

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL**

**BIOQUÍMICA E CITOGENÉTICA DE JUNDIÁS (*Rhamdia
quelen*) EXPOSTOS A DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE TÓRIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lizelia Moraes Correa

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**BIOQUÍMICA E CITOGENÉTICA DE
JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE TÓRIO**

por

Lizelia Moraes Correa

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

Orientador: Prof. Bernardo Baldisserotto

Santa Maria, RS, Brasil

2007

© 2007

Todos os direitos autorais reservados a Lizelia Moraes Correa. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Padre Reus, nº544, RS, 93226-350.

Fone (0xx) 51 96855372; E-mail: lizmcorrea@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal**

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

**BIOQUÍMICA E CITOGENÉTICA DE
JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE TÓRIO**

elaborada por
Lizelia Moraes Correa

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Bernardo Baldisserotto, Dr.
(Presidente/Orientador)

Vania L. Loro , Dra. (UFSM)

Levy C. Gomes, Dr. (UVV)

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2007.

Aos meus pais, minha irmã e meus amigos (as) que sempre me motivaram em todos os momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto, pela orientação neste trabalho, pelo exemplo de serenidade, generosidade e simplicidade, por todos os ensinamentos e pela atenção durante estes dois anos de curso.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Ao professor Dr. João Radünz Neto, do Departamento de Zootecnia da UFSM, por ter cedido os jundiás para o experimento.

Aos meus pais, por todo incentivo e amor, por todas as lições de vida. Pelo exemplo de humildade, sinceridade e honestidade. Por me ensinarem a lutar pela concretização de meus sonhos.

A uma turma de amigos de “infância” muito especial da época de escola (Rubén Darío - Sapucaia do Sul). Meu muito obrigado pelas demonstrações de carinho durante o “curto”, mas inesquecível período de internação hospitalar. Por todo incentivo, companheirismo e ajuda financeira.

A todos os verdadeiros amigos e as amigas que a vida me deu e que de uma forma ou de outra sempre me apoiaram e me deram força para continuar a seguir meu caminho.

Aos novos amigos que me acolheram em Santa Maria.

A todos os alunos do Laboratório de Fisiologia de Peixes da UFSM, em especial a Daiani e o Alexssandro que foram meus braços direito e esquerdo durante o experimento.

As professoras Dras. Maria Amália Pavanato e Susana Llesuy, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, por todo conhecimento e aprendizado adquiridos em laboratório, pelas dicas, pela atenção e paciência, assim como também à professora Dra. Vania Loro, do Departamento de Química.

Ao professor Dr. Mário Luiz de la Rue, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, por ceder seu laboratório de microscopia para avaliação citogenética.

A MSc. Márcia Mesko e aos professores Drs. Valderi Dressler e Érico Flores, do Departamento de Química, pela análise das concentrações de tório nas amostras de água.

As minhas primeiras orientadoras na carreira científica, Dras. Clarice T. Lemos e MSc. Nara R. Terra que me iniciaram na pesquisa, apresentando-me à Ecotoxicologia.

E por último e mais importante, a Deus por colocar em meu caminho tantas pessoas boas com quem tive (e espero continuar tendo) a oportunidade de aprender e crescer como pessoa e como profissional.

Perguntaram ao Dalai Lama:

“O que mais te surpreende na humanidade?”

E ele respondeu:

“Os homens... porque perdem sua saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde... E por pensarem ansiosamente no futuro, perdem o presente, de tal forma que acabam por não viver nem o presente nem o futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... E morrem como se nunca tivessem vivido.”

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Animal
Universidade Federal de Santa Maria

BIOQUÍMICA E CITOGÉNÉTICA DE JUNDIAS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TÓRIO

Autora: Lizelia Moraes Correa

Orientador: Bernardo Baldisserotto

Data e local da Defesa: Santa Maria, 23 de fevereiro de 2007.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de tório (Th) sobre parâmetros metabólicos (glicogênio, glicose, lactato, proteína e amônia), em tecido muscular de jundiás (*Rhamdia quelen*), níveis de lipoperoxidação (TBARS), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) nos tecidos hepático e muscular e parâmetros citogenéticos através da avaliação de anormalidades nucleares em células sanguíneas. Juvenis de jundiás (8,78±0,10cm; 6,41±0,17g) foram expostos a diferentes concentrações de ²³²Th 33,6±8,7; 106,5±37,1; 191,6±19,0 e 758,4±150,4 em µg. L⁻¹ (três repetições por tratamento) por 15 dias. Os níveis de glicogênio muscular diminuíram significativamente a 106,5 µg. L⁻¹ Th. Glicose e proteína aumentaram na 758,4 µg. L⁻¹ Th. Os níveis de lactato apresentaram-se elevados em 106,5 µg. L⁻¹ Th. A amônia aumentou a 33,6; 106,5 e 191,6 µg.L⁻¹ Th. Os níveis de peroxidação lipídica diminuíram no fígado dos jundiás expostos a todas as concentrações de Th testadas. No músculo esquelético aumentaram a 106,5 µg. L⁻¹ Th e diminuíram a 191,6 e 758,4 µg.L⁻¹ Th. A atividade da CAT no tecido hepático apresentou aumento em todas as concentrações testadas de Th. Nenhuma alteração foi observada no tecido muscular. A GST diminuiu no fígado a 33,6 e 106,5 µg.L⁻¹ Th. No tecido muscular diminuiu a 758,4 µg.L⁻¹ Th. Jundiás expostos a 106,5 µg. L⁻¹ apresentaram maior indução de micronúcleos. Não foi observadas alterações para outras anormalidades nucleares eritrocíticas. Os resultados obtidos sugerem mudanças nos intermediários metabólitos devido ao estresse provocado pelo Th, aumento da lipoperoxidação no fígado, sendo observado níveis variados no músculo esquelético, alterações das enzimas CAT e GST além de danos no DNA dos peixes expostos ao Th, comparando aos grupos controles.

Palavras-chaves: peixes, estresse oxidativo, micronúcleos, ecotoxicologia.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduation in Animal Biodiversity
Universidade Federal de Santa Maria

BIOCHEMISTRY AND CITOGENETIC OF SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) EXPOSED TO DIFFERENT THORIUM CONCENTRATIONS

Author: Lizelia Moraes Correa

Adviser: Bernardo Baldisserotto

Place and Date of Defense: Santa Maria, February 23th, 2007.

The objective of this study was to evaluate the effect of thorium (Th) on the metabolism of silver catfish (*Rhamdia quelen*) through biochemical parameters from the muscle tissue (glycogen, glucose, lactate, protein and ammonia), lipidic peroxidation levels (TBARS), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) in the hepatic and muscular tissues and cytogenetic parameters through the evaluation of nuclear abnormalities in blood cells. Silver catfish juveniles ($8.78 \pm 0.10\text{cm}$; $6.41 \pm 0.17\text{g}$) were exposed to different waterborne concentrations of ^{232}Th (in $\mu\text{g.L}^{-1}$): 33.6 ± 8.7 ; 106.5 ± 37.1 ; 191.6 ± 19.0 and 758.4 ± 150.4 for 15 days. The levels of muscle glycogen were significantly reduced in fish exposed to $106.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th, while glucose and protein increased in those exposed to $758.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th. Lactate levels were higher in fish maintained at $191.6 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th and ammonia was higher in those exposed to 33.6 , 106.5 and $191.6 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th. The lipidic peroxidation levels were diminished in the liver of silver catfish exposed to all tested concentrations of Th. In the muscle lipidic peroxidation was higher in juveniles maintained at $106.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th and lower in those exposed to 191.6 and $758.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th. The CAT activity was higher in the hepatic tissue (but not muscle) of fish exposed to all tested concentrations of Th. The GST activity in the liver was lower in fish exposed to 33.6 and $106.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th, and in the muscular tissue of those maintained at $758.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th. Silver catfish exposed to $106.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ presented a significant induction of micronuclei, but no alterations in other erythrocyte abnormalities were observed. These results suggest that exposure to waterborne Th induces changes in the metabolic state, increase of lipidic peroxidation in the liver, some alterations of CAT and GST, and DNA damage.

Keywords: fish, stress oxidative, micronuclei, ecotoxicology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado (A) e músculo esquelético (B) de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações de tório por 15 dias.

FIGURA 2 - Catalase em fígado (A) e músculo esquelético (B) de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações de tório por 15 dias.

FIGURA 3 - Glutathiona-S-transferase em fígado (A) e músculo esquelético (B) de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações de tório por 15 dias.

