as enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), que atuam contra a toxicidade originada por formas ativas de oxigênio. A SOD tem por função transformar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. A partir desta reação, a catalase atua decompondo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, que são produtos não tóxicos à célula (Roméo et al., 2000; Siraj Basha & Usha Rani, 2003; Ho, 2004; Avci et al., 2005) (figura3).

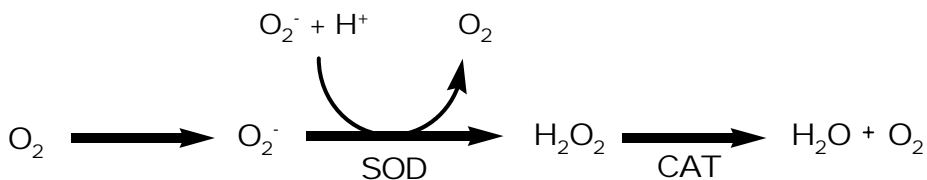


Figura 3- Catalase decompondo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

A catalase é uma enzima citosólica que protege a célula contra espécies reativas de oxigênio, sendo que uma alta atividade normalmente indica estresse, devido, por exemplo, a exposições a compostos químicos (Roméo et al., 2000; Lionetto et al., 2003; Siraj Basha & Usha Rani, 2003). Variações na atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, bem como níveis de peroxidação lipídica, têm sido avaliados em diversos estudos com peixes (Paris-Palacios et al., 2000; Almeida et al., 2002; Siraj Basha & Usha Rani, 2003; Dautremepuits et al., 2004; Sanchez et al., 2004; Avci et al., 2005). Estes trabalhos demonstram a importância da catalase na manutenção da integridade celular, atuando contra o estresse oxidativo.

A espécie *Brachydanio rerio* exposta ao cobre por 14 dias demonstrou um aumento na atividade da catalase no fígado. Mesmo após os 14 dias de depuração em água limpa, a atividade da catalase continuou aumentando (Paris-Palacios et al., 2000). Roméo et al. (2000), em um experimento de intoxicação com cobre e cádmio, observaram a redução na atividade da catalase no rim de peixes expostos ao cádmio. Já o cobre não demonstrou efeitos significativos na atividade enzimática. Neste estudo também foi medida a concentração de MDA no rim, tendo sido observado um aumento significativo em sua concentração nos peixes expostos ao cobre. Por sua vez, o cádmio pareceu ter menos efeito na lipoperoxidação. Siraj Basha & Usha Rani (2003) avaliaram a atividade da catalase em fígado e rim de *Oreochromis niloticus* expostos a concentração subletal de cádmio (5 mg/L) durante 7, 15 e 30 dias de exposição. Neste estudo foi verificado um aumento na atividade da catalase, sendo que no 15º dia de exposição, a atividade enzimática aumentou em 82,18 % no fígado e 78,63 % no rim.

3.7 Parâmetros hematológicos

O estudo dos efeitos subletais de compostos químicos nos parâmetros hematológicos, atividade de enzimas e metabólicos intermediários pode revelar a saúde dos peixes no ambiente e estes parâmetros também podem ser utilizados

para diagnosticar um possível impacto ambiental (Whitfield & Elliott, 2002; Aguiar et al., 2004). Mudanças fisiológicas podem alterar o sistema imune trazendo como consequência algumas doenças. Então, a avaliação de parâmetros de células sanguíneas pode ser de grande importância para monitorar a saúde dos peixes (Espelid et al., 1996; Barcellos et al., 2004).

Alterações das células sanguíneas e do estado hormonal em peixes podem ser indicativos de condições ambientais inadequadas (temperatura, pH, concentração de oxigênio) ou também devido a presença de fatores estressantes. Dentre estes fatores, pode-se citar os compostos tóxicos, o excesso de componentes orgânicos na água e, até mesmo procedimentos inadequados em cultivos, tal como, o modo de transporte e transferência de peixes (Barcellos et al., 2004). Um aumento da atenção tem sido dado ao sistema imune de peixes como um biomarcador de exposição a poluentes (Roméo et al., 2000).

3.8 Acumulação de metais

Metais são continuamente liberados em ecossistemas aquáticos, devido às atividades antropogênicas e processos naturais, sendo considerados uma séria ameaça ecológica por causa de sua toxicidade, longa persistência e acumulação na cadeia alimentar (Bordajandi et al., 2003; Papagiannis et al., 2004). Diferenças na acumulação de metais dependem da sua biodisponibilidade, seu metabolismo e sua eliminação pelo organismo alvo (Deviller et al., 2005). Peixes podem acumular grandes quantidades de metais em seus tecidos, já que são geralmente considerados o topo da cadeia alimentar aquática (Barak & Manson, 1990; Mansour & Sidky, 2002). A absorção de metais, como cobre e zinco, pode se dar através das brânquias, mas estes também podem ser absorvidos pelo trato gastrintestinal e revestimento epitelial (Watanabe et al., 1997; Schlenk & Benson, 2001).

Em seu estudo, Barak & Manson (1990) coletaram cinco espécies de peixes em um rio no leste da Inglaterra e avaliaram as concentrações de mercúrio, cádmio e chumbo no fígado e músculo destas espécies. Os níveis de mercúrio no músculo

de todas as espécies foram duas vezes maiores que no fígado, mas para cádmio e chumbo, os níveis foram maiores no fígado que no músculo, sendo que as concentrações dos metais variaram entre as espécies. Bordajandi et al. (2003) analisaram a presença de zinco, cobre, cádmio, chumbo em músculo de *Salmo trutta* capturadas no rio Turia (Espanha), sendo que zinco e cobre apresentaram-se em níveis significativos nas amostras e o zinco foi o metal que se apresentou com maiores concentrações seguido pelo cobre. Em um estudo no lago Pamvotis (Grécia), Papagiannis et al. (2004) coletaram quatro espécies de peixes e analisaram as concentrações de cobre e zinco no fígado, músculo e gônadas. Estes tecidos apresentaram concentrações significativas dos metais, sendo que o fígado apresentou maior acumulação seguido por gônadas e músculo. As diferenças observadas nas concentrações dos metais nas diferentes espécies foram devido à presença de algumas variáveis como habitat, variações sazonais e afinidade individual para absorção do metal.

McGeer et al. (2000) verificaram a acumulação de cádmio (3 µg/L), cobre (75 µg/L) e zinco (250 µg/L) em tecidos de rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) em um experimento de exposição crônica (100 dias). Neste estudo foi observado uma significativa acumulação dos metais nas brânquias, fígado e rim dos peixes expostos quando comparados aos controles. Já Romani et al. (2003), expuseram a espécie *Sparus auratus* a concentrações subletais de cobre (100 e 500 µg/L) e após 20 dias de exposição não verificou acumulação do metal nos tecidos cerebral e muscular em nenhuma das concentrações testadas.

A concentração corporal de metais em diferentes organismos, como peixes, pode propiciar importantes informações principalmente se uma clara relação existir entre acumulação de metais e os efeitos tóxicos dos mesmos (Borgmann, 2000).

4. MANUSCRITOS

4.1 Manuscrito 1

**Exposure to sublethal concentrations of Zn (II) and Cu (II)
changes biochemistry parameters in *Leporinus* sp.
(ANOSTOMIDAE)**

Gioda, C.R., Lissner, L.A., Pretto, A., Lazzari, R., da Rocha, J.B.T., Schetinger, M.R.C., Neto, J. R., Vieira, V.L.P.

Author for correspondence:

Vania Lucia Pimentel Vieira

Department of Chemistry

Federal University of Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil

Phone: 55 55 - 3220 - 8053

e-mail: vanial@smail.ufsm.br

vaniluc@yahoo.com.br

Abstract

The aim of the present study was to verify zinc and copper toxicity on biochemical parameters as δ -ALA-D and catalase activity, TBARS levels and hematological parameters in *Leporinus* sp. Fish were exposed to different levels of waterborne zinc and copper for LC₅₀ determination. After this, groups were exposed for 30 and 45 days to 10 and 20% of the LC₅₀ that correspond to 2.3 and 4.6 mg/L (zinc) and 0.02 and 0.04 mg/L (copper). Exposure to copper and zinc decreased hematological parameters (hematocrit, hemoglobin, erythrocytes) and also δ -ALA-D activity mainly in liver and kidney in all times and concentrations tested. Liver catalase activity increased after zinc or copper exposure at both concentrations and exposure times tested. Thiobarbituric reactive substances (TBARS) increased in the brain and liver of fish exposed to zinc for 45 days at both metal concentrations. In muscle, it did at both exposure times and concentrations tested. Copper exposure reduced the TBARS levels in liver at both concentrations and time of exposure tested. In brain, there was a decreased in TBARS levels only after 45 days of exposure. In muscle, this decreased was observed after 30 days of exposure at both concentrations. Although zinc and copper are required as cells microelements, our results showed that sublethal concentrations of these metals can change biochemistry parameters altering normal cellular function.

Keywords: δ -ALA-D; Catalase; Copper; *Leporinus* sp.; Hematological parameters; TBARS; Zinc;

1. Introduction

Copper and zinc play an important role in cellular metabolism, as enzymatic cofactors and prosthetic group of proteins, but can become toxic when elevated concentrations are introduced into the environment (Marr et al., 1996; Karan et al., 1998). The aquatic environment is continuously contaminated with chemicals from agriculture and urban activities. Chronic exposure to waterborne ions Cu, Cd or Zn have been shown to cause a variety of behavioral, biochemical and physiological changes including loss of appetite, reduced growth, ions loss, decreased aerobic scope and mortality (Pelgrom et al., 1995; McGeer et al., 2000; Handy, 2003; Sloman et al., 2003).

Fish blood is sensitive to pollution-induced to cause stress and changes on the hematological parameters, such as hemoglobin content, hematocrit and erythrocytes number. These parameters can be used to study toxicity of heavy metals (Romani et al., 2003; Barcellos et al., 2004). Several biochemical and physiological responses can occur when aquatic organisms absorb a toxicant, which may be a compensatory response or a toxicity mechanism (Begum, 2004).

The second enzyme involved in the synthesis of heme, delta-aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D; EC. 4.2.1.2.24), is a sulfhydryl-containing enzyme, which condenses two molecules of aminolevulinic acid (ALA) to form porphobilinogen (PBG), a hemoglobin precursor (Jaffe et al., 1995; Jaffe et al., 2000). δ -ALA-D of vertebrates is inhibited by lead, copper, mercury and by high mM concentrations of Zn(II), and can also be sensitive to situations associated with oxidative stress (Rodrigues et al., 1989; Rocha et al., 1995; Soares et al., 2005).