FIGURA 4 - Anormalidades eritrocíticas em *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações de tório por 15 dias.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Parâmetros metabólicos em músculo esquelético de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações de Th por 15 dias.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANE: anormalidades nucleares eritrocíticas
ATSDR: agency for toxic and disease registry
Ca²⁺: íon cálcio
CAT: catalase
Cl⁻: íon cloreto
DNA: ácido desoxirribonucléico
EAO: espécies ativas de oxigênio
EDTA: ácido etilenodiamino tetracético
EPA: environmental protection agency U.S
ERO: espécies reativas de oxigênio
F⁻: íon fluoreto
GPx: glutaciona peróxidase
GR: glutaciona redutase
GSH: glutaciona reduzida
GST: glutaciona-S-transferase
HO₂•: hidroperoxil
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HOCl: ácido hipocloroso
H₃PO₄: ácido fosfórico
H₂PO₄⁻: íon fosfato diácido
HPO₄²⁻: íon fosfato monoácido
K: núcleo em forma de rim/ notched
K⁺: potássio
L: núcleo lobado/ lobed
MN: micronúcleo
mg/L: miligrama por litro
min.: minuto

mL: mililitro
mM: milimolar
nM: nanomoles
 $\mu\text{g. L}^{-1}$: micrograma por litro
 Na^+ : íon sódio
 NO_3^- : íon nitrato
OD: oxigênio dissolvido
 O_2 : oxigênio
 $\text{O}_2\bullet^-$: radical superóxido
 O_3 : ozônio
 $^1\text{O}_2$: oxigênio singlet
 $\text{OH}\bullet$: radical hidroxil
 OH^- : íon hidroxil
pH: potencial hidrogeniônico
pm: picomol
Pu: plutônio
rpm: rotação por minuto
 $\text{RO}\bullet$: radical alcóxil
 $\text{ROO}\bullet$: radical peróxil
S: núcleo segmentado/blebbed
 SO_4^{2-} : anion sulfato
SOD: superóxido dismutase
TBARS: substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TCA: ácido tricloroacético
Th: tório
 $^{232}\text{Th}(\text{NO}_3)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: nitrato de tório
U: urânio
Vit. E: vitamina E

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Elementos-traço.....	16
1.1.1 Tório.....	17
1.2 Ecotoxicologia aquática.....	18
1.2.1 Testes ecotoxicológicos.....	19
1.2.2 Bioindicadores ecotoxicológicos.....	20
1.2.3 Biomarcadores ecotoxicológicos.....	22
1.3 Bioquímica e citogenética.....	23
1.4 Organismo teste em estudo (Jundiá).....	25
1.5 Objetivos.....	26
1.5.1 Geral.....	26
1.5.2 Específicos.....	26
1.6 Justificativa.....	27
2 ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
Resumo/Abstract.....	29
Introdução.....	30
Materiais e métodos.....	31
Resultados.....	34
Discussão.....	35
Agradecimentos.....	39
Referências.....	39
Tabela.....	44
Lista de figuras.....	45
Figuras.....	46
3 CONCLUSÕES.....	50
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Elementos-traço

A maioria dos elementos-traço faz parte da constituição da crosta terrestre como também dos organismos, embora em pequeníssimas concentrações. Nos ecossistemas aquáticos, estes podem sofrer modificações químicas, potencializando sua toxicidade ao meio (Harris, 1995). Através das cadeias alimentares, os elementos-traço são distribuídos pela biota do ambiente aquático, podendo atingir as populações humanas devido ao efeito cumulativo (Förstner, 1989).

Alguns elementos-traço são essenciais aos organismos aquáticos, possuindo importante papel no seu metabolismo. Entretanto, existem outros com funções biológicas desconhecidas e geralmente tóxicos a uma grande variedade de organismos. Em peixes, vários elementos-traço podem substituir o Ca^{2+} , alterando o funcionamento da bomba de Na^+/K^+ e causar lesões nas brânquias, prejudicando a regulação iônica podendo causar a morte (Janes & Playle, 1995).

As principais fontes de elementos-traço para o ambiente aquático continental são o intemperismo e a erosão de solos. Em rios, a carga total depende das características geológicas e ecológicas das bacias de drenagem e das atividades antropogênicas (Esteves, 1998). O transporte destes elementos é realizado sob a forma dissolvida ou sob forma de material particulado em suspensão. A disponibilidade dos elementos é influenciada pela concentração de matéria orgânica dissolvida, Como exemplo da potencialização tóxica que podem sofrer no ecossistema aquático, devido as transformações químicas está o mercúrio, que passa de fenil-mercúrio a metil-mercúrio, composto extremamente nocivo (Harris, 1971 *apud* Esteves, 1998).

A toxicidade dos elementos-traço está relacionada a sua capacidade de interferir em processos enzimáticos e a sua pouca mobilidade nos organismos, o que ocasiona a acumulação. Esta acumulação pode ocorrer em diversos tecidos, alterando processos fisiológicos em vários níveis (Esteves, 1998; Hook & Fisher, 2001).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a toxicidade dos elementos-traço. No caso do chumbo, o seu mecanismo de ação tóxica é a inibição enzimática, sendo a ação mais estudada a interferência na biossíntese do heme, a qual atua em

várias reações enzimáticas nos eritroblastos da medula óssea durante o processo de formação da hemoglobina (Mídio e Martins, 2000). As enzimas inibidas pelo chumbo são a ácido-deltaminolevulínico desidratase, coproporfirinogênio oxidase, ferro quelase e heme oxidase (Goyer, 1996).

Embora os elementos-traço possam não apresentar comportamento redox em sistemas biológicos, podem promover reações mediadas por radicais livres (Yamamoto *et al.*, 1989). A exposição a elementos-traço provoca aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou radicais livres, formados em consequência da redução incompleta do oxigênio durante processos de oxidação metabólica (Stohs & Bagchi, 1995, Novelli *et al.*, 1995, Papas, 1996).

1.1.1 Tório

O tório (Th) é um elemento que ocorre naturalmente no meio ambiente. Apresenta-se associado a outros minerais. Está presente em baixíssimas concentrações em todas as rochas, solo, água, nas plantas e animais. Nos solos sua quantidade média é de aproximadamente 6 ppm (6 partes de Th para um milhão de partes de solo). É usado na fabricação de cerâmicas, camisas para lâmpões a gás, na indústria aeroespacial e também pode ser utilizado como combustível, gerando energia nuclear (ATSDR & EPA, 1990).

O Th tem sido considerado pouco solúvel em água e sua presença é verificada em minerais de difícil dissolução. Entretanto, a formação de complexos inorgânicos com íons Cl^- , NO_3^- , H_3PO_4 , H_2PO_4^- , SO_4^{2-} , F^- , OH^- e HPO_4^{2-} e orgânicos como oxalatos, citratos e ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), favorece a sua mobilidade no ambiente hídrico. Fatores como pH e intensidade iônica também interferem na solubilização e mobilização do Th nas águas (Langmuir & Herman, 1980). Esse elemento também ocorre adsorvido no material particulado em suspensão na água, tanto inorgânico (argilas e colóides) como orgânico (Langmuir & Herman, 1980; Ferronsky & Polyakov, 1982).

O Th pode estar associado com urânio (Th/U) ou potássio (Th/K⁺). Tório e U são considerados bons elementos radioativos. Apesar de não se conhecer com exatidão a abundância total mundial deste metal, sabe-se que os depósitos de Th são cerca de

duas a três maiores que os de U (Ünak, 2000), por serem menos sujeitos à mobilização na crosta terrestre (Gabelman, 1977). As distribuições globais das reservas de Th e U demonstram que os países com maior potencial tecnológico tais como, EUA, Canadá, Austrália e França possuem maiores reservas de urânio e países com menor potencial como o Brasil, Turquia, Índia e Egito possuem consideráveis reservas de tório, sendo estes países possuidores de aproximadamente 70% da reserva global deste metal (Wilson, 1992). Essa distribuição geográfica justifica o fato dos países com maior potencial tecnológico de utilizarem U-234 e Pu-239 em suas aplicações nucleares na atualidade. Alguns países como a Índia, Federação Russa, Japão, China e Holanda já realizaram estudos visando à utilização do Th como combustível nuclear. Os resultados obtidos demonstraram que o combustível nuclear a partir do Th pode ser facilmente utilizado na maioria dos reatores nucleares atuais, que são operados com U, sem nenhuma modificação considerável (Mourogov, 1997). Estima-se que o Brasil possua as maiores reservas mundiais de Th (33% do total, cerca de 1200.000 toneladas), seguido pela Turquia (21%) e EUA (10,4%) (Wilson, 1992).

Anjos *et al.* (2005) verificaram que os níveis mais elevados de radioatividade em rochas brasileiras foram evidenciados em rochas ígneas, tais como os granitos, mas não constatarem limitações para seu uso comercial.

Em estudos realizados pela ATSDR & EPA (1990) foi avaliada a saúde de trabalhadores da indústria de extração de minério expostos a elevados níveis de Th no ar. Estes demonstraram alta incidência de câncer nos pulmões, pâncreas e sangue. Doenças associadas ao Th em humanos também podem atingir o fígado, ossos e rim. No Brasil estudos sobre a incorporação deste elemento em humanos foram realizados por Julião *et al.* (1994) e Lipsztein *et al.* (2001), os quais constatarem presença de Th em fezes e urina de trabalhadores de mineradoras de extração deste minério.

1.2 Ecotoxicologia aquática

A toxicologia ambiental e a ecotoxicologia são termos empregados para descrever o estudo científico dos efeitos causados sobre organismos vivos por substâncias químicas e ou xenobióticos presentes no ambiente. A expressão toxicologia ambiental é normalmente empregada em estudos que abordam os efeitos

sobre seres humanos e o termo ecotoxicologia é usado para designar o efeito desses compostos sobre o ecossistema e seus componentes não-humanos (Fernícola *et al.* 2003). Assim a ecotoxicologia alerta para as substâncias potencialmente causadoras de riscos, sugerindo a aplicação de medidas preventivas antes que ocorram graves danos aos ecossistemas naturais (Paasivirta, 1991).

A poluição hídrica ocasionada por elementos-traço vem sendo objeto de estudo devido a ampla utilização e distribuição dos mesmos no meio ambiente (Förstner, 1989). Durante as últimas três décadas tem aumentado o interesse da comunidade científica e agências regulatórias em relação à detecção e o conhecimento dos estressores ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas (Bickham *et al.*, 2000). Efeitos ocasionados por fatores de estresse ambiental e/ou substâncias xenobióticas podem ser avaliados por diversas metodologias através da utilização organismos bioindicadores e biomarcadores específicos.

1.2.1 Testes ecotoxicológicos

Testes ecotoxicológicos ou bioensaios determinam os efeitos tóxicos dos poluentes lançados a um corpo d'água e sua biota aquática, possibilitando inclusive o controle da bioacumulação desses poluentes nos tecidos dos organismos (Porto, 1991).

Os bioensaios podem ser classificados em três modalidades de acordo com o período de exposição dos organismos: agudos, semicrônicos e crônicos. Os testes agudos são aqueles realizados em um curto espaço de tempo, preferencialmente utilizando-se de indivíduos jovens, sendo medido os efeitos visualmente detectáveis em até 96 horas, como sobrevivência, alterações comportamentais e morte (Terra *et al.*, 2001).

Os testes semicrônicos visam aproximarem-se das condições naturais do ambiente, expondo organismos muito jovens até pelo menos o seu primeiro período reprodutivo, sendo observados além das alterações comportamentais, a curva de crescimento, sobrevivência, fertilidade e fecundidade. Os testes crônicos avaliam os efeitos em condição de exposição por longo período de tempo, fornecendo resultados mais próximos da realidade, sendo possível a observação de um ou mais ciclos de vida,

dando ênfase aos momentos mais sensíveis do desenvolvimento (nascimento, fase reprodutiva e senilidade). O ensaio mais utilizado é o semicrônico, sendo o agudo bastante utilizado em teste-piloto (Terra *et al.*, 2001).

Quanto ao sistema de exposição podem ser classificados em três categorias: estáticos, semi-estáticos e de fluxo contínuo. Os estáticos, quanto ao sistema de fluxo de água, são aqueles em que o meio inicial permanece durante toda exposição, e geralmente é utilizado em ensaios agudos, onde os indivíduos permanecem expostos por pequeno período. Os ensaios semi-estáticos são aqueles em que o meio é renovado em períodos regulares, normalmente em dias alternados, sendo este o modelo mais utilizado. São aplicados em ensaios crônicos e semicrônicos. Os testes de fluxo-contínuo renovam o meio constantemente, sendo a categoria menos utilizada (Terra *et al.*, 2001).

Para a avaliação dos efeitos agudos, os resultados dos experimentos podem ser expressos em CL50 (concentração letal a 50% dos organismos) ou CE 50 (concentração efetiva mediana a 50% dos organismos). As avaliações de efeitos crônicos e semicrônicos podem ser estimadas através do CENO (concentração de efeito não observado, onde CL 50 ou CE/10). Na avaliação de risco ecológico em ecossistemas aquáticos, uma substância é considerada segura desde que a concentração ambiental seja 10 a 100 vezes inferior àquela que causa efeitos tóxicos aos organismos teste (Bertoletti, 2001).

1.2.2 Bioindicadores ecotoxicológicos

Os bioindicadores quando utilizados para a obtenção de respostas às perturbações ambientais podem ser considerados sistemas vivos de referência (Lucchese, 1996). Os critérios para a escolha do organismo teste estão relacionados com a sua representatividade em relação a um determinado grupo de importância ecológica, a facilidade de manutenção em laboratório, sua estabilidade genética e ao fato de pertencerem à cadeia alimentar do homem (Rand, 1995).

Em estudos de ecotoxicidade são avaliados os efeitos causados às espécies por meio da exposição de organismos aquáticos representativos do ambiente a várias concentrações de uma ou mais substâncias, ou a fatores ambientais, por período

determinado. No Brasil a ecotoxicologia aquática ainda é uma ciência em franco desenvolvimento, existindo um amplo campo de estudos com organismos nativos (Bertoletti, 2001).

Nos programas de monitoramento biológico os peixes apresentam numerosas vantagens como organismos bioindicadores, devido à disponibilidade de informações sobre o ciclo de vida e por incluírem uma variedade de níveis tróficos (Harris, 1995).

Segundo Sinderman (1990), a poluição aquática está correlacionada com o aparecimento de neoplasias em peixes, demonstrando a possibilidade de indicação de carcinogênicos ambientais potencialmente perigosos para o homem. A análise morfológica de peixes, através de observações macroscópicas de órgãos (brânquias, gônadas, rins, fígado e tecido adiposo), ou observações microscópicas de células destes órgãos, podem servir também como métodos que visam à indicação e a obtenção de respostas a possíveis xenobióticos causadores de neoplasias e distúrbios morfológicos potenciais a espécie humana.

Estudos sobre a bioacumulação de poluentes nos tecidos podem ser feitos em nível celular, através de ensaios *in vitro* pela exposição de células retiradas do organismo ou *in vivo*, onde os mesmos são expostos ao tóxico e posteriormente retiradas às células para a avaliação do dano causado (Terra *et al.*, 2001).

Na modalidade *in situ*, são utilizados organismos expostos a situações de estresse ambiental, também podendo ser utilizada através da comparação dos resultados obtidos entre animais provenientes de populações expostas com as não expostas (Agostini, *et al.*, 1998; Bueno *et al.*, 1998; Bueno *et al.*, 2000; Khunen *et al.*, 1998). Os peixes são considerados os maiores vetores de transferência de contaminantes para humanos, sendo utilizados como indicadores potenciais de exposição a genotóxicos químicos em humanos. (Al-Sabti & Metcalfe, 1995).

A avaliação dos efeitos tóxicos de um poluente em órgãos e tecidos de peixes pode ser feita por diversos biomarcadores (Silva & Fonseca, 2003). Por exemplo, a avaliação da atividade de enzimas antioxidantes e os níveis de proteínas responsáveis por importantes funções na metabolização e detoxificação de agentes tóxicos são úteis na detecção de exposição subletal de peixes a xenobióticos (Livingstone, 1993; Bainy *et al.*, 1996). Também existem biomarcadores capazes de demonstrar danos

genotóxicos (Schmid *et al.*, 1971; Heddle *et al.*, 1973; Fenech, 2000; Au *et al.*, 2003) como o ensaio citogenético conhecido como teste de micronúcleo e a avaliação de outras freqüentes anormalidades nucleares.

1.2.3 Biomarcadores ecotoxicológicos

Denomina-se biomarcador ou indicador biológico o próprio xenobiótico, seus produtos de biotransformação ou respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais, que possam ser medidas em amostras de tecidos ou fluidos orgânicos, em organismos ou populações, que possam evidenciar exposição ou efeitos de um ou mais poluentes químicos ou radiações (Depledge, 1993, Leozio & Fossi, 1993; Who, 1999; Della Rosa *et al.*, 2003).

Os biomarcadores podem ser classificados de três formas: a) biomarcadores de exposição, b) biomarcadores de efeito e c) biomarcadores de suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição são os que indicam a dose interna ou a biodisponibilidade de um xenobiótico ou seus metabólitos em um organismo bioindicador exposto, avaliando efeitos adversos quali-quantitativamente. Podem envolver desde indicadores de estresse generalizado a indicadores específicos de exposição. A inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que ocorre especificamente para praguicidas organofosforados e carbamatos é um exemplo (Hill & Fleming, 1982; Guilhermino *et al.*, 1998).

Os biomarcadores de efeito são caracterizados pela indução de mecanismos de defesa celular como resposta adaptativa em nível molecular-bioquímico. Podem desencadear alterações fisiológicas ou histológicas, podendo ser reversíveis ou não, dependendo da capacidade do sistema ou órgão em responder ao agente tóxico. Não são específicos em relação aos estressores. Como exemplos estão as enzimas envolvidas no processo de peroxidação lipídica ou estresse oxidativo (Winzer *et al.*, 2001), indicativas de respostas adaptativas aos estressores.

Os biomarcadores de suscetibilidade avaliam a habilidade do organismo teste em responder à exposição a substância específica, sendo observados vários fatores

externos, como idade, idade, sexo, dieta, estado de saúde dos indivíduos utilizados. Embora no ambiente os organismos possam estar sujeitos à exposição similar, as diferenças genéticas em relação ao metabolismo podem produzir doses diferentes em um órgão-alvo, com diferentes níveis de resposta, sendo que os biomarcadores de susceptibilidade são capazes de refletir fatores adquiridos ou genéticos, influenciando a resposta à exposição (Ecetoc, 1995; Who, 2000). Um exemplo de efeito geneticamente associado à susceptibilidade é a fenilcetonúria em recém-nascidos. Exemplo de susceptibilidade adquirida é o desenvolvimento de hipersensibilidade a determinados gases ou partículas inaladas (Gleise *et al.*, 2001 *apud* Hacon, 2003).

Em resumo, além das classificações em relação ao estressor/bioindicador, os biomarcadores podem ser fisiológicos, quando envolvem respostas como alterações energéticas, relativas à maturação, reprodução e crescimento ou bioquímicos-celulares. A diminuição das defesas antioxidantes, quebra de cadeias de DNA, inibição da colinesterase são alguns dos biomarcadores bioquímico-celulares mais estudados (Nascimento *et al.*, 2006).

1.3 Bioquímica e citogenética

O metabolismo celular disponibiliza elementos intermediários como, por exemplo, mononucleotídeos, monossacarídeos e aminoácidos, os quais são utilizados para a síntese de ácidos nucléicos, proteínas, carboidratos e lipídios, etc... O metabolismo é regulado por várias enzimas. Quando algum agente estressor age no organismo podem ocorrer alterações na produção e na atividade enzimática. Estas alterações no sistema metabólico modificam a composição celular do organismo, sendo que o estado geral deste pode ser avaliado através de ensaios bioquímicos (Walker *et al.*, 1996; Roméo *et al.*, 2000).