Literature data indicate that exposure of aquatic organism to metals can lead to a state of oxidative stress (Roméo et al., 2000; Siraj Basha & Usha Rani, 2003; Dautremepuits et al., 2004) and that can be evaluated measuring antioxidant enzymes (catalase, SOD, GPx) or by determining thiobarbituric reactive species (TBARS) (Nielsen, et al., 1997; Oakes et al., 2003). In line with this, malondialdehyde (MDA), an important derivative of unsaturated fatty acids lipoperoxidation, react with

thiobarbituric acid (TBA) yielding a colored intermediate that is popularly used to quantify lipoperoxidation (Ahmad et al. 2000; Oakes et al., 2003). Lipid peroxidation (LPO) induced by pollutant such as metals has been observed in several fish species (Ahmad et al. 2000; Campana et al., 2003).

Particularly in piavas, *Leporinus* sp. (Anostomidae), to the best of our knowledge there is no reports on biochemical response of exposure to these metals. Considering that piavas are economically important species of Southern Brazil, the aim of this study was to investigate possible effects of sublethal concentrations copper and zinc in *Leporinus* sp., through measurement of some biochemical and hematological parameters.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Juvenile of *Leporinus* sp. of both sexes were obtained from aquaculture sector of University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil. Fish (111.6 ± 18.9 g and 20.5 ± 2 cm) were acclimated to laboratory conditions for 10 days. They were kept in tanks (250 L) under a natural photoperiod (12 h light-12 h dark). The water was constantly aerated in a static system. Fish were fed in excess once a day (10:00 h) with commercial fish food (42% crude protein, Supra, Brazil). Feces and pellets residues were removed daily by suction.

2.2. Exposures to Zn(II) and Cu(II)

2.2.1. LC₅₀ determination- 96h

After acclimation groups of 6 fishes in replicate were transferred to 45-liter boxes for LC₅₀ determination. The LC₅₀ (96-h) obtained for zinc was 23.4 mg/L and for copper was 0.2 mg/L. During experimental period, water parameters were: temperature 20.2 ± 0.8 °C, pH 7.3 ± 0.5 , dissolved oxygen 5.3 ± 0.25 mg/L, non-

ionized ammonia $7 \pm 0.1 \mu\text{g/L}$, nitrite $0.084 \pm 0.004 \text{ mg/L}$, hardness $22 \pm 2 \text{ mg/L CaCO}_3$ and alkalinity $42.3 \pm 2.5 \text{ mg/L CaCO}_3$.

2.3. Experimental design

Subsequently, groups of 14 fish per box (two replicates) were exposed to a concentration of 10 and 20% of LC_{50} to Zn (2.3 and 4.6 mg/L) and Cu (0.02 and 0.04 mg/L) for 30 and 45 days of exposure. For each metal concentration 14 fish per box were used as a control (same conditions without metal) and sampled at each time. Metals were added daily to replace those removed during the suction of feces and pellets residues. There was not mortality throughout the experimental period. Physico-chemical characteristics of water were as follows: temperature $20.8 \pm 0.6 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.45 ± 0.2 , dissolved oxygen $5.3 \pm 0.2 \text{ mg/L}$, non-ionized ammonia $5 \pm 0.09 \mu\text{g/L}$, nitrite $0.043 \pm 0.006 \text{ mg/L}$, hardness $27.2 \pm 3.3 \text{ mg/L CaCO}_3$ and alkalinity $41.9 \pm 1.5 \text{ mg/L CaCO}_3$. Water quality did not change throughout the experimental period.

2.4. Analytical procedures

At the end of the exposure period (30 and 45 days) fish were killed and brain, muscle, liver, kidney and blood tissues were removed for determination of hematological parameters, TBARS and enzymes activities. Chemicals used were of the highest analytical grade and measurements were made in triplicate.

2.4.1. δ -ALA-D

Fish tissues were removed, maintained at $4 \text{ }^\circ\text{C}$, and homogenized in 150mM NaCl at proportion (g tissue/mL saline) of 1:7 (liver), 1:3 (brain, muscle, blood) and 1:5 (kidney). The homogenate was centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ and supernatant was used for enzyme assay. δ -ALA-D activity was assayed by the

modified method of Sassa (1989) by measuring the rate of product formation (porphobilinogen) except that 100-mmol/L-phosphate buffer (pH 6.8) and 2.5 mmol/L ALA were used. The reaction was started 10 minutes after the addition of the enzyme preparation by adding the substrate. Incubations were carried out for 1 hour and 30 minutes at 39°C. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of $6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for Ehrlich porphobilinogen salt. The reaction was stopped by adding 10% TCA (with 10mM HgCl_2). Protein was determined according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

2.4.2. Catalase

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometry (Nelson and Kiesov, 1972). Liver samples were homogenized in Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20mM potassium phosphate buffer pH 7.5, centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4°C. The assay mixture consisted of 2.0 mL potassium phosphate buffer (50mM, pH 7.0), 0.05mL H_2O_2 (0.3M) and 0.05 mL homogenate. Change of absorbance in 60 s was measured at 240nm using a HITACHI spectrophotometer. Protein was determined according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard. Catalase activity was calculated in terms of $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ protein.

2.4.3. TBARS levels

Malondialdehyde (MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA), which was optically measured was performed. Tissues samples (brain, liver and muscle) were prepared as reported to catalase assay and brain and muscle were homogenized in NaCl 150mM. Homogenate quantities were: 0.01mL - 0.04mL were added to 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5M acetic acid (pH 3.4), 0.8% thiobarbituric acid and distilled water was added to adjust final volume to 2.0mL. The reaction mixture was

incubated for 90 minutes at 95° C. Then tubes were centrifuged at 5000 x g for 10 min and optical density at 532nm determined. TBARS levels are expressed as nmol MDA per mg protein according to Janero et al. (1990) and Ohkawa et al. (1979). Protein was determined according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

2.5. Statistical analysis

The mean lethal concentration (LC₅₀) for 96 hours was calculated using probit analysis as described by Finney (1971). The ALA-D and catalase activities and TBARS levels data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey-Kramer test and expressed as mean ± standard error (n= 8). The differences were considered to be significant at a probability level of (P< 0.01) between treatments and controls.

3. Results

The LC₅₀ was 23.6 mg/L for zinc and 0.2 mg/L for copper. After groups of 14 fish per box (two replicates) were exposed to a concentration of 10 and 20% of LC₅₀ to Zn(II) (2.3 and 4.6 mg/L) and Cu(II) (0.02 and 0.04 mg/L) for 30 and 45 days of exposure. TBARS levels decreased in the brain of fish exposed to zinc for 30 days when compared to control. In contrast, brain TBARS levels of fish exposed for 45 days to zinc increased significantly when compared to control animals (table 1A). TBARS levels in the brain of fish exposed to Cu(II) increased after 30 days and after 45 days decreased significantly at both concentrations compared to control (table 1B). In liver, zinc exposure at the concentration of 4.6 mg/L caused a significant increase in TBARS levels and at 2.3 mg/L concentration it did not change in relation to control for 30 days. Exposure to Zn(II) for 45 days caused a significant increase in hepatic TBARS level at 2.3 mg/L and 4.6 mg/L (table 1A). On the other hand, copper exposure for 30 and 45 days decreased significantly hepatic TBARS levels at both

concentrations (table 1B). For muscle, zinc exposure for 30 and 45 days increased significantly TBARS levels in relation to the control for both concentrations (table 1A). However, copper exposure for 30 and 45 days decreased these levels in muscle at both concentrations and respective durations, except for 0.04 mg/L after 45 days exposure (table 1B). The catalase activity in the liver increased significantly after zinc (figure 1A) and copper exposure (figure 1B) at both concentrations when compared to controls.

Exposure to Zn(II) and Cu(II) concentrations after 45 days produced a decrease in hematocrit, hemoglobin and erythrocytes number (table 2).

δ -ALA-D activity in liver and kidney were decreased for *Leporinus* sp. exposed to zinc (figures 2, 3). Similar results were found in brain, except for 4.6 mg/L concentration in 30 days experiment (figure 4). In muscle, zinc exposure to 4.6 mg/L for 30 days caused a significant increase in δ -ALA-D activity. In the same way, exposure to 2.3 mg/L for 45 days promoted an increase in enzyme activity. However, the period of 45 days exposure to 4.6 mg/L caused an inhibition of muscle δ -ALA-D (figure 5). Liver, kidney and muscle δ -ALA-D activity was significantly decreased after exposure to 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days of exposure (figures 2, 3, 5). In contrast, the brain δ -ALA-D was little modified by exposure to Cu(II), excepting exposure to the concentration of 0.02 mg/L (45 days) where a significant increase in enzyme activity was observed (figure 4).

Table1- Zinc (1A) and copper (1B) effects in TBARS levels (nmol MDA/mg protein) in brain, liver and muscle of *Leporinus* sp. exposed for 30 and 45 days. Data are reported as mean \pm SD (n= 8). * in line indicate significant difference from control (P< 0.01).

1A

	0	2.3 mg/L	4.6 mg/L
Brain			
30 days	8.1 \pm 0.46	7.1 \pm 0.29*	7.2 \pm 0.20*
45 days	7.8 \pm 0.29	15 \pm 0.16*	12 \pm 0.43*
Liver			
30 days	3.2 \pm 0.25	3.3 \pm 0.13	8.8 \pm 0.70*
45 days	3.5 \pm 0.21	4.2 \pm 0.16*	4.4 \pm 0.26*
Muscle			
30 days	1.2 \pm 0.07	1.9 \pm 0.09*	2.4 \pm 0.06*
45 days	1.4 \pm 0.04	1.8 \pm 0.07*	2.4 \pm 0.08*

1B

	0	0.02 mg/L	0.04 mg/L
Brain			
30 days	7.4 \pm 0.26	11.2 \pm 0.79*	16.4 \pm 0.32*
45 days	7.8 \pm 0.32	5.8 \pm 0.24*	5.4 \pm 0.20*
Liver			
30 days	3.7 \pm 0.25	1.7 \pm 0.24*	2.2 \pm 0.26*
45 days	3.5 \pm 0.26	1.7 \pm 0.13*	1.8 \pm 0.15*
Muscle			
30 days	1.4 \pm 0.15	0.8 \pm 0.16*	0.8 \pm 0.10*
45 days	1.2 \pm 0.10	0.8 \pm 0.11*	1.9 \pm 0.20*

Table 2- Hematological parameters of *Leporinus* sp. after zinc(II) and copper(II) exposure for 45 days. Data represent the mean \pm SD (n= 8). * indicates difference between groups and control values (P< 0.01).