Os peixes podem sofrer adaptações fisiológicas, utilizando vias metabólicas diferentes. Com a mudança do metabolismo celular as substâncias de reserva como (glicogênio, lipídios) e concentrações enzimáticas podem sofrer alterações quando em situações de estresse, como exemplo, pouca oxigenação na água, presença de substâncias tóxicas ou até mesmo durante exercício de natação (Baldisserotto, 2002).

No sistema biológico os organismos que utilizam O_2 na respiração estão sujeitos a inúmeros danos causados pela formação das espécies ativas de oxigênio (EAO). As EAO podem ser formadas durante o metabolismo normal de toda a célula e são espécies químicas capazes de existir de forma independente (Llesuy, 2002). Existem duas formas de EAO, as radicais e as não radicais. Como exemplos de EAO radicais estão, o ânion superóxido ($O_2\bullet$); hidroxil ($OH\bullet$); peroxil ($ROO\bullet$); alcoxil ($RO\bullet$) e hidroperoxil ($HO_2\bullet$) e não radicais, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); o ácido hipocloroso ($HOCl$); ozônio (O_3) e o oxigênio singlet (1O_2). As EAO levam ao estresse oxidativo, que está associado ao aumento na velocidade da geração de espécies oxidantes e/ou a diminuição na atividade dos sistemas de defesa, resultando em um aumento sustentado das concentrações em estado estacionário de EAO (González-Flecha *et al.*, 1991). Quando espécies de radicais livres são formadas intracelularmente, induzem a peroxidação lipídica, provocando danos ao DNA (Stohs & Bagchi, 1995) e degradação de proteínas (Regoli, 2000).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é uma reação em cadeia mediada por radicais livres, onde a extensão de propagação da cadeia depende da ação de compostos antioxidantes. Assim os efeitos tóxicos dos radicais livres são impedidos pela ação das defesas antioxidantes (Storey, 1996).

Nos peixes existem inúmeras situações que induzem ao desequilíbrio das reações de óxido-redução gerando EAO, como: exposição a xenobióticos (Gul *et al.*, 2004; Oruc *et al.*, 2004), alterações hormonais (Videla *et al.*, 1995), contaminação por parasitas (Belló *et al.*, 2000) entre outros. Inúmeras estratégias foram desenvolvidas tanto em mamíferos quanto em peixes para proteção contra danos oxidativos, tais como a prevenção da formação dos radicais livres através dos antioxidantes endógenos (enzimáticos e não enzimáticos) capazes de neutralizar o estresse oxidativo (Llesuy, 2002). O sistema enzimático é formado pelo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e glutatona-S-transferase (GST). Os antioxidantes não enzimáticos são glutatona (GSH), α -tocoferol (vit. E), caroteno, entre outros (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A genotoxicologia ou genética toxicológica avalia os efeitos genotóxicos em potencial, visto que são considerados pré-requisitos importantes para o

desenvolvimento de efeitos adversos à saúde, como o câncer (Ribeiro & Marques, 2003). Desta forma, estudos sobre os danos no DNA são importantes na genética toxicológica, uma vez que a mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese (Salvadori *et al.*, 2003), processo que envolve complexas interações entre vários fatores que podem ser endógenos (genéticos, hormonais, etc), ou exógenos (ambientais) (Paoliello & Silva, 2003). São considerados carcinógenos químicos, as fibras, filmes plásticos e metálicos em estado sólido (Mídio & Martins, 2000), bem como materiais radioativos e radiações ionizantes (Agudo, 2003).

Entre os ensaios citogenéticos, o teste de micronúcleo (MN) consiste na análise da frequência de MN, os quais se constituem de massas de cromatina com aparência de pequenos núcleos localizados no citoplasma, originados de material cromossômico não incorporado nos núcleos filhos durante a anáfase no processo de divisão celular. O teste de MN é muito eficiente para a detecção de quebras cromossômicas (clastogênese) e/ou perdas cromossômicas (aneugênese), sendo por isto um dos métodos citogenéticos mais utilizados para avaliação de genotoxicidade (Fenech, 2000). As outras alterações morfológicas celulares ou anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) são indicadoras de citotoxicidade (Cavas *et al.*, 2005), podendo ser classificadas como: núcleo segmentado/blebbed (S), lobado/lobed (L), ou em forma de rim/notched (K). O núcleo (S) apresenta pequena evaginação da membrana nuclear, no núcleo (L) a evaginação é mais larga e o núcleo (K) apresenta um corte bem definido com profundidade (Carrasco *et al.*, 1990; Matsumoto *et al.*, 2006).

Para as avaliações celulares do teste de MN utilizam-se células sanguíneas, porém outros tipos de tecidos também podem ser utilizados. Em peixes, 97% das células sanguíneas são eritrócitos e 3% leucócitos, dando assim uma alta homogeneidade à amostra (Mitchelmore & Chipman, 1998).

1.4 Organismo teste em estudo (jundiá)

A espécie em estudo, o jundiá *Rhamdia quelen*, Heptapteridae, é de grande importância econômica no Rio Grande do Sul, sendo uma espécie nativa bem adaptada em viveiros de piscicultura e muito utilizada por ser bastante consumida pela população. Pode ser encontrada desde o centro da Argentina até o sul do México

(Gomes *et al.*, 2000). No Brasil possui ampla distribuição, estando presente na maioria dos estados (Silfvergrip, 1996).

A coloração do jundiá varia de marrom-avermelhado claro a cinza, sendo um peixe de couro. A parte ventral do corpo é mais clara. A intensidade da sua coloração varia conforme a luminosidade do ambiente onde habita. Geralmente em ambientes com mais iluminação sua coloração tende a ficar mais clara do que em ambientes escuros. O comprimento máximo teórico calculado das fêmeas é de aproximadamente 66,5cm e dos machos de 52,0cm. O tempo de vida teórico estipulado também é maior em fêmeas, 21 anos, enquanto para os machos é de apenas 11 anos. A espécie habita águas calmas com fundo de areia e lama, junto às margens de lagos e rios. Possui hábitos noturnos escondendo-se durante o dia entre pedras e troncos, saindo à noite para alimentar-se. Os adultos possuem uma variada alimentação que inclui peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos, sendo omnívoros. As larvas alimentam-se de zooplâncton (Baldisserotto, 2004).

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo geral

Verificar o efeito de diferentes concentrações de tório na água através de parâmetros bioquímicos (metabólitos intermediários e danos oxidativos) e citogenéticos (MN e ANE) em jundiás.

1.5.2 Objetivos específicos

- Verificar se as diferentes concentrações de Th afetam parâmetros metabólicos (glicogênio, glicose, lactato, proteína e amônia) no tecido muscular de jundiás;
- Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de tório nos níveis de lipoperoxidação tecidual (TBARS) e as enzimas antioxidante catalase e glutatona-S-transferase em fígado e músculo esquelético de jundiás;

- Verificar os efeitos de diferentes concentrações de Th em eritrócitos de jundiás através de ensaio citogenético (teste de micronúcleo) e avaliação de outras anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE).

1.6 Justificativa

O tório é um elemento abundante na crosta terrestre, sendo expressivas as reservas existentes no Brasil. Além de ocorrer naturalmente no ambiente é bastante empregado na indústria. O conhecimento sobre o potencial toxicológico deste elemento em organismos aquáticos como peixes se faz necessário, visto que à medida que ocorre a ampliação do uso do Th em atividades antropogênicas aumentar-se-á o risco de contaminação ao ambiente. A contaminação hídrica, além de comprometer a biota aquática, pode através da cadeia trófica causar danos à saúde humana. Estudos ecotoxicológicos visam monitorar ou prevenir para que estes danos não venham a ocorrer.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

(Artigo em fase de preparação para ser submetido à publicação na Revista Aquatic Toxicology)

Bioquímica e citogenética de jundiás, *Rhamdia quelen*, expostos a diferentes concentrações de tório.

Lizelia M. Correa^a, Daiani Kochhann^a, Alexssandro G. Becker^a, Maria A.Pavanato^a,
Susana F. Llesuy^a, Vania L. Loro^b, Alice Raabe^b, Márcia Mesko^b, Érico M.M. Flores^b,
Valderi L. Dressler^b, Bernardo Baldisserotto^{a,*}

Departamento de Fisiologia e Farmacologia (a) e Departamento de Química (b),
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

* Autor para correspondência:
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria
97105-900, Santa Maria, RS, Brazil
Tel.: + 55 55 3220-9382; fax: + 55 55 3220-8241
E-mail: bernardo@smail.ufsm.br

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of thorium (Th) on the metabolism of silver catfish (*Rhamdia quelen*) through biochemical parameters from the muscle tissue (glycogen, glucose, lactate, protein and ammonia), lipidic peroxidation levels (TBARS), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) in the hepatic and muscular tissues and cytogenetic parameters through the evaluation of nuclear abnormalities in blood cells. Silver catfish juveniles ($8.78 \pm 0.10\text{cm}$; $6.41 \pm 0.17\text{g}$) were exposed to different waterborne concentrations of ^{232}Th (in $\mu\text{g.L}^{-1}$): 33.6 ± 8.7 ; 106.5 ± 37.1 ; 191.6 ± 19.0 and 758.4 ± 150.4 for 15 days. The levels of muscle glycogen were significantly reduced in fish exposed to $106.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th, while glucose and protein increased in those exposed to $758.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th. Lactate levels were higher in fish maintained at $191.6 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th and ammonia was higher in those exposed to 33.6 , 106.5 and $191.6 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th. The lipidic peroxidation levels were diminished in the liver of silver catfish exposed to all tested concentrations of Th. In the muscle lipidic peroxidation was higher in juveniles maintained at $106.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th and lower in those exposed to 191.6 and $758.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th. The CAT activity was higher in the hepatic tissue (but not muscle) of fish exposed to all tested concentrations of Th. The GST activity in the liver was lower in fish exposed to 33.6 and $106.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th, and in the muscular tissue of those maintained at $758.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th. Silver catfish exposed to $106.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ presented a significant induction of micronuclei, but no alterations in other erythrocyte abnormalities were observed. These results suggest that exposure to waterborne Th induces changes on the metabolic state, increase of lipidic peroxidation in the liver, some alterations of CAT and GST, and DNA damage.