Hematological Parameters	Control	Zinc (II) (mg/L)		Copper (II) (mg/L)	
		2.3	4.6	0.02	0.04
Hematocrit (%)	28.0 \pm 2	23.0 \pm 0.5*	24.0 \pm 0.4*	23.0 \pm 0.5*	24.0 \pm 0.6*
Hemoglobin (g/dL)	10 \pm 0.4	8.7 \pm 0.3*	9.3 \pm 0.5*	9.8 \pm 0.3*	9.8 \pm 0.3*
Erythrocytes (x10 ⁶ /mm ³)	1.9 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1*	1.8 \pm 0.1*	1.8 \pm 0.1*	1.77 \pm 0.05*
Leukocytes (x10 ³ /mm ³)	127.0 \pm 1.3	125.0 \pm 3.3	124.0 \pm 1.1	126.0 \pm 1.0	125.0 \pm 1.5

Figure 1- Catalase activity (E/min/mg of protein) in liver of *Leporinus* sp. exposed to 0.0, 2.3 and 4.6 mg/L of Zn(II) and 0.0, 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days experiment. Data are reported as mean \pm SD (n= 8). * indicate significant difference from control (P< 0.01).

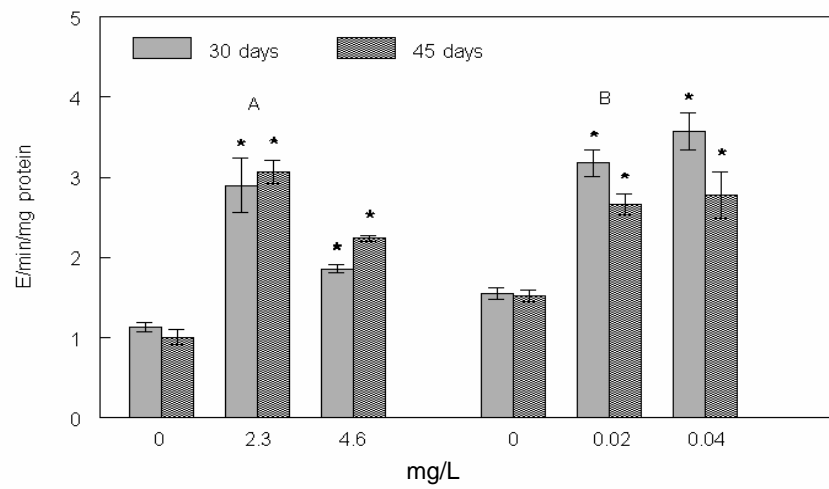


Figure 2- Zinc and copper effects on δ - aminolevulinic acid dehidratase (δ -ALA-D) activity (nmol PBG mg tissue⁻¹ h⁻¹) in liver of *Leporinus* sp. exposed to 0.0, 2.3 and 4.6 mg/L of Zn(II) and 0.0, 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days. Data are reported as mean \pm SD (n= 8). * indicate significant difference from control (P< 0.01).

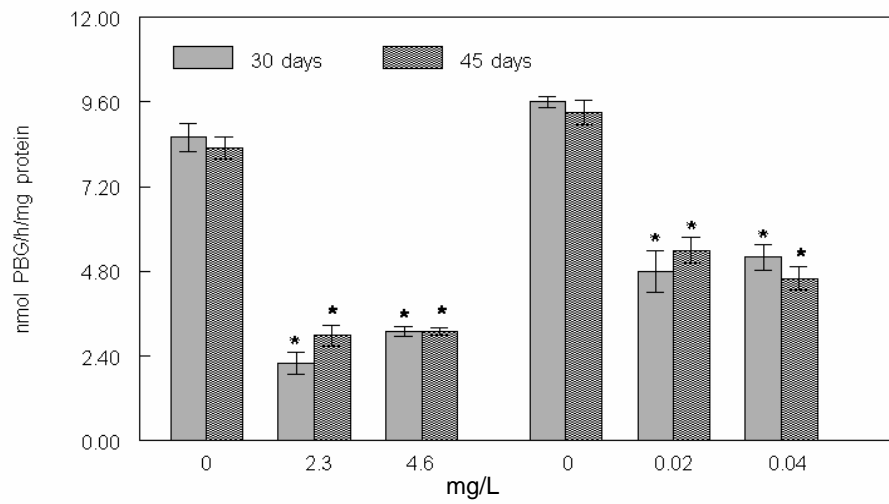


Figure 3- Zinc and copper effects on δ - aminolevulinic acid dehidratase (δ -ALA-D) activity (nmol PBG mg tissue⁻¹ h⁻¹) in kidney of *Leporinus* sp. exposed to 0.0, 2.3 and 4.6 mg/L of Zn(II) and 0.0, 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days. Data are reported as mean \pm SD (n= 8). * indicate significant difference from control (P< 0.01).

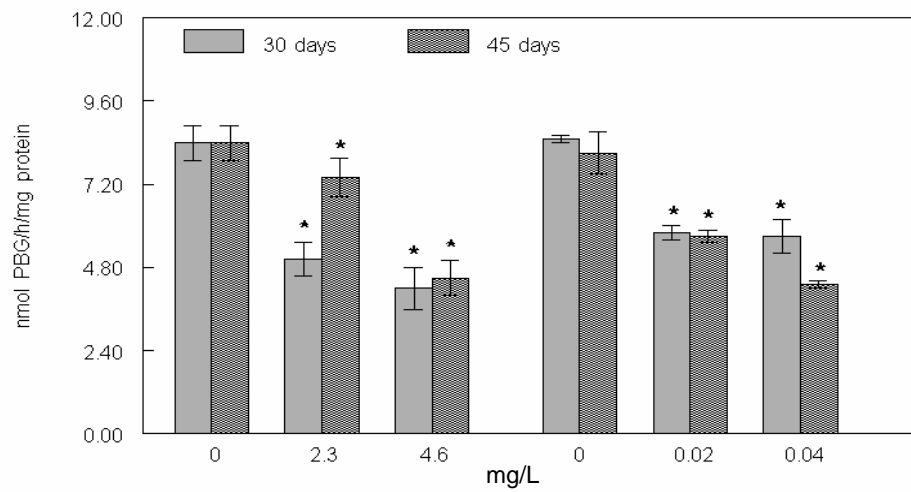


Figure 4- Zinc and copper effect on δ - aminolevulinic acid dehidratase (δ -ALA-D) activity (nmol PBG mg tissue⁻¹ h⁻¹) in brain of *Leporinus* sp. exposed to 0.0, 2.3 and 4.6 mg/L of Zn(II) and 0.0, 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days. Data are reported as mean \pm SD (n= 8). * indicate significant difference from control (P< 0.01).

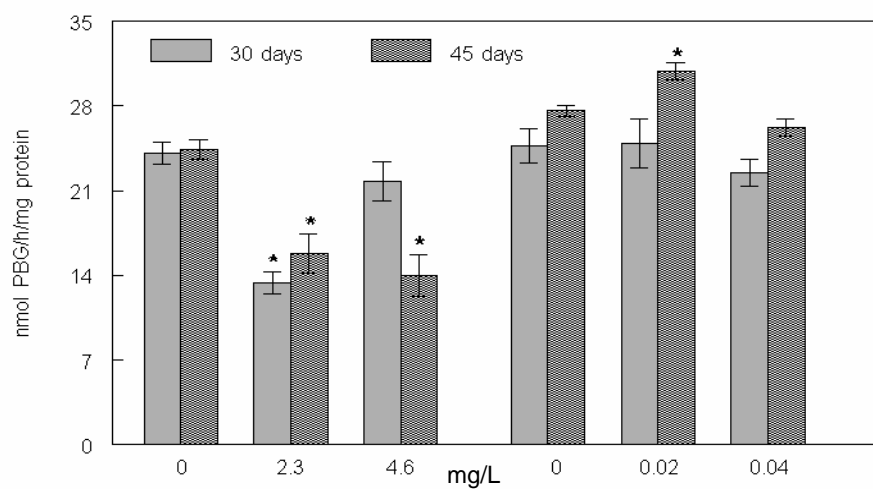
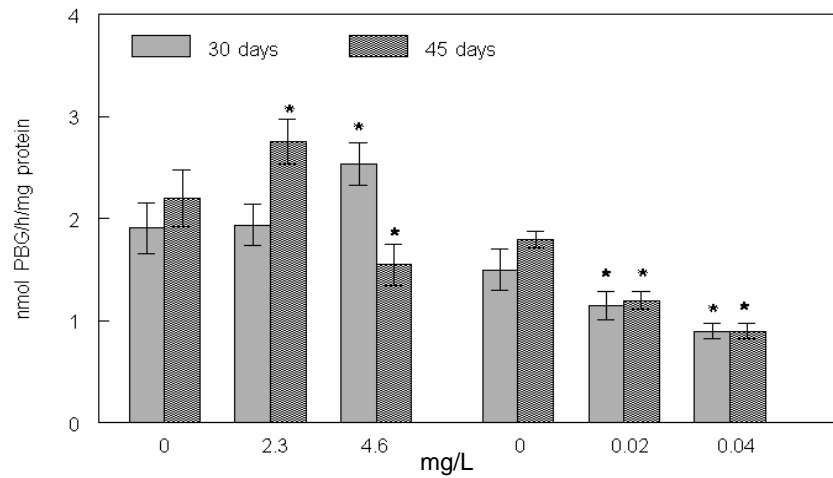


Figure 5 - Zinc and copper effects on δ - aminolevulinic acid dehidratase (δ -ALA-D) activity (nmol PBG mg tissue⁻¹ h⁻¹) in muscle of *Leporinus* sp. exposed to 0.0, 2.3 and 4.6 mg/L of Zn(II) and 0.0, 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days. Data are reported as mean \pm SD (n= 8). * indicate significant difference from control (P< 0.01).



4. Discussion

The results of the present investigation clearly indicated that exposure of fishes to sublethal concentrations of this metal cause a significant increase in oxygen reactive species in liver. However, the probable effects of this increased in TBARS levels varied depending on the time of exposure, the tissue considered and the metal. In fact, the exposure to Zn(II) for 30 days cause a small, but significant decrease in brain TBARS contents, whereas in liver and muscle the increase in TBARS levels were dependent on the concentration and time of exposure. In fact, consistent increase in TBARS levels were observed only at the highest concentration studied (4.6 mg/L). These results clearly indicate that prolonged exposure to sublethal concentrations of zinc is associated with oxidative stress in *Leporinus* sp.. Further support for the participation of oxidative stress on zinc toxicity was observed by a significant increase in liver catalase activity, which may be a compensatory response to the pro-oxidative state induced by zinc.

As a role, exposure to Zn(II) caused a significant reduction in hepatic, renal and cerebral δ -ALA-D activity in fishes exposed to zinc. δ -ALA-D is an enzyme fundamental for heme biosynthesis and its inhibition by zinc can be related to the decrease in hematocrit, hemoglobin and erythrocyte showed that fish exposed demonstrate signs of anemia. These results indicate that δ -ALA-D can be considered an indicator of oxidative stress. In fact, due to its sulfhydryl nature, the enzyme is sensitive to a variety of in vivo situations associated with oxidative stress (Campana et al., 2003; Soares et al., 2005). The inhibition of δ -ALA-D can produce an increase in its substrate, the aminulevulinic acid, which is now accepted as a pro-oxidant compound (Bechara et al., 1993). Thus, the inhibition of this enzyme can contribute to further aggravate the pro-oxidative state created by Zn(II). Furthermore, the mammalian enzyme can be inhibited by high concentrations of Zn(II) (Rodrigues et al., 1989, Rocha et al., 1995). Data about the effect of Zn(II) on fish δ -ALA-D are scarce in the literature and there is a report that indicates that fish δ -ALA-D is not allosterically activated by zinc (Conner et al., 1994). However, these results are very

intriguing if one considers the high degree of primary sequence conservation throughout the animal kingdom (Jaffe et al., 1995; Jaffe et al., 2000). The results of the present investigation clearly indicated that exposure of fishes to sublethal concentrations of copper cause a rather complex effect on TBARS production, which depended on the time of exposure and on the tissue considered. In fact, Cu(II) exposure for 30 days caused a marked increase in TBARS production in brain, but a significant reduction on TBARS levels in liver and muscle. At some variance, exposure for 45 days to Cu(II) cause decrease in TBARS levels in brain and liver. In muscle, the effect varied depending on the Cu(II) concentration: exposure to 0.02 mg/L caused a decrease, whereas exposure to 0.04 mg/L caused a significant increase in TBARS. These results differ from that obtained with zinc and indicate that exposure to sublethal concentrations of Cu(II) is associated with transitory oxidative stress in brain and with a paradoxical decrease in TBARS in *Leporinus* sp.. However, the participation of oxidative stress on cooper toxicity was evidenced by a significant increase in liver catalase activity, which may indicate a compensatory response to the transitory pro-oxidative state caused by exposure to Cu(II). In fact, this was only observed in brain; but we can not exclude an increase in TBARS production in short-term of exposure to Cu(II).

In a similar way to that observed with Zn(II), exposure to Cu(II) caused a significant reduction in hepatic and renal δ -ALA-D activity. However, Cu(II) did not inhibited brain δ -ALA-D and caused a significant inhibition of muscle enzyme. As exposed above for Zn(II), δ -ALA-D inhibition by Cu(II) can be related to the decrease in hematocrit and hemoglobin observed after exposure to this metal.

In contrast to Zn(II), the effect of Cu(II) on δ -ALA-D did not correspond with an increase in oxidative stress determined by TBARS levels. These results may indicate that δ -ALA-D can be considered a more appropriated indicator of oxidative stress than TBARS. Alternatively, since TBARS and δ -ALA-D quantify oxidative stress in different subcellular compartment, these results may indicate that after Cu(II) intoxication, the cytosol is more affected that the membrane fraction of the cell.

Taken together, the results of the present investigation suggest that the effect of Zn(II) and Cu(II) on piava fish are not exactly coincident and, although the oxidative stress seems to be involved in the intoxication with the two ions, the oxidative stress outcome varied depending on the type of molecular target considered.

References

Ahmad, I.; Hamid, T.; Fatima, M.; Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M.; Raisuddin, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa Punctatus* block) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1523: 37-48, 2000.

Barcellos, L.J.G.; Kreutz, L.C.; de Souza, C.; Rodrigues, L.B.; Fioreze, I.; Quevedo, R.M.; Cericato, L.; Soso, A.B.; Fagundes, M.; Conrad, J.; Lacerda, L.A.; Terra, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture*, v. 237: 229-236, 2004.

Bechara, E.J.H.; Medeiros, M.H.G.; Monteiro, H.P.; Hermes-Lima, M.; Pereira, B.; Demasi, M.; Costa, C.A.; Adballa, D.S.P.; Onuki, J.; Wendel, C.M.A.; Mascl, P.D. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Química Nova*, v. 16: 385-392, 1993.

Begum, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the *Clarias Bartrachus* (linnaeus) and recovery response. *Aquatic Toxicology*, v. 66: 83-92, 2004.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72: 248-254, 1976.

Campana, O.; Sarasquete, C.; Blasco, J. Effect of on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 55: 116-125, 2003.

Conner, E.A.; Fowler, B.A. Biochemical and immunological properties of hepatic δ -aminolevulinic acid dehydratase in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquatic Toxicology*, v. 28: 37-52, 1994.

Dautremepuits, C.; Paris-Palacios, S.; Betoulle, S.; Vernet, G. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio L.*) induced by copper and chitosan. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 137C: 325-333, 2004.

Finney, D.J. *Probit Analysis*. Cambridge, England, Cambridge University Press. pp. 333, 1971.

Handy, R.D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 135A: 25-38, 2003

Jaffe, E.K.; All, S.; Mitchell, L.W.; Taylor, K.M.; Volin, M.; Markham, G.D. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. *Biochemistry*, v. 34: 244-251, 1995.

Jaffe, E.K. The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. *Acta Crystallogr.*, v. 56: 115-128, 2000.

Janero, D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology Medicine*, v. 9: 515-540, 1990.

Karan, V.; Vitorovic, S.; Tutundzic, V.; Poleksic, V. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 40: 49-55, 1998.

Marr, J.C.A.; Lipton, J.; Cacela D.; Hansen, J.A.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Hogstrand, C. Relationship between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth. *Aquatic Toxicology*, v. 36: 17-30, 1996.

McGeer, J.C.; Szebedinszky, C.; McDonald, D.G.; Wood, C.M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, v. 50: 231-243, 2000.

Nelson, D.P.; Kiesow, L.A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Analytical Biochemistry*, v. 49: 474-478, 1972.

Nielsen, F.; Mikkelsen, B.B.; Nielsen, J.B.; Andersen, H.R.; Grandjean, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, v. 43:7, 1997.

Oakes, K.D.; Van Der Kraak, G.J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, v. 63: 447-463, 2003.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95: 351-358, 1979.

Pelgrom, S.M.G.J.; Lock, R.A.C.; Balm, P.H.M.; Wendelaar Bonga, S.E. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. *Aquatic Toxicology*, v. 32:303-320, 1995.

Rocha, J.B.T.; Pereira, M.E.; Emanuelli, T.; Christofari, R.S.; Souza, D.O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. *Toxicology*, v. 100: 27-37, 1995.

Rodrigues, A.L.; Bellinaso, M.L.; Dick, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 94B: 65-69, 1989.

Romani, R.; Antognelli, C.; Baldracchini, F.; De Santis, A.; Isani, G.; Giovannini, E.; Rosi, G. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chemico-Biological Interactions*, v. 145: 321-329, 2003.

Roméo, M.; Bennani, N.; Gnassia-Barelli, M.; Lafaurie, M.; Girard, J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*, v. 48: 185-194, 2000.

Sassa, S.; Fujita, H.; Kappas, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: A. Kotyk, J. Skoda; V. Paces and V. Kostka (Eds.), *Highlights of Modern Biochemistry*, VSP, Utrecht, v. 1: 329- 338, 1989.

Siraj Basha, P.; Usha Rani, A. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 56: 218-221, 2003.

Sloman, K.A.; Baker, D.W.; Ho, C.G.; McDonald, D.G.; Wood, C.M. The effects of trace metal exposure on agonistic encounters in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, v. 63: 187-196, 2003.

Soares, F.A.; Farina, M.; Boettcher, A.; Braga, A.L.; da Rocha, J.B.T. Organic and inorganic forms of selenium inhibited differently fish (*Rhamdia quelen*) and rat (*Rattus norvegicus albinus*) δ -aminolevulinate dehydratase. Environmental Research, v. 98 : 46-54, 2005.

4.2 Manuscrito 2

Acetylcholinesterase activity and accumulation in different tissues of *Leporinus* sp. exposed to sublethal zinc and copper concentrations

Gioda, C.R., Lissner, L.A., Pretto, A., Baldisserotto, B., Dressler, V.L., Flores, E.M.M, Morsch, V.M., Vieira, V.L.P.

Corresponding author:

Dr. Vania Lucia Pimentel Vieira

Departamento de Química

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil

Phone 55 - 3220-8053 Fax: 55 - 3220-8240

e-mail: vanial@smail.ufsm.br

vaniluc@yahoo.com.br

Abstract

The present study had as objectives to verify acetylcholinesterase (AChE) activity and metal accumulation in tissues of juveniles of *Leporinus* sp. (piava) submitted to sublethal zinc and copper concentrations. Fish were exposed to different levels of zinc and copper for LC₅₀ determination. After this, fish were exposed to 10 and 20% of the LC₅₀ that corresponded to 2.3 and 4.6 mg/L (zinc) and 0.02 and 0.04 mg/L (copper) for 30 and 45 days. The AChE activity was evaluated in brain and white muscle tissue of fish and, metals accumulation was measured in kidney, liver, muscle and brain. Exposure to zinc and copper significantly increased AChE activity in both tissues and times tested except for brain AChE activity at 2.3 mg/L of Zn(II) after 45 days exposure (enzyme activity inhibition of 52.5%). Fish exposed to zinc showed accumulation of this metal in liver and kidney in both tested concentrations for 30 and 45 days of exposure. A different result was obtained for copper where a significant accumulation was gotten only for brain in both tested concentrations after 45 days of exposure. These results suggest that piavas exposed to zinc and copper show changes in AChE activity and also demonstrate accumulation of metals in some tissues, compromising the fish life.

Keywords: Acetylcholinesterase activity; Copper; *Leporinus* sp.; Metal accumulation; Zinc.

1. Introduction

The increase of water pollution by metals has caused several morphological, physiological and biochemical alterations in fish species (Bordajandi et al., 2003; Campana et al., 2003; Dautremepuits et al., 2004). The contamination of aquatic environment by metals is a result of natural process, agricultural, urban and industrial activities (Bordajandi et al., 2003, Papagiannis et al., 2004). Metals as copper and zinc have been shown to cause a variety of changes in fish, including loss of appetite, reduced growth, ion loss, decreased aerobic scope and mortality (McGeer et al., 2000; Handy, 2003; Sloman et al., 2003). Zinc is an essential element for cellular and metabolic process and is also integral part of metalloenzymes as alkaline phosphatase, alcohol dehydrogenase and carbonic anhydrase (Watanabe et al., 1997, Celik & Oehlenschager, 2004). Copper is considered an important element for animals because it is used as enzymatic cofactor and is involved in the electrons transference in the respiratory chain (Watanabe et al., 1997, Camakaris et al., 1999; Celik & Oehlenschager, 2004).