Keywords: fish, stress oxidative, micronuclei, ecotoxicology.

Introdução

Os elementos traço compõem um grupo muito importante de tóxicos ambientais, com capacidade de causar danos fisiológicos para muitos organismos (Flower, 1975). A contaminação de organismos por elementos-traço é estudada em diferentes grupos de animais, existindo várias pesquisas utilizando peixes (Poston, 1982; Paine et al., 2000; Lemos et al., 2001; Barillet et al., 2005; Buet et al., 2005; Ahmad et al., 2006). O tório (Th) ocorre predominantemente como um cátion tetravalente, sendo um constituinte traço em fosfatos, óxidos simples e múltiplos e silicatos, dentre outros minerais (Ivanovich & Harmon, 1982). Estima-se que o Brasil possua as maiores reservas mundiais de Th (33% do total, cerca de 1200.000 toneladas), seguido pela Turquia (21%) e EUA (10,4%) (Wilson, 1992), Cerca de 13.000 trabalhadores brasileiros são expostos ao Th em indústrias de extração de areia monazítica, indústrias da produção de camisas para lâmpões a gás, eletrodos de lâmpadas solares, células fotoelétricas e reatores nucleares (Wilson, 1992, Julião et al., 1994).

Avaliações do comportamento do tório em águas de oceanos e águas doces de rios e subterrâneas tem sido objeto de estudos de vários autores (Moore & Sackett, 1964; Langmuir & Herman 1980; Bacon & Anderson, 1982; Lei, 1984; Anderson et al., 1995). Valores de Th entre $0,64 \pm 0,20 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $4,5 \pm 0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ foram encontrados em águas de oceanos (Moore & Sackett, 1964) e $0,02$ e $0,24 \mu\text{g.L}^{-1}$ em águas não filtradas (Somayajulu & Goldberg, 1966) No Brasil, Lei (1984), obteve resultados de $0,02$ e $0,24 \mu\text{g.L}^{-1}$ para ^{232}Th dissolvido em águas subterrâneas filtradas.

Biomarcadores celulares são importantes ferramentas na avaliação de exposição de organismos a agentes tóxicos que podem causar morte ou alterar a estrutura e a função de alguns órgãos vitais de peixes (Au et al., 1999). Diferentes autores sugerem que em diversos tecidos existem alterações no equilíbrio oxidativo em várias espécies de peixes (Radi & Matkovics, 1988; DiGiulio et al., 1989; Mather-Mihaich & DiGiulio, 1991; Ahmad et al., 2000). O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e agentes antioxidantes com a potencialidade de exercer efeitos deletérios, podendo danificar macromoléculas tais como DNA, lipídios e proteínas (Halliwell & Gutteridge, 1999). Para combater este estresse oxidativo existe o

sistema de defesa antioxidante do qual participam enzimas e outros compostos de natureza não-enzimática. Entre os principais sistemas de enzimas antioxidantes encontram-se a catalase (CAT) e a glutationala-S-transferase (Storey, 1996; Trenzado et al., 2006).

Entre os testes utilizados para investigar a genotoxicidade, o teste de micronúcleo (MN) tem se provado um sensível indicador de danos cromossômicos e tem sido utilizado com sucesso (Al-Sabti et al., 1994; Al-Sabti & Metcalfe, 1995). As alterações na morfologia nuclear, como a formação de micronúcleos, indicam genotoxicidade enquanto a presença de outras anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE), são indicadoras de citotoxicidade (Cavas et al., 2005).

O único estudo de exposição de Th em organismos aquáticos foi efetuado em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), demonstrando uma baixa acumulação corporal (Poston, 1982). Portanto, este trabalho visa avaliar a toxicidade do tório através da análise de parâmetros metabólicos do músculo esquelético, parâmetros oxidantes em fígado e músculo esquelético e parâmetros citogenéticos em eritrócitos de jundiás, *Rhamdia quelen*, expostos a esta substância na água.

Materiais e Métodos

Peixes

Foram utilizados juvenis de jundiá ($8,78 \pm 0,10\text{cm}$; $6,41 \pm 0,18\text{g}$) oriundos do setor de Piscicultura da UFSM, Santa Maria (RS). Os jundiás foram aclimatados por duas semanas no Laboratório de Fisiologia de Peixes da UFSM, onde permaneceram durante este período em caixas de 250 L, com temperatura em torno de 23°C . Após a aclimação, os peixes foram mantidos por 15 dias em caixas de 40 L com aeração constante, (07 juvenis por caixa), sendo expostos as concentrações 0 (controle), $33,6 \pm 8,7$; $106,5 \pm 37,1$; $191,6 \pm 19,0$ e $758,4 \pm 150,4$ de Th em $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para cada concentração de Th foram feitos testes em triplicata. O aumento dos níveis de Th na água foi efetuado com a adição de $^{232}\text{Th}(\text{NO}_3)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (BDH Chemical Ltda, England Analar®, pureza >99%, composto de baixa radiotoxicidade).

Realizou-se limpeza das caixas diariamente por sifonagem, retirando-se os resíduos (fezes e restos de ração) e substituindo a água por outra nas mesmas condições. A renovação diária foi de aproximadamente 20-40% do total. Os jundiás foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial para juvenis Supra (42% CP, Alisul alimentos S.A., Carazinho, Brasil).

Após o período experimental os animais foram colocados em recipiente contendo água e gelo por 5 min para anestesia, em seguida coletado sangue da veia caudal utilizando seringas heparinizadas. Os peixes foram então sacrificados por secção da medula espinhal sendo retiradas os tecidos (fígado e músculo esquelético), os quais foram imediatamente congelados em argônio líquido e levados a freezer -70°C, para posterior análise de metabólicos e atividades enzimáticas.

Parâmetros metabólicos

Amostras de músculo esquelético foram homogeneizadas numa proporção de 100 mg/mL de ácido tricloroacético 20%, utilizando-se um homogenizador tipo Potter-Elvehjem a 1000 rpm por 3 min em banho de gelo. Logo após o homogeneizado foi centrifugado a 3000 x g durante 3 min, sendo utilizados os sobrenadantes (extratos ácidos) obtidos para as determinações. Os metabólitos foram dosados conforme as metodologias a seguir: glicogênio (Bidinotto et al., 1998), açúcares redutores (Dubois et al., 1956), lactato (Harrower & Brown, 1972), proteína (Lowry et al., 1951) e amônia (Verdouw et al., 1978).

Parâmetros oxidantes

O restante da amostra de músculo esquelético e fígado foram homogeneizados com buffer fosfato pH 7,4 e centrifugados a 600g durante 10 min. Os níveis de lipoperoxidação tecidual (TBARS) foram analisados por meio da produção de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico segundo o método de Buege e Aust (1978). A atividade da catalase foi verificada de acordo com Boveris & Chance (1973), pelo consumo de peróxido de hidrogênio em solução 10 nM. Para a análise de glutatona-S-transferase (GST) os tecidos foram homogeneizados com buffer fosfato pH

7,4 e centrifugados a 600g durante 10 min. Com o sobrenadante se determinou a GST de acordo com Habig et al. (1974).

Parâmetros citogenéticos

Para avaliação da frequência de MN em eritrócitos utilizou-se os critérios descritos por Countryman & Heddle (1976) e Fenech (1993). Os esfregaços sanguíneos foram feitos com uma gota de sangue para cada lâmina de microscopia 26x76 mm, em um ângulo de 45°. Após 24h as mesmas foram fixadas em metanol 100 % durante 10 min e posteriormente coradas com Giemsa 4 % por 10 min. A observação de eritrócitos foi realizada em microscópio com objetiva de 1000 x, sendo analisadas 2000 células por indivíduo (7 peixes por tratamento e 2 lâminas por peixe). Além da análise de MN, nessas lâminas foram analisadas a presença de outras anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE), tais como núcleo lobado, segmentado ou em forma de rim.

Parâmetros físico-químicos da água

A determinação da temperatura ($21,7 \pm 0,1$ °C) e do oxigênio dissolvido ($6,24 \pm 0,05$ mg.L⁻¹) foi efetuada em dias alternados com oxímetro YSI, modelo Y5512 (YSI Inc., Yellow Springs, USA). O pH ($7,6 \pm 0,01$) também foi medido em dias alternados utilizando-se um pHmetro Quimix (modelo 400A). Amostras de água foram coletadas a cada 5 dias e congeladas para posterior análise de amônia total ($0,20 \pm 0,01$ mg.L⁻¹) pelo método baseado na formação do indofenol (salicilato- hipoclorito) (Verdouw et al., 1978), alcalinidade ($33,9 \pm 0,5$ mg.L⁻¹ CaCO₃) e dureza total ($24,8 \pm 0,5$ mg.L⁻¹ CaCO₃) da água através de titulometria segundo Greenberg et al. (1976), A determinação da concentração de Th na água foi realizada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP - MS) Elan DRC II Perkin Elmer SCIEX (USA).