The measurement of AChE, an enzyme present in the cholinergic synapses and motor end plates, has been used to monitor stress due to metal contamination in non target organisms as fishes (Némcsok et al., 1984; de la Torre et al., 2000; Fernández-Vega et al., 2002; Lionetto et al., 2003). Considering that fishes are the top of the aquatic food chain and they may concentrate large amounts of waterborne metals (Mansour & Sidky, 2002), and accumulation may occur in different tissues, therefore, it is necessary to evaluate risk for fish species.

Piava was used because it is a native fish of Brazil and it has shown a good commercial value and its flesh is very appreciated (Nomura, 1984; Andrian et al., 1994; Mello et al., 1999; Santos, 2000). The aim of this study was to verify acetylcholinesterase activity and metal accumulation in *Leporinus* sp. after exposure to sublethal zinc and copper concentrations.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Juveniles of *Leporinus* sp. of both sexes were obtained from Aquaculture sector of University Federal of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. The fish weight at the time of sampling was 111.6 ± 18.9 g and the fish length was 20.5 ± 1.5 cm. Fish were acclimated to laboratory conditions for 10 days. They were kept in tanks (250 L) under a natural photoperiod (12 h light-12 h dark). The water was constantly aerated in a static system. Physico-chemical characteristics of water were as follows: temperature 20.8 ± 0.6 °C, pH 7.45 ± 0.3 , dissolved oxygen 5.25 ± 0.2 mg/L, non-ionized ammonia 7 ± 0.1 µg/L, nitrite 0.043 ± 0.006 mg/L, hardness 27.2 ± 3.3 mg/L CaCO₃ and alkalinity 42 ± 1.5 mg/L CaCO₃. Fish were fed *ad libitum* once a day (10:00h) with commercial fish food (42% crude protein, Supra, Brazil). Feces and pellets residues were removed daily by suction.

2.2. Exposures

LC₅₀ determination- 96h

Nominal concentrations used for zinc (ZnSO₄ · 5H₂O) were 18, 20, 22 and 24 mg/L and for copper (CuSO₄ · 5H₂O) 0.05, 0.1, 0.3 and 0.5 mg/L.

After acclimation, groups of 6 fishes were transferred to boxes 45 L for LC₅₀ determination. Concentrations used for zinc was 18, 20, 22 and 24 mg/L and for copper 0.05, 0.1, 0.3 and 0.5 mg/L and mortality from each metal concentration was recorded (LC₅₀). LC₅₀ for zinc was 23.4 mg/L and copper 0.2 mg/L. During experimental period, water parameters were: temperature 20.2 ± 0.8 °C, pH 7.3 ± 0.6 , dissolved oxygen 5.3 ± 0.25 mg/L, non-ionized ammonia 7 ± 0.1 µg/L, nitrite 0.084 ± 0.004 mg/L, hardness 22 ± 2 mg/L CaCO₃ and alkalinity 42.3 ± 2.5 mg/L

CaCO₃. Mortality from each metal concentration was recorded for estimation of lethal concentration (LC₅₀).

After, groups of 14 fish per box (two replicates) were exposed for 30 and 45 days to 10 and 20% of LC₅₀, where the values for zinc were 2.3 and 4.6 mg/L and copper 0.02 and 0.04 mg/L. For each metal concentration 14 fish/ box were used as a control (same conditions without metal) and sampled at each time. Feces and pellet residues were removed daily by suction. There was no mortality throughout experimental period.

2.3. Enzyme assay

Brain and muscle tissues were removed, frozen in liquid nitrogen and then stored at -20°C until the AChE assay. All enzyme tests were made in duplicate (n= 2). AChE (EC. 3.1.1.7) activity was assayed as described by Ellman et al., (1961) and modified by Villescas et al., (1981) using acetylthiocholine (0.8 mM) as the substrate and 5,5'-dithio-bis 2 nitrobenzoic acid (DTNB) as the chromogen. Absorbance of 2 mL of reaction medium containing 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.5; 1 mM DTNB, measured acetylthiocholine hydrolysis at 25 °C and 412 nm using a Hitachi (U-2001) spectrophotometer. Protein was determined by the Coomassie blue method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard. Enzyme activity was expressed as μmol of acetylthiocholine hydrolyzed per min per mg of protein.

2.4. Metal accumulation

Metal accumulation was analyzed in liver, kidney, muscle and brain tissues of *Leporinus* sp. The tissues were digested with nitric acid 70%. All measurements were carried out using a Model Vario 6 FL atomic absorption spectrometer (Analytik Jena AG, Jena, Germany), equipped with a deuterium background (BG) corrector and hollow-cathode lamp for zinc and copper (Flores et al., 2005).

2.5. Statistical analysis

The mean of lethal concentration (LC_{50}) for 96 hours was calculated using probit analysis as described by Finney (1971). The AChE activity data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey-Kramer test and expressed as mean \pm standard error ($n= 8$). The differences were considered to be significant at a probability level of $P < 0.01$.

3. Results and discussion

The AChE activity of unexposed control fish was higher in brain than muscle in both concentrations during all times tested (figures 1 and 2). Zinc increased brain AChE activity in 117% (30 days) and 106% (45 days) in the highest concentration (4.6 mg/L) in relation to control (table 1, figure 1). Similarly, exposure to 2.3 mg/L of zinc increased brain AChE activity 144% (30 days) and in contrast, decreased 52.5% the activity after 45 days (table1). AChE activity increased in muscle 63% (30 days) and 34% (45 days) in fish exposed to zinc at 4.6 mg/L concentration and those exposed to 2.3 mg/L increased 20% and 16% after 30 and 45 days respectively (table1, figure1).

Exposure to copper increased in a significative manner brain and muscle AChE activity in both concentrations and times when compared with controls (figure 2). After exposition to 0.02 mg/L waterborne copper, brain AChE activity increased 56% (30 days) and 75% (45 days) and in 0.04 mg/L concentration these activity increased 40% (30 days) and 125% (45 days) (table1). In muscle, copper increased AChE activity 171% (30 days) and 196% (45 days) in 0.04 mg/L concentration and for 0.02 mg/L concentration after 30 and 45 days experiment occurred AChE activity increase of 78% and 135%, respectively (table1).

In this study AChE activity was altered in fish exposed to zinc and copper in both concentrations and times. It shows that AChE activity could be considered an important biomarker for these metals. The activation observed in brain of AChE

activity after exposure to zinc and copper could represent an increase in the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine, with consequent decrease activation of nicotinic and muscarinic receptors. Then, activation or inhibition of AChE can influence cholinergic neurotransmission process and promote undesirable effects. Metals as zinc and copper may come to compete with calcium for the same absorption sites in cell membranes. Then, at the moment that the nervous impulse arrives at a presynaptic neuron or a motor plate, it happens an increase of the cytosolic concentrations of calcium due to the opening of a voltage dependent calcium channel. The raise of cytosolic Ca^{+2} makes with the neurotransmitter acetylcholine be released on the synaptic gap. In our study, we can suppose that zinc and copper competition with Ca^{+2} in the membrane of the endoplasmatic reticulum could make that the calcium was not adequately absorbed and, consequently, a high concentration of this ion in the intracellular mean would lead to a continuous release of acetylcholine, causing an increase in the AChE activity.

These results are according with that found by Romani et al. (2003) where AChE activity in brain and muscle increased after exposure of *Spaurus auratus* to sublethal concentrations of 0.1 and 0.5 ppm of copper for 20 days. In this study, Cu exposition led to an increase in AChE activity and it was attributed to an interacts of ion with anionic moiety of the enzyme, increased enzyme-substrate affinity, improved catalytic efficiency of enzyme. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to low copper concentrations for the first 14 days also showed increased brain AChE activity (Dethloff et al., 1999).

Differences in accumulation of metals is depend of metal bioavailability, metabolism of the specie and elimination by the target organism (Deviller et al., 2005). Fish exposed to zinc demonstrated significant increased accumulation in liver and kidney in both concentrations after 30 and 45 days of exposure when compared to controls. Considering that, this accumulation was higher for 4.6 mg/L concentration. Muscle and brain didn't show significantly accumulation in the analyzed tissues (table 2A). However, fish exposed to copper presented significantly

accumulation (compared to controls) for brain only after 45 days of exposure (table 2B).

Metals concentration in fish is frequently measured in white muscle because it is the preferential tissue consumed in human diet (Barak et al., 1990). In our study it was not observed the accumulation of metals in white muscle in fish exposed to zinc and copper. However, the alterations of AChE activity show that the metals used in experiment were present in intracellular medium altering physiologic and biochemical processes. Probably, this result demonstrates that there are differences in detoxification and elimination process for each metal and this may determine its distribution and accumulation in different tissues.

The body concentration of metals in different organisms, as fish, could provide important information mainly when there is a relation between accumulation and toxic effects (Borgmann, 2000). However, in our study, there wasn't relation between metals accumulation and AChE activity in brain and white muscle. We observed only an accumulation for copper in brain after 45 days of exposure in both tested concentrations. Then, due to the absence of relation of the AChE activity with metals accumulation in tissues, a greater analogy cannot be done between the two analyzed parameters.

In conclusion, the AChE activity measurements as biomarker in this study were an important tool to verify the exposure to sublethal concentrations of zinc and copper. Alterations in AChE activity can interfere in cholinergic neurotransmission process in fish and compromising its survive. Analysis of the activity of this enzyme shows that its use is adequate as a pollution indicator for aquatic ecosystem contaminated with zinc and copper.

Table 1- Lethal concentrations (LC₅₀), increased and decreased brain and muscle AChE activity (compared to control) in *Leporinus* sp. exposed 2.3 and 4.6 mg/L of zinc and to 0.02 and 0.04 mg/L of copper after 30 and 45 days experiment (n= 8).

Metal	LC ₅₀ (mg/L)	Brain AChE activity (% of control)		Muscle AChE activity (% of control)	
		30	45	30	45
Days					
ZnSO ₄	23.4				
2.3 mg/L		144↑	52.5↓	20 ↑	16↑
4.6 mg/ L		117↑	106↑	63 ↑	34↑
CuSO ₄	0.2				
0.02 mg/ L		56↑	75↑	78↑	135↑
0.04 mg/ L		40↑	125↑	171↑	196↑

Table 2- Zinc (2A) and copper (2B) accumulation in kidney, liver, muscle and brain in *Leporinus* sp. for 30 and 45 days experiment. Concentration of metals in tissues is expressed in $\mu\text{g.g}^{-1}$. Data are reported as mean \pm SD (n= 8). * indicate significant difference from control (P< 0.01).

2A

	0	2.3 mg/L	4.6 mg/L
Kidney			
30 days	18.1 \pm 2.3	38.3 \pm 1.1*	67.3 \pm 4.1*
45 days	21.3 \pm 1.1	38.5 \pm 2.1*	62.2 \pm 3.1*
Liver			
30 days	18.2 \pm 1.8	49.4 \pm 9.8*	64.7 \pm 6.5*
45 days	17.5 \pm 2.6	64.6 \pm 3.5*	79.2 \pm 5.6*
Muscle			
30 days	6.3 \pm 2.3	8.6 \pm 2.9	7.5 \pm 0.2
45 days	6.6 \pm 3.7	6.9 \pm 0.1	7.3 \pm 1.1
Brain			
30 days	12.7 \pm 0.5	14.6 \pm 2.2	15.5 \pm 4.5
45 days	12.4 \pm 0.8	13.7 \pm 1.1	13.1 \pm 0.1

2B

	0	0.02 mg/L	0.04 mg/L
Kidney			
30 days	<4	<4	<4
45 days	<4	<4	<4
Liver			
30 days	<4	<4	<4
45 days	<4	<4	<4
Muscle			
30 days	<4	<4	<4
45 days	<4	<4	<4
Brain			
30 days	<4	<4	<4
45 days	<4	29.2 \pm 2.9*	30.3 \pm 5.1*

Figure 1- Brain and muscle specific AChE activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) of *Leporinus* sp. exposed to 0.0, 2.3 and 4.6 mg/L of Zn(II) for 30 and 45 days. Data are reported as mean \pm SD (n= 8). * indicate significant difference from control (P< 0.01).

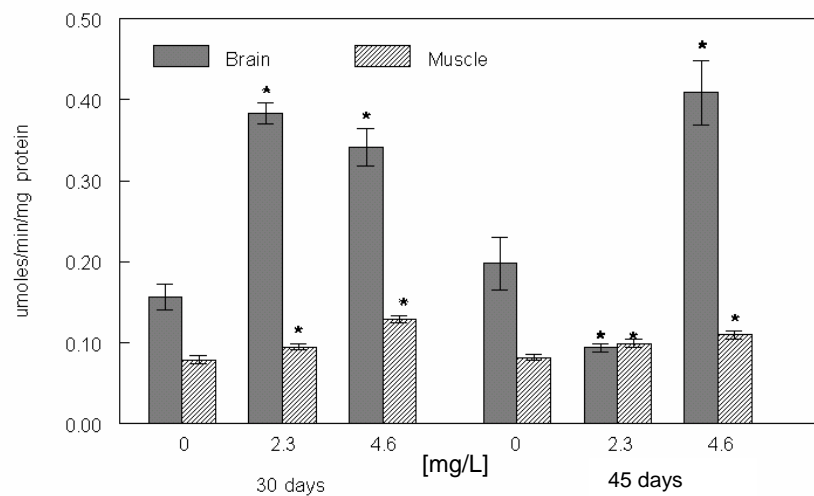
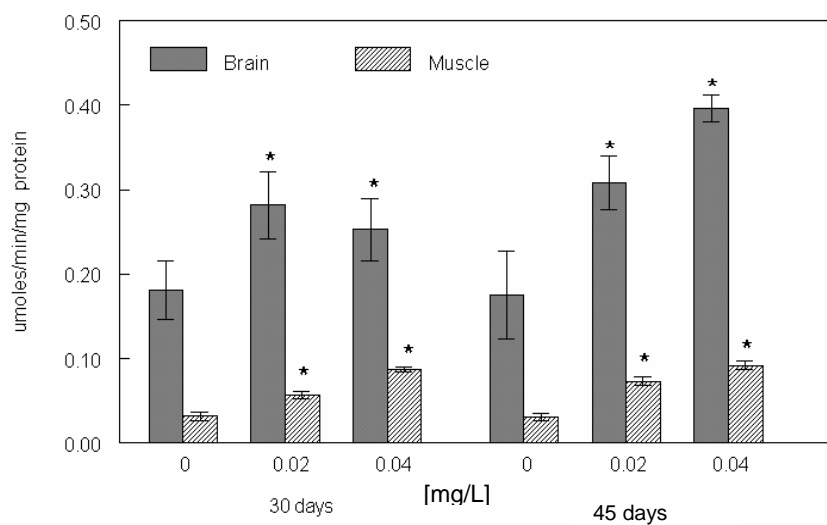


Figure 2- Brain and muscle specific AChE activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) of *Leporinus* sp. exposed to 0.0, 0.02 and 0.04 mg/L of Cu(II) for 30 and 45 days. Data are reported as mean \pm SD (n= 8). * indicate significant difference from control (P< 0.01).



References

Andrian, I.de F.; Dória, C.R. da C.; Torrente, G.; Ferreti, C.M.L. Espectro alimentar e similaridade na composição de quatro espécies de *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) do Rio Paraná (22°10'-22°50'S/53°10'-53°40'w), Brasil. Revista Unimar, 16 (suplemento3): 97-106, 1994.

Barak, N.A.E.; Mason, C.F. Mercury, cadmium and lead concentrations in five species of freshwater fish from Eastern England. The Science of the Total Environment, v. 92: 257-263, 1990.

Bordajandi, L.R.; Gómez, G.; Fernández, M.A.; Abad, E.; Rivera, J.; González, M.J. Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). Chemosphere, v. 53: 163-171, 2003.

Borgmann, U. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. Aquatic Ecosystem Health and Management, v. 3: 277-289, 2000.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v.72: 248-254, 1976.

Camakaris, J.; Voskoboinik, I.; Mercer, J.F. Molecular mechanisms of copper homeostasis. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 261: 225-232, 1999.

Campana, O.; Sarasquete, C.; Blasco, J. Effect of on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, Kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 55: 116-125, 2003.

Celik, U.; Oehlschlager, J. Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. *Food Chemistry*, v.87: 343-347, 2004.

Dautremepuits, C.; Paris-Palacios, S.; Betoulle, S.; Vernet, G. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio L.*) induced by copper and chitosan. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 137C: 325-333, 2004.

De la Torre, F.R.; Salibián, A.; Ferrari, L. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environmental Pollution*, v 109: 277-282, 2000.

Dethloff, G.M.; Schlenk, D.; Hamm, J.T.; Bailey, H.C. Alterations in physiological parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 42: 253-264, 1999.

Deviller, G.; Palluel, O.; Aliaume, C.; Asanthi, H.; Sanchez, W.; Franco Nava, M.A.; Blancheton, J.P.; Casellas, C. Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 61: 89-97, 2005.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.Jr. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v.7: 88-95, 1961.

Fernández-Vega, C.; Sancho, E.; Ferrando, M.D.; Andreu, E. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 72: 55-63, 2002.

Finney, D.J. *Probit Analysis*. Cambridge, England, Cambridge University Press. pp.333, 1971.

Flores, E.M.M.; Costa, A. B.; Mattos, J.C.P.; Müller, E.I., Paniz, J.N.G.; Dressler, V.L. Use of paper capsules for cadmium determination in biological sample by solid sampling flame atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta*, v. 60(B): 583-588, 2005.

Handy, R.D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 135A: 25-38, 2003.

Lionetto, M.G.; Caricato, R.; Giordano, M.E.; Pascariello, M.F; Marinosci, L.; Schettino, T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin*, v. 46: 324-330, 2003.

Mansour, S.A.; Sidky, M.M. *Ecotoxicological Studies*. 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. *Food Chemistry*, v. 78: 15-22, 2002.

McGeer, J.C.; Szebedinszky, C.; McDonald, D.G.; Wood, C.M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, v. 50: 231-243, 2000.

Mello, R.F.; de Moura, M.A.; Vieira, I.; Cyrino, J.E. Suplementação da dieta de alevinos de piauçu (*Leporinus obtusidens*) com vitamina C. *Scientia Agricola*, v. 56(4): 1223-1231, 1999.

Nemcsók, J.; Németh, Á.; Buzás, ZS.; Boross, L. Effects of copper, zinc and paraquat on acetylcholinesterase activity in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology*, v. 5: 23-3, 1984.

Nomura, H. Dicionário dos peixes do Brasil. Brasília: Editerra, p. 482, 1984.

Papagiannis, I.; Kagalou, I.; Leonardos, J.; Petridis, D.; Kalfakakou, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). *Environment International*, v. 30: 357-362, 2004.

Romani, R.; Antognelli, C.; Baldracchini, F.; De Santis, A.; Isani, G.; Giovannini, E.; Rosi, G. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chemico-Biological Interactions*, v. 145: 321-329, 2003.

Santos, G.O. Aspectos biológicos importantes para a piscicultura do gênero *Leporinus* Spix, 1829 - Uma revisão. *Pesquisa agropecuária Gaúcha*, v. 6(1): 151-156, 2000.

Sloman, K.A.; Baker, D.W.; Ho, C.G.; McDonald, D.G.; Wood, C.M. The effects of trace metal exposure on agonistic encounters in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, v. 63: 187-196, 2003.

Villescas, R.; Oswald, R.; Marimoto, H. Effects of neonatal undernutrition and cold stress on behavior and biochemical brain parameters in rats. *Journal of Nutrition*, v. 111: 1103-1110, 1981.

Watanabe, T.; Kiron, V.; Satoh, S. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, v. 151: 185-207, 1997.

5. DISCUSSÃO

As alterações celulares podem ser medidas através de avaliações bioquímicas, que são ferramentas utilizadas para se verificar o estado geral de um organismo (Nemcsók et al., 1984; Pelgrom et al., 1995; Burden et al., 1998; McGeer et al., 2000; Roméo et al., 2000). Neste estudo vários parâmetros foram avaliados, entre eles, atividade de enzimas, índices hematológicos, níveis de peroxidação lipídica e acumulação de metais em tecidos de peixes expostos a zinco e a cobre. Os parâmetros analisados mostraram-se, de uma maneira geral, bastante sensíveis à presença destes metais.

Existem, na literatura especializada da área, relativamente poucas publicações envolvendo a atividade da enzima δ -ALA-D em peixes expostos ao Zn(II) e ao Cu(II). Uma vez que esses elementos são citados como microelementos celulares (Karan et al., 1998; McGeer et al., 2000), o presente estudo visou avaliar o efeito dos mesmos procurando esclarecer seu papel bioquímico em *Leporinus* sp..

A atividade da δ -ALA-D diminuiu significativamente nos tecidos de peixe estudados, principalmente em fígado e rim, demonstrando que esta enzima é sensível a presença de Cu(II) e Zn(II) na água. A inibição da δ -ALA-D por metais e outros compostos tóxicos, já foi previamente demonstrada na literatura, sendo esta inibição geralmente atribuída a interações dos metais com os grupos tióis presentes no sítio ativo da enzima, oxidando-os (Burden et al., 1998; Campana et al., 2003; Soares et al., 2005). Sabe-se que o zinco atua como cofator da δ -ALA-D em tecidos de mamíferos, entretanto as concentrações utilizadas do metal no presente estudo, inibiram sua atividade nos tecidos de *Leporinus* sp. De acordo com Conner et al. (1994) o zinco parece não atuar como cofator hepático da δ -ALA-D em peixes. Como já descrito na literatura, a inibição da δ -ALA-D acarreta um acúmulo de substrato, o ácido delta aminolevulico, que pode atuar como um pró-oxidante (Bechara et al., 1993). Dessa forma o estado oxidativo gerado pelos metais Zn(II) e Cu(II) pode acabar sendo reforçado pela presença deste substrato.