Análise estatística

A homogeneidade das variâncias entre os diferentes tratamentos foi analisada pelo teste de Levene. Os dados de glicogênio, proteína, glicose, lactato e amônia (músculo esquelético) e a atividade da CAT (fígado) apresentaram variâncias

homogêneas, de modo que foi utilizada uma análise de variância de um fator e teste de Dunnet. Para os parâmetros onde não houve homogeneidade de variâncias entre os tratamentos, como TBARS, atividade da GST e frequência de MN e ANE, utilizou-se o teste de análise de variância Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney, efetuados através do programa Statistica (versão 5.1, 1997). O nível mínimo de significância foi de 95% ($p < 0,05$). Todos os dados estão expressos como média \pm erro padrão.

Resultados

Ao final de 15 dias, os níveis de glicogênio no músculo esquelético foram significativamente menores nos jundiás expostos a $106,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th (49% em relação aos controles), enquanto que os mantidos nas demais concentrações de Th não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos controles. Os valores de glicose e proteína muscular dos jundiás expostos a $758,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th foi significativamente maior que nos controles (36 e 41%, respectivamente), não ocorrendo diferença significativa nos exemplares mantidos nas demais concentrações de Th em relação aos controles. Os valores do lactato muscular foram significativamente maiores nos jundiás submetidos a $191,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th que nos controles (25%), não sendo constatada diferença significativa nos juvenis mantidos nas demais concentrações de Th quando comparados aos grupos controles. Os níveis de amônia muscular nos jundiás expostos a $33,6$, $106,5$ e $191,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th foram significativamente maiores que nos controles (41, 43 e 43%, respectivamente), não sendo observada diferença significativa nos expostos a $758,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th em relação ao grupo controle (Tabela 1).

O fígado dos jundiás expostos a todas as concentrações de Th testadas apresentou níveis significativamente menores de lipoperoxidação lipídica que os jundiás controles (25, 43, 30 e 19%, respectivamente) (Fig. 1A).

No músculo esquelético observou-se níveis significativamente maiores de lipoperoxidação lipídica nos jundiás mantidos em $106,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th (90%) e significativamente menores nos expostos a $191,6$ e $758,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th (86 e 50%, respectivamente) em relação aos controles. Nos jundiás expostos a $191,6$ e $758,4 \mu\text{g.L}^{-1}$

¹ Th não foram constatadas diferenças significativas na lipoperoxidação lipídica do fígado em relação aos controles (Fig. 1B).

A atividade da CAT no fígado de jundiás expostos a todas as concentrações de Th testadas foi significativamente maior que nos controles (129, 97, 87 e 85%, respectivamente) (Fig.2A).

No músculo esquelético dos jundiás expostos a todas concentrações testadas de Th não foi observada diferença significativa na atividade da CAT em relação aos grupos controles (Fig. 2B).

A atividade da GST no fígado de jundiás expostos a 33,6 e 106,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Th foi significativamente menor que nos controles (76 e 63%, respectivamente). Jundiás mantidos nas demais concentrações de Th não apresentaram diferença significativa na atividade da GST do fígado em relação aos controles (Fig. 3A).

No músculo esquelético dos exemplares expostos a 758,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Th a atividade da GST foi significativamente menor que nos controles (88%), não sendo verificadas diferenças estatísticas entre os demais grupos (Fig. 3B).

Jundiás controles não apresentaram MN nos eritrócitos, mas exemplares expostos a concentrações de 106,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Th ou maiores apresentaram um número significativamente maior de MN que os controles. A exposição ao Th na água não alterou significativamente o número de ANE dos jundiás (Fig. 4).

Discussão

A absorção dos metais pode ser diretamente pela água ou indiretamente através da cadeia alimentar (Bentley, 1992; Hamilton et al, 1998). O tório é um elemento-traço natural presente nos ecossistemas aquáticos, sendo utilizado em várias atividades antropogênicas, possuindo potencial para utilização como combustível nuclear. A ampliação do uso deste elemento pode resultar no aumento da concentração deste actínídeo na água, sedimento e nos organismos aquáticos (Poston, 1992). Este autor observou que em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) baixa bioacumulação de Th nos tecidos destes organismos, observando presença deste elemento no trato gastrointestinal após exposição a soluções de ²²⁸⁺²³²Th. A presença de Th em águas

subterrâneas filtradas brasileiras foi registrada por Lei (1984), sendo constatado valores entre 0,02 e 0,24 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para ^{232}Th dissolvido. As concentrações de Th de sólidos em suspensão foram verificadas por Tonetto & Bonotto (2002), sendo constatado valores de 183 a 3445 $\mu\text{g.g}^{-1}$, revelando a possibilidade de transporte significativo de Th sob esta forma. O presente estudo verificou nos tecidos musculares dos jundiás expostos a 106,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Th uma redução de 49% do glicogênio e um aumento de 25% do lactato muscular na concentração 191,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Th em relação aos seus controles. Estes índices podem indicar que o glicogênio está sendo degradado a lactato para compensar a situação de estresse provocada pela exposição ao Th, sugerindo uma acomodação fisiológica do tecido nestas concentrações de tório presentes na água.

Na glicose muscular observou-se um aumento de 36% nos peixes expostos a 758,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Th. Esta elevação pode ser decorrente do aumento da taxa de captação de glicose por este tecido.

Observou-se uma elevação para os níveis de proteína muscular de 41% em 758,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Th e na amônia muscular nas concentrações 33,6; 106,5 e 191,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Th, (41, 43 e 43%, respectivamente) relacionados aos grupos controles. O catabolismo das proteínas utilizado para fornecer energia poderia estar aumentando a síntese protéica (Sahib et al., 1984) sugerindo ser uma resposta do organismo como medida compensatória a uma alta demanda energética. A amônia tem sua origem deste catabolismo protéico, sendo a principal forma de excreção nitrogenada da maioria dos organismos aquáticos (Sancho et al, 1998; Jobling, 1995). O aumento do catabolismo protéico gera aumento da amônia, conseqüentemente.

Os resultados obtidos em tecido muscular demonstram ser pouco precisos para uma avaliação conclusiva sobre os efeitos do Th no metabolismo dos jundiás. Embora o perfil metabólico muscular de jundiás frente às concentrações testadas possa sugerir esforço adaptativo da espécie à substância tóxica em estudo, não podemos indicar processo fermentativo por déficit de oxigênio sem avaliar as taxas metabólicas em outros tecidos também envolvidos no processo metabólico, como o tecido hepático e o sanguíneo (plasma).

A relação entre ao aumento da atividade da CAT e a depleção nos níveis de TBARS no fígado dos jundiás sugere resposta ao estresse oxidativo, visando equilíbrio

entre as defesas antioxidantes e pró-oxidantes. A supressão da atividade GST no tecido hepático não sugere um mecanismo compensatório, podendo resultar em danos oxidativos. A depleção nas atividades da CAT e da GST no tecido muscular sugere a incapacidade deste órgão em detoxificar adequadamente o Th do organismo do peixe.

O fígado é o principal sítio de metabolização e distribuição de xenobióticos em peixes (Ahmad et al., 2000), e a queda nos índices de peroxidação lipídica no fígado e no músculo de *R. quelen* sugere existir diferentes sensibilidades nos dois tecidos estudados. O comportamento da CAT entre os dois órgãos também foi distinto. A CAT uma enzima que facilita a remoção de peróxido de hidrogênio é encontrada nos peroxissomas, servindo como biomarcador para um importante grupo de carcinogênicos não genotóxicos no ambiente aquático (Huggett et al., 1992). O aumento na atividade da CAT no fígado de bagre de canal, *Ictalurus punctatus*, expostos a efluentes de indústria de celulose foi evidenciado por Mather-Mihaich & DiGiulio (1991), que atribuíram este fato à proliferação de peroxissomas embora tenha sido evidenciado diminuição da atividade da CAT neste mesmo órgão em tilápias expostas a ambiente poluído (Bainy, 1996).

Embora o fígado seja o local onde se encontra a maior concentração da enzima GST em vertebrados (Huggett et al., 1992), nosso estudo constatou diminuição da atividade da GST nos dois órgãos estudados. As diferenças quantitativas nas defesas antioxidantes observadas em diferentes espécies de peixes já estudadas são grandes (Wilhelm Filho & Marcon, 1996), dificultando a possibilidade de correlação entre a atividade das enzimas antioxidantes com os aspectos fisiológicos dos peixes (Winston, 1991). A resistência a situações de estresse entre as espécies e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie pode ocorrer devido à variação individual na expressão genética ou exposição individual a outros estressores (Cooper, 2002). Os metais traço podem aumentar a formação intracelular de espécies ativas de oxigênio (EAO) através da reação de Fenton/Haber-Weiss e de substâncias metabolizadas, formando compostos intermediários no ciclo redox (Winston, 1991). Em peixes a exposição a metais é conhecida também por promover alterações nos parâmetros hematológicos (Heath, 1995).

Através do ensaio citogenético observaram-se alterações na frequência de micronúcleos entre as concentrações de Th testadas. Foi observada maior indução de MN nas concentrações 191,6; 106,5 e 33,6 $\mu\text{g. L}^{-1}$, indicado aumento na formação de acidentes clastogênicos. Na avaliação de ANE, tais como núcleo segmentado, lobado ou em forma de rim (Carrasco et al., 1990; Matsumoto et al., 2006), não foi verificada diferença significativa, não sendo evidenciado citotoxicidade.

Estudos realizados por Lemos et al. (2001) apontam genotoxicidade em *Pimephales promelas* exposto a cromo (VI) durante 7, 14 e 21 dias, sendo constatada a maior expressão de micronúcleos em eritrócitos dos peixes expostos até 7 dias. O cádmio também apresenta-se como um perigoso clastogênico, desencadeando quebras cromossomais, trocas de cromátides irmãs e formação de micronúcleos (Karmakar et al., 1998, Kasuba et al., 2000). Para Karmakar et al., (1998), o cádmio possui a capacidade de produzir uma depressão dependente da detoxificação da GST mediada pela glutathiona (GSH), sendo muito provavelmente associada à indução de aberrações cromossômicas. Barillet et al., (2005) realizaram estudo utilizando *Danio rerio* expostos ao urânio, elemento com características químicas de metal de transição, com potencial de radiotoxicidade que ocorre naturalmente no ambiente. Foi demonstrando efeitos genotóxicos nos peixes. Quanto maior o nível da concentração de exposição maior foram os danos em eritrócitos.

O Th possui características químicas semelhantes ao urânio. As reservas mundiais de urânio são limitadas, sendo que num futuro próximo a utilização de Th poderá crescer consideravelmente, tornando importante não só o conhecimento das potencialidades comerciais e industriais deste metal, mas também o conhecimento do potencial tóxico à saúde humana.

Os resultados deste trabalho sugerem que as alterações sofridas pelo organismo em estudo ocorrem nas menores concentrações de Th, tanto para avaliações de ordem metabólica, enzimática e citogenética. A avaliação dos intermediários metabólitos em músculo esquelético, embora não conclusivos demonstram alterações, provavelmente devido ao estresse causado pela exposição ao Th. Os parâmetros que melhor responderam aos efeitos do Th no organismo dos jundiás, foram a avaliação da atividade das enzimas CAT e GST e o uso do teste de MN. Os resultados da CAT e

GST nos tecidos hepático e muscular de *Rhamdia quelen* sugerem que as atividades enzimáticas possam ser estimuladas nas menores concentrações de Th e inibidas nas mais elevadas (principalmente na 758,4 $\mu\text{g. L}^{-1}$). O uso do ensaio citogenético contribui para esta hipótese, sendo constatado maior genotoxicidade nas amostras sanguíneas das concentrações 106,5 e 191,6 de Th $\mu\text{g. L}^{-1}$.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Capes pela bolsa concedida à primeira autora deste manuscrito.

Referências

- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S.K. Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctulatus Bloch*) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1523, 37-48.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2006. *Anguilla anguilla*, L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chem.* 65, 952-962.
- Al-Sabti, K., Franko, M., Andrijanic, B., Knez, S., Stegnar, P., 1994. Chromium-induced micronuclei in fish. *J. Appl. Toxicol.* 13(5), 333-336.
- Al-Sabit K., Metcalfe, C. D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121-135.
- Anderson, P.S., Wasserburg, G.J., Chen, J. H., Papanastassiou, D.A., Ingri, J., 1995. ^{238}U - ^{234}U and ^{232}Th - ^{230}Th in the Baltic Sea and river water. *Earth Planet. Sci Lett.* 130, 217-234.
- Au W.W., Torres, C.H.S., Salazar N.C. & Salama A.S., 1999. Inheritance of polymorphic metabolizing genes and environmental disease and quality of life. *Mutat Res*, 428,131-140.
- Bacon, M.P. & Anderson, R.F., 1982. Distribution of thorium isotopes between dissolved and particulate forms in deep sea. *J. Geophys. Res.* 87, 2045-2056.

- Bainy A.C.D, Saito E., Carvalho P.S.M., Junqueira V.B.C., 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology*. 34, 151-162.
- Barillet, S., Buet, A.; Adam, C. & Devaux, A., 2005. Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection*, 40(1), 175-181.
- Bentley, P.J., 1992. Influx of zinc by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): uptake from external environmental solutions. *Comp. Biochem. Physiol.* 101, 215-217.
- Bidinotto, P.M., Moraes, G., Souza, R.H.S., 1998. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. *Boletim Técnico CEPTA, Pirassununga*, 10, 53-60.
- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 134, 707-716.
- Buege, J.A. & Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology*. 52: 302-309.
- Buet, A.; Barillet, S. & Camilleri, V., 2005. Changes in oxidative stress parameters in fish as response to direct uranium exposure. *Radioprotection*, 40(1), 151-155.
- Carrasco, K.R., Tilbury, K. L, Mayers, M.S., 1990. Assessment of the piscine micronuclei test as *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 47, 2123-2136.
- Cavas, T., Garanko, N., Arkhipchuk, V., 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fish subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food Chem. Toxicol.* 43, 569-574.
- Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A. & West, T.L., 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Exp. Mar. Biol.Ecol.* 279, p. 1-20.
- Countryman, P.I. & Heddle, J.A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 41, 321-332.
- DiGiulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol.Chem.* 8,1103-1123.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.K., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-358.
- Fenech, M., 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 285, 35-44.
- Flowler, B.A., 1975. Heavy metals in the environment an overview. *Environ. Health persp.* 10, 259-260.
- Greenberg, A.E., Taras, M.J., Rand, M.C., 1976. Standard methods for the examination of water and wastewater, 14. Bru-El Graphic Inc., Springfield.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C., Free radicals in biology and medicine. 3 ed., Oxford University Press, 1999.
- Hamilton, D.P., Malik, D.S., Sastry, K.V., 1998. Effects of zinc toxicity on biochemical composition of muscle and liver of murrel (*Channa punctatus*). *Environ International.* 24(4), 433-438.
- Harrower, J.R., Brown, C.H., 1972. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter sample. *J. App. Phys.* 32(5), 224-228.
- Heath, A.G. Water pollution and fish physiology. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, Florida, 245p. 1995.
- Hedde, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., Macgregor, J.T., Newell G.W., Salamone, M.F., 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. U.S. Environmental Protection Agency Report. Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 123, 61-118.
- Huggett, R.J., Kimerle R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L., 1992. Biomarkers: biochemical, physiological e histological markers of anthropogenic stress. SETAC, Lewis Publishers. 347p.
- Ivanovich, M., Harmon, R.A., 1982. Uranium-series disequilibrium: applications to earth, marine, and environmental sciences. Oxford, Clarendon Press, 571 p.
- Jobling, M. Human impacts on aquatic environments, In: Jobling, M. (Ed.) *Environmental biology of fishes*, London: Chapman & Hall, 1995.

- Julião, L.Q.C., Lipsztein, J.L., Azeredo, A.M.G.F., Dantas, B.M. & Dias Da Cunha, K.M. A., 1994. Thorium worker's bioassay data. *Radiation Protection Dosimetry*. 53 (1-4), 285-288.
- Karmakar, R., Banik, S.; Bandyopadhyay, S., Chatterjee, M., 1998. Cadmium-induced alterations of hepatic lipid peroxidation, glutathione S-transferase activity and reduced glutathione level and their possible correlation with chromosomal aberration in mice: a time course study. *Mutat. Res. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 397 (2), 183-190.
- Kasuba, V., Rozgaj, R., Saric, M.M., Blanusa, M., 2002., Evaluation of genotoxic damage of cadmium chloride in peripheral blood on suckling rats. *J. Appl. Toxicol.* 22(4), 271-277.
- Langmuir, D., Herman, J.S., 1980. The mobility of thorium in natural waters at low temperatures. *Geochim Cosmochim Acta*. 44, 1753-1766.
- Lei, W. Thorium mobilization in a terrestrial environment. Medical Center , New York University, New York, Ph.D.Thesis,414p. 1984.
- Lemos, C.T.L., Rödel, P.M., Terra, N.R. & Erdtmann, B., 2001. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environ. Toxicol.Chem.* 20(6),1320-1324.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Folin Phenol Reagent. *J. Bio Chem.* 193, 265-275.
- Mather-Mihaich, E., Di Giulio, R.T., 1991. Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a beached kraft mill effluent. *Ach. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 391-397.
- Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Malagutti, M.I.A., Dias, A.L., 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology Society of Genetics*.29(1), 148-158.
- Moore, W.S. & Sackett, W.M., 1964. Uranium and thorium series inequilibrium in sea water. *J. Geophys. Res.* 69, 5401-5405.

- Paine, M.J.I., Garner, A.P., Powell, D., Sibbald, J., Sales, M., Pratt, N., Smith, T., Tew, D.G., and Wolf, C.R., 2000. Cloning and characterization of a novel human dual flavin reductase. *J. Biol. Chem.* 275, 1471–1478.
- Poston, T.M., 1982. Observations on the bioaccumulation potential of thorium and uranium in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 28, 682-690.
- Radi, A.A.R. & Matkovics, B., 1988. Effects of metal ions on the antioxidant enzymes activities, proteins contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 90,69 -72.
- Sahib, I.K.A., Sambasiva Rao, K.R.S., Ramana Rao, K.V., 1984. Effect of malathion on protein synthetic potentiality of the tissues of the teleost, *Tilapia mostambica* (Peters), as measured through incorporation of (14C) amino acids. *Toxicol. Lett.* 20, 63-67.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Fernández, C. Andreu, E., 1998. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 168-175.
- Storey, K.B., Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J.Med Bio Res.* 29, 1715 - 1733.
- Tonetto, E.M., Bonotto, D.M., 2002. Mobilização de tório em águas subterrâneas de Águas da Prata, estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Geociências.* 32(3), 343-350.
- Trenzado, C., Hidalgo, M.C., Garcia-Gallego, M., Morales, A.E., Furné, M., Domezain, J., Sanz, A., 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A Comparative study. *Aquaculture.* 254,758-767. Elsevier.
- Verdouw, H., Vanechteld, C.J.A., Deckkers, E.M.J., 1978. Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12, 399-402.
- Wilhelm Filho, D. & Marcon, J.L., 1996. Antioxidant defenses in fish of the Amazon. In: *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon, Manaus*, p. 299-312.
- Wilson, D.J., 1992. The use of thorium as an alternative nuclear fuel, Australian Atomic Energy Commission, Research Establishment.
- Winston, G.W., 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp.Biochem. Physiol.* 100, 173-176.