A inibição da δ -ALA-D causada pelos referidos metais está de acordo com os resultados encontrados por Burden et al. (1998), onde juvenis da espécie *Oncorhynchus mykiss*, expostos ao chumbo durante 29 dias demonstraram um significativo decréscimo na atividade da δ -ALA-D sanguínea. Soares et al. (2005) em um estudo *in vitro*, também observaram inibição na atividade da δ -ALA-D em brânquias e fígado de peixes expostos a diferentes formas de selênio. Porém, Campana et al. (2003) observaram que o chumbo não causa alterações na atividade da enzima em fígado e rim de *Halobatrachus didactylus*.

Quanto aos parâmetros hematológicos analisados, observou-se redução no hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos, demonstrando que os peixes expostos a ambos metais apresentavam sinais de anemia. Porém, o número de leucócitos não diferiu do controle, e este resultado está de acordo com as observações feitas durante o período experimental, onde os peixes apresentavam-se em bom estado de saúde, sem sinais visíveis de doença. A redução dos parâmetros hematológicos pode estar relacionada com a inibição da atividade da δ -ALA-D, uma vez que esta inibição pode vir a interferir na síntese do porfobilinogênio e conseqüentemente na síntese do heme (Sassa et al., 1989), causando assim, anemia nos peixes.

O metabolismo normal também depende da razão entre a produção de radicais livres e atividades antioxidantes. *Leporinus* sp. expostos a Zn(II) e a Cu(II) demonstraram aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Uma maior produção de espécies reativas de oxigênio pode ser evidenciada pelo aumento significativo na atividade da enzima catalase uma importante enzima de defesa antioxidante, em fígado destes peixes.

Peixes expostos ao zinco também demonstraram um aumento significativo nos níveis de TBARS, principalmente depois da exposição crônica de 45 dias. Este resultado demonstra que este metal além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, também ajudou a desencadear o processo de lipoperoxidação, causando assim, estresse oxidativo nos peixes expostos.

Já o cobre, de uma maneira geral, demonstrou uma redução nos níveis de TBARS em relação ao controle, principalmente nos 45 dias de exposição. Os peixes expostos ao cobre, em geral, apresentaram baixos níveis de MDA nos tecidos, demonstrando que as concentrações utilizadas deste metal foram incapazes de desencadear o processo de peroxidação lipídica. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Paris-Palacios et al. (2000), onde a espécie *Brachydanio rerio* exposta ao cobre por 14 dias demonstrou um aumento na atividade da catalase no fígado.

No presente estudo, um outro parâmetro verificado foi a atividade da enzima AChE. A atividade muscular e cerebral desta enzima sofreu alteração significativa após exposição ao cobre e ao zinco em ambas concentrações testadas. Esta alteração demonstra que a AChE é um importante biomarcador a exposições subletais de zinco e cobre na água. Nossos resultados mostraram um aumento da atividade da AChE em todas as concentrações e tempos em cérebro e músculo, com exceção do cérebro na concentração 2.3 mg/L nos 45 dias de exposição, onde houve uma inibição significativa na atividade da enzima. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, onde a presença de metais em concentrações subletais na água elevaram a atividade da AChE (Dethloff et al., 1999; Romani et al., 2003).

Metais como zinco e cobre podem vir a competir com cálcio pelos mesmos sítios de absorção nas membranas celulares. Então, no momento em que o impulso nervoso chega a um neurônio pré-sináptico ou a uma placa motora, ocorre um aumento das concentrações citosólicas de cálcio devido à abertura de um canal de cálcio dependente de voltagem. O aumento de Ca^{+2} citosólico faz com que o neurotransmissor acetilcolina seja liberado na fenda sináptica. Em nosso estudo, podemos supor que a competição do zinco e do cobre com o Ca^{+2} na membrana do retículo endoplasmático poderia fazer com que cálcio não fosse absorvido adequadamente, conseqüentemente uma alta concentração deste íon no meio intracelular, conduziria a uma contínua liberação da acetilcolina ocasionando um aumento na atividade da AChE.

Os resultados encontrados em nosso estudo estão de acordo com Romani et al. (2003) onde a atividade da AChE cerebral e muscular aumentou depois da exposição de *Spaurus auratus* a concentrações subletais de cobre (0.1 e 0.5 ppm) por 20 dias. A exposição ao Cu conduziu a um aumento na atividade da AChE. Este aumento foi atribuído a interações do íon com os sítios aniônicos da enzima, melhorando assim, a eficiência catalítica.

Diferenças na acumulação de metais em peixes dependem das características físico-químicas da água, da concentração, do tipo de metal, bem como, do tempo de exposição (McGeer et al., 2000; Deviller et al., 2005). Diferentes espécies de peixes capturadas em lagos e rios próximos a áreas urbanas mostraram altas concentrações de metais, como cobre e o zinco, em seus tecidos (Bordajandi et al., 2003; Papagiannis et al., 2004). Em nossos resultados, observou-se no fígado e rim uma acumulação significativa de zinco, em ambas as concentrações testadas. Esta acumulação foi dependente da concentração. Para o cobre, observou-se acumulação somente no cérebro durante os 45 dias em ambas concentrações testadas e a acumulação não foi concentração-dependente.

Normalmente, a acumulação de metais em peixes é medida no músculo, por este, ser o principal tecido consumido na dieta humana (Barak & Mason, 1990). Em nossos resultados não foi observada acumulação de zinco e cobre no músculo dos peixes expostos, quando comparado aos controles. Provavelmente, este resultado demonstra existir diferenças nos processos de detoxificação e eliminação para cada metal, determinando sua distribuição e acumulação nos diferentes tecidos.

Apesar de não haver acumulação de zinco (músculo e cérebro) e cobre (fígado, rim, músculo), foram observadas alterações na atividade de enzimas tais como AChE, δ -ALA-D, catalase e nos níveis de TBARS para ambos metais, mostrando que estes, interferiram nos processos bioquímicos e fisiológicos da célula.

Este trabalho demonstrou que o zinco e o cobre, apesar de serem considerados micronutrientes importantes para a função celular, mesmo em concentrações subletais, aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio, alteraram a atividade de importantes enzimas como catalase, AChE e δ -ALA-D e

acumularam-se, de diferentes formas, nos tecidos de piavas. Uma vez que, existem poucos estudos relacionando aspectos toxicológicos de metais em peixes nativos do Brasil, os parâmetros verificados neste trabalho poderão auxiliar no desenvolvimento de futuros trabalhos.

6. CONCLUSÕES

Através dos resultados experimentais obtidos podemos chegar as seguintes conclusões:

1. Em geral, através dos parâmetros analisados, o gênero *Leporinus* sp. mostrou-se sensível às concentrações de 2.3 mg/L e 4.6 mg/L de zinco e 0.02 mg/L e 0.04 mg/L de cobre durante os 30 e 45 dias de exposição;
2. A atividade da AChE foi alterada para as concentrações utilizadas dos metais, demonstrando que esta enzima é um bom biomarcador frente à poluição das águas por metais;
3. A atividade da δ -ALA-D, em geral, foi inibida pelos metais nos tecidos estudados, principalmente no fígado e rim, para ambas concentrações de zinco e cobre durante os 30 e 45 dias de exposição;
4. Os peixes expostos ao cobre e ao zinco demonstraram sinais de anemia, e este resultado pode estar ligado à inibição da δ -ALA-D que é uma das enzimas responsáveis pela síntese do porfobilinogênio, precursor do heme;
5. A atividade da enzima catalase foi aumentada no fígado para ambos metais e concentrações durante os 30 e 45 dias de exposição, provavelmente devido à necessidade de proteção devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio;
6. Os níveis de TBARS foram aumentados para os peixes expostos ao zinco nas concentrações de 2.3 mg/L e 4.6 mg/L, principalmente após 45 dias de exposição, demonstrando que apesar da atividade do sistema antioxidante (catalase) estar aumentado, este não conseguiu evitar o processo de lipoperoxidação, e conseqüentemente, a posterior produção de lipoperoxídios;

7. Para o cobre, os níveis de TBARS diminuíram em relação aos controles, nas concentrações utilizadas. Apesar disto, o aumento na atividade da catalase demonstra que houve a produção de espécies reativas de oxigênio, devido à intoxicação com cobre, mas provavelmente, os sistemas antioxidantes conseguiram evitar o desencadeamento do processo de lipoperoxidação.

8. Os peixes expostos ao zinco demonstraram uma significativa acumulação do metal no fígado e rim, sendo esta acumulação maior na concentração mais alta (4.6 mg/L). Já o cobre foi acumulado somente no cérebro em ambas as concentrações testadas durante os 45 dias de exposição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, L.H. de; Corrêa, C.F.; Avilez, I.M.; Altran, A.E.; Moraes, G. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environmental Research**, v. 95: 224-230, 2004.

Almeida, J.A.; Diniz, Y.S.; Marques, S.F.G.; Faine, L.A.; Ribas, B.O.; Burneiko, R.C.; Novelli, E.L.B. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environment International**, v. 27: 673-679, 2002.

Andrian, I.de F.; Dória, C.R. da C.; Torrente, G.; Ferreti, C.M.L. Espectro alimentar e similaridade na composição de quatro espécies de *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) do Rio Paraná (22°10'-22°50'S/53°10'-53°40'w), Brasil. **Revista Unimar**, 16 (suplemento3): 97-106, 1994.

Avci, A.; Kaçmaz, M.; Durak, I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60: 101-105, 2005.

Barak, N.A.E.; Mason, C.F. Mercury, cadmium and lead concentrations in five species of freshwater fish from Eastern England. **The Science of the Total Environment**, v. 92: 257-263, 1990.

Barcellos, L.J.G.; Kreutz, L.C.; de Souza, C.; Rodrigues, L.B.; Fioreze, I.; Quevedo, R.M.; Cericato, L.; Soso, A.B.; Fagundes, M.; Conrad, J.; Lacerda, L.A.; Terra, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, v. 237: 229-236, 2004.

Bechara, E.J.H.; Medeiros, M.H.G.; Monteiro, H.P.; Hermes-Lima, M.; Pereira, B.; Demasi, M.; Costa, C.A.; Adballa, D.S.P.; Onuki, J.; Wendel, C.M.A.; Mascl, P.D. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Química Nova**, v. 16: 385-392, 1993.

Bentley, P.J. Influx of zinc by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): uptake from external environmental solutions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 101C: 215-217, 1992.

Bevan, D.R.; Bodlaender, P.; Shemin, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn^{2+} for enzyme activity. **Journal of Biologic Chemistry**, v. 255(5): 2030-2035, 1980.

Bordajandi, L.R.; Gómez, G.; Fernández, M.A.; Abad, E.; Rivera, J.; González, M.J. Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). **Chemosphere**, v. 53: 163-171, 2003.

Borgmann, U. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 3: 277-289, 2000.

Burden, V.M.; Sandheinrich, M.B.; Caldwell, C.A. Effects of lead on the growth and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Environmental Pollution**, v. 101: 285-289, 1998.

Camakaris, J.; Voskoboinik, I.; Mercer, J.F. Molecular mechanisms of copper homeostasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 261: 225-232, 1999.

Campana, O.; Sarasquete, C.; Blasco, J. Effect of on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, Kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55: 116-125, 2003.

Celik, U.; Oehlschlager, J. Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. **Food Chemistry**, v.87:343-347, 2004.

Céron, J.J.; Ferrando, M.D.; Sancho, E.; Gutierrez-Panizo, C.; Andreu-Moliner, E. Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of European eel (*Anguilla anguilla*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 35: 222-225, 1996.

Chuiko, G.M. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127C: 233-242, 2000.

Conner, E.A.; Fowler, B.A. Biochemical and immunological properties of hepatic δ -aminolevulinic acid dehydratase in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquatic Toxicology**, v. 28: 37-52, 1994.

Dautremepuits, C.; Paris-Palacios, S.; Betoulle, S.; Vernet, G. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio L.*) induced by copper and chitosan. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 137C: 325-333, 2004.

De la Torre, F.R.; Salibián, A.; Ferrari, L. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. **Environmental Pollution**, v 109: 277-282, 2000.

Dethloff, G.M.; Schlenk, D.; Hamm, J.T.; Bailey, H.C. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 42: 253-264, 1999.

Deviller, G.; Palluel, O.; Aliaume, C.; Asanthi, H.; Sanchez, W.; Franco Nava, M.A.; Blancheton, J.P.; Casellas, C. Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61: 89-97, 2005.

Dias Júnior, W.; Mourgués-Schurter, L.R. Comportamento alimentar, determinação do horário de fornecimento e do tempo de disponibilidade da ração para *Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1847 (Osteichthyes, Characiformes, Anostomidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25:1043-1050, 2001.

Emanuelli, T.; Rocha, J.B.T.; Pereira, M.E.; Porciuncula, L.O.; Morsch, V.M.; Martins, A.F.; Souza, D.O.G. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacology and Toxicology**, v. 79: 136-143, 1996.

Espelid, S.; Lokken, G.B.; Steiro, K.; Bogwald, J. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 6: 95-110, 1996.

Fernández-Vega, C.; Sancho, E.; Ferrando, M.D.; Andreu, E. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.72: 55-63, 2002.

Finelli, V.N.; Murthy, L.; Peirano, W.B.; Petering, H.G. Delta-aminolevulinate dehydratase, a zinc dependent enzyme. **Biochemistry and Biophysic Research Communication**, v. 60: 1418-1424, 1974.

Finelli, V.N.; Klauder, D.S.; Karaffa, M.A.; Petering, H.G. Interaction of zinc and lead on delta-aminolevulinate dehydratase. **Biochemistry and Biophysic Research Communication**, v. 65: 303-311, 1975.

Godoy, M. P. **Peixes do estado de Santa Catarina**. Florianópolis: UFSC, pp. 571, 1987.

Hamilton, D.P.; Malik, D.S; Sastry, K.V. Effects of zinc toxicity on biochemical composition of muscle and liver of murrel (*Channa punctatus*). **Environment International**, v. 24(4): 433-438, 1998.

Handy, R.D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 135A: 25-38, 2003.

Ho, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15: 572-578, 2004.

Hogstrand, C.; Wood, C.M. Mechanisms for zinc acclimation in freshwater rainbow trout. **Marine Environmental Research**, v. 39: 131-135, 1995.

Jaffe, E.K.; All, S.; Mitchell, L.W.; Taylor, K.M.; Volin, M.; Markham, G.D. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. **Biochemistry**, v. 34: 244-251, 1995.

Karan, V.; Vitorovic, S.; Tutundzic, V.; Poleksic, V. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40: 49-55, 1998.

Lionetto, M.G.; Caricato, R.; Giordano, M.E.; Pascariello, M.F.; Marinosci, L.; Schettino, T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46: 324-330, 2003.

Mansour, S.A.; Sidky, M.M. Ecotoxicological Studies. 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. **Food Chemistry**, v. 78: 15-22, 2002.

Marr, J.C.A.; Lipton, J.; Cacela D.; Hansen, J.A.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Hogstrand, C. Relationship between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth. **Aquatic Toxicology**, v. 36: 17-30, 1996.

Massoulie, J.; Pezzementi, L.; Bon, S.; Krejei, E.; Valette, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progressive neurobiology**, v. 41: 31-91, 1993.

Matés, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153: 83-104, 2000.

McGeer, J.C.; Szebedinszky, C.; McDonald, D.G.; Wood, C.M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. **Aquatic Toxicology**, v. 50: 231-243, 2000.

McGeer, J.C.; Szebedinszky, C.; McDonald, D.G.; Wood, C.M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. **Aquatic Toxicology**, v. 50: 245-256, 2000.

Mello, R.F.; de Moura, M.A.; Vieira, I.; Cyrino, J.E. Suplementação da dieta de alevinos de piaçu (*Leporinus obtusidens*) com vitamina C. **Scientia Agricola**, v. 56(4): 1223-1231, 1999.

Monteiro, H.P.; Abdalla, D.S.P.; Augusto, O.; Bechara, E.J.H. Free radical generation during δ -aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 271(1): 206-216, 1989.

Muller, R.; Lloyd, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. **Fishing News Books**, pp. 371, 1994.

Nemcsók, J.; Németh, Á.; Buzás, ZS.; Boross, L. Effects of copper, zinc and paraquat on acetylcholinesterase activity in carp (*Cyprinus carpio L.*). **Aquatic Toxicology**, v. 5: 23-3, 1984.

Nielsen, F.; Mikkelsen, B.B.; Nielsen, J.B.; Andersen, H.R.; Grandjean, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clinical Chemistry**, v. 43:7, 1997.

Nomura, H. **Dicionário dos peixes do Brasil**. Brasília: Editerra, p. 482, 1984.

Oakes, K.D.; Van Der Kraak, G.J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 63: 447-463, 2003.

Papagiannis, I.; Kagalou, I.; Leonardos, J.; Petridis, D.; Kalfakakou, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). **Environment International**, v. 30: 357-362, 2004.

Paris-Palacios, S.; Biagianti-Risbourg, S.; Vernet, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology**, v. 50: 109-124, 2000.

Pelgrom, S.M.G.J.; Lock, R.A.C.; Balm, P.H.M.; Wendelaar Bonga, S.E. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 32:303-320, 1995.

Rashed, M.N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International**, v. 27: 27-33, 2001.

Rocha, J.B.T.; Pereira, M.E.; Emanuelli, T.; Christofari, R.S.; Souza, D.O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology**, v. 100: 27-37, 1995.

Rodrigues, A.L.; Bellinaso, M.L.; Dick, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 94B: 65-69, 1989.

Romani, R.; Antognelli, C.; Baldracchini, F.; De Santis, A.; Isani, G.; Giovannini, E.; Rosi, G. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, v. 145: 321-329, 2003.

Roméo, M.; Bennani, N.; Gnassia-Barelli, M.; Lafaurie, M.; Girard, J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**, v.48: 185-194, 2000.

Sanchez, W.; Palluel, O.; Laurent, M.; Coquery, M.; Porcher, J.; Ait-Aissa, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.19:177-183, 2004.

Sancho, E.; Ferrando, M.D.; Andreu, E. Response and recovery of brain acetylcholinesterase activity in the European eel, *Anguilla anguilla*, exposed to fenitrothion. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 38: 205-209, 1997.

Santos, G.O. Aspectos biológicos importantes para a piscicultura do gênero *Leporinus Spix*, 1829 - Uma revisão. **Pesquisa agropecuária Gaúcha**, v. 6(1): 151-156, 2000.

Sassa, S.; Fujita, H.; Kappas, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: A. Kotyk, J. Skoda; V. Paces and V. Kostka (Eds.), **Highlights of Modern Biochemistry**, VSP, Utrecht, v. 1: 329- 338, 1989.

Schlenk, D.; Benson, W.H. **Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts**. London, v. 1, 2001.

Sharma, M.C.; Joshi, C.; Pathak, N.N.; Kaur, H. Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers. **Research in Veterinary Science**, v. 79: 113-123, 2005.

Siraj Basha, P.; Usha Rani, A. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56: 218-221, 2003.

Soares, F.A.; Farina, M.; Boettcher, A.; Braga, A.L.; da Rocha, J.B.T. Organic and inorganic forms of selenium inhibited differently fish (*Rhamdia quelen*) and rat (*Rattus norvegicus albinus*) δ -aminolevulinic acid dehydratase. **Environmental Research**, v. 98 : 46-54, 2005.

Souza, G.A.; Andrade,D.R.; Costa, A.P.; Neves, G.D. Contribuição ao estudo da biologia reprodutiva do piau-vermelho *Leporinus copelandii*: fecundidade e sua ação com peso total, fator de condição e peso das gônadas. **Simbraq**, 2001.

Stehbens, W.E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 75: 265-276, 2003.

Tavares-Dias, M.; Melo, J.F.B.; de Moraes, F.R.; Moraes,G. Características hematológicas de teleósteos brasileiros.VI. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, v. 32: 693-698, 2002.

Timbrell, J. A. **Principles of biochemical toxicology**. Second Edition. Taylor & Francis London, Washington DC., pp. 180, 1991.

Viarengo, A. Heavy metals in marine invertebrates,mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Rev. Aquat. Sci**, v. 1: 295-317, 1989.

Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, v. 3, 2000.

Watanabe, T.; Kiron, V.; Satoh, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v. 151: 185-207, 1997.

Whitfield, A.K.; Elliott, M. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. **Journal of Fish Biology**, v. 60A: 1-21, 2002.

Wilson, E.L.; Burger, P.E.; Dowdle, E.B. Beef-liver 5- aminolevulinic acid dehydratase - Purification and properties. **European Journal of Biochemistry**, v. 29: 563-571, 1972.

ANEXO 1

Figura de um exemplar de piava (*Leporinus* sp.)