Tabela 1. Parâmetros metabólicos em músculo de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações de Th por 15 dias.

Th ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Glicogênio ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	Glicose ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	Lactato ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	Proteína ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	Amônia ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
0	21,29 \pm 1,18	0,14 \pm 0,01	24,89 \pm 0,25	188,22 \pm 5,97	5,10 \pm 0,36
33,6	20,26 \pm 1,32	0,16 \pm 0,01	27,46 \pm 1,19	200,37 \pm 7,31	7,20 \pm 0,26 *
106,5	10,84 \pm 1,9 *	0,14 \pm 0,01	27,54 \pm 1,04	203,46 \pm 2,72	7,31 \pm 0,19 *
191,6	18,66 \pm 0,38	0,18 \pm 0,01	31,12 \pm 1,29 *	203,46 \pm 4,93	7,31 \pm 0,25 *
758,4	17,48 \pm 1,20	0,19 \pm 0,01*	24,82 \pm 1,19	264,79 \pm 2,30 *	6,28 \pm 0,35

Dados expressos como média \pm EP (n=7). * Significativamente diferente aos grupos controles ($p < 0.05$).

Figura 1. Avaliação de TBARS fígado (A) e músculo esquelético (B) de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações de tório por 15 dias. * Significativamente diferente aos grupos controles ($p < 0.05$).

Figura 2. Avaliação de catalase em fígado (A) e músculo esquelético (B) de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações de tório por 15 dias. * Significativamente diferente aos grupos controles ($p < 0.05$).

Figura 3. Avaliação de glutathione transferase em fígado (A) e músculo esquelético (B) de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações de tório por 15 dias. * Significativamente diferente aos grupos controles ($p < 0.05$).

Figura 4. Avaliação de anormalidades eritrocíticas em *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações de tório por 15 dias. * Significativamente diferente aos grupos controles ($p < 0.05$).

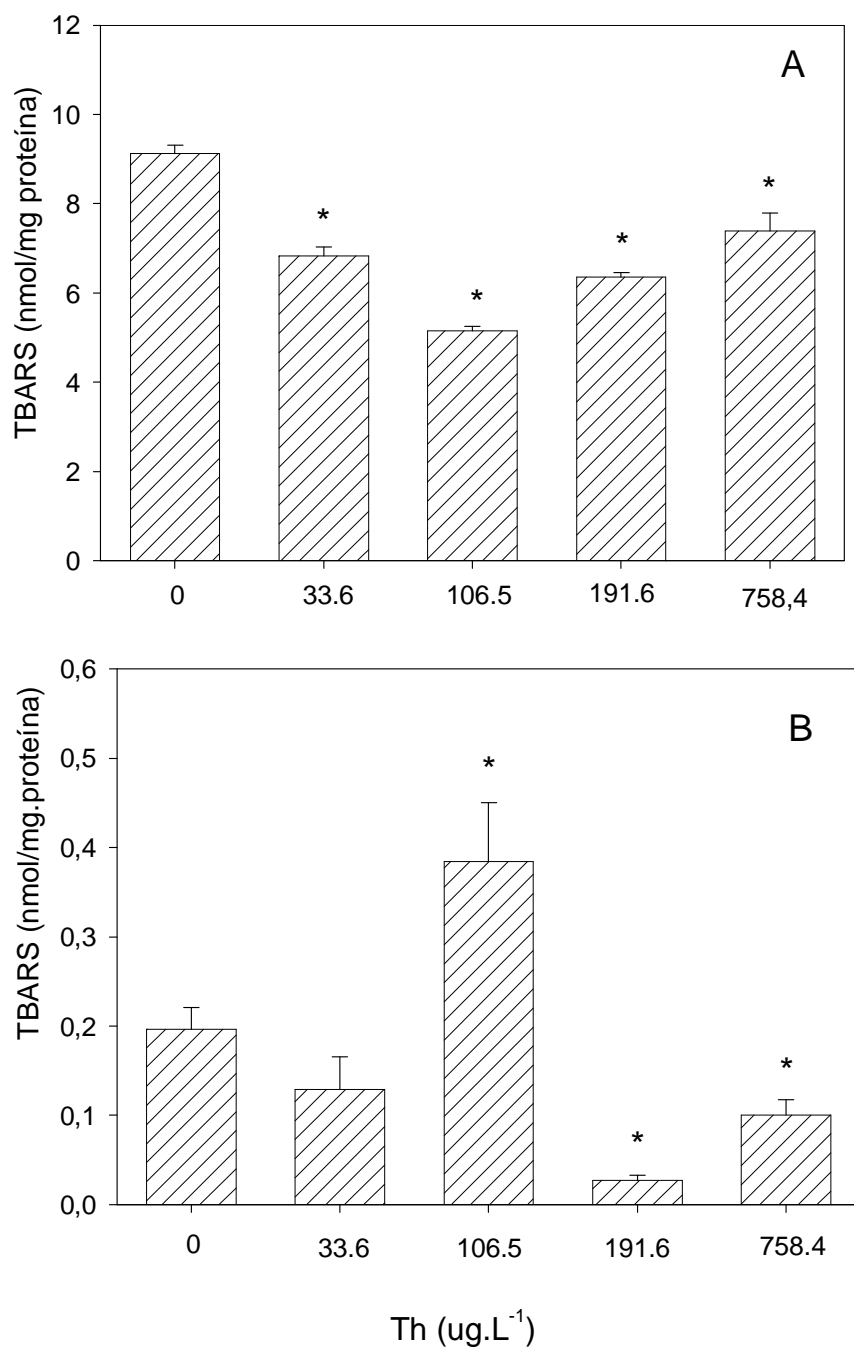


Figura 1

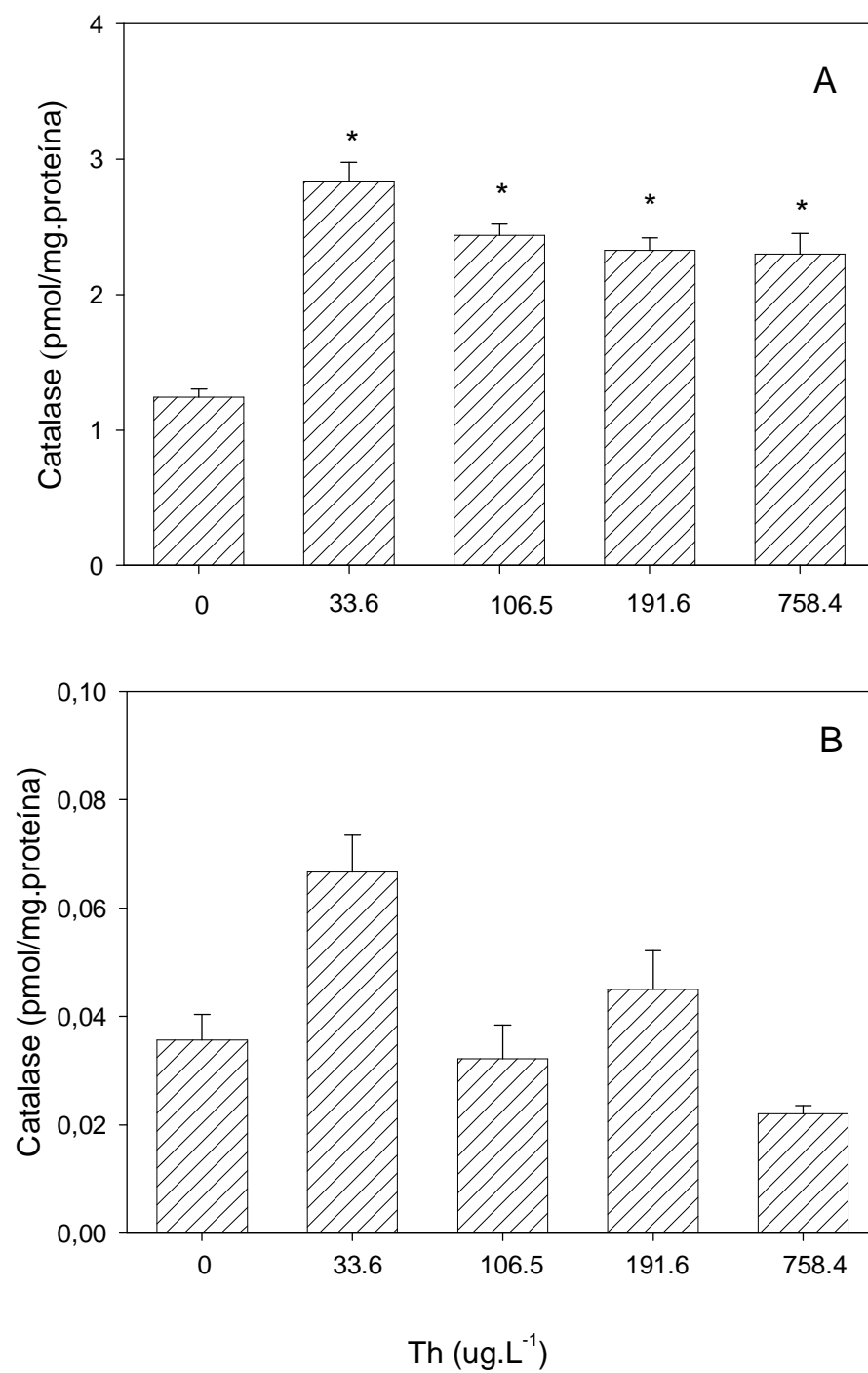


Figura 2

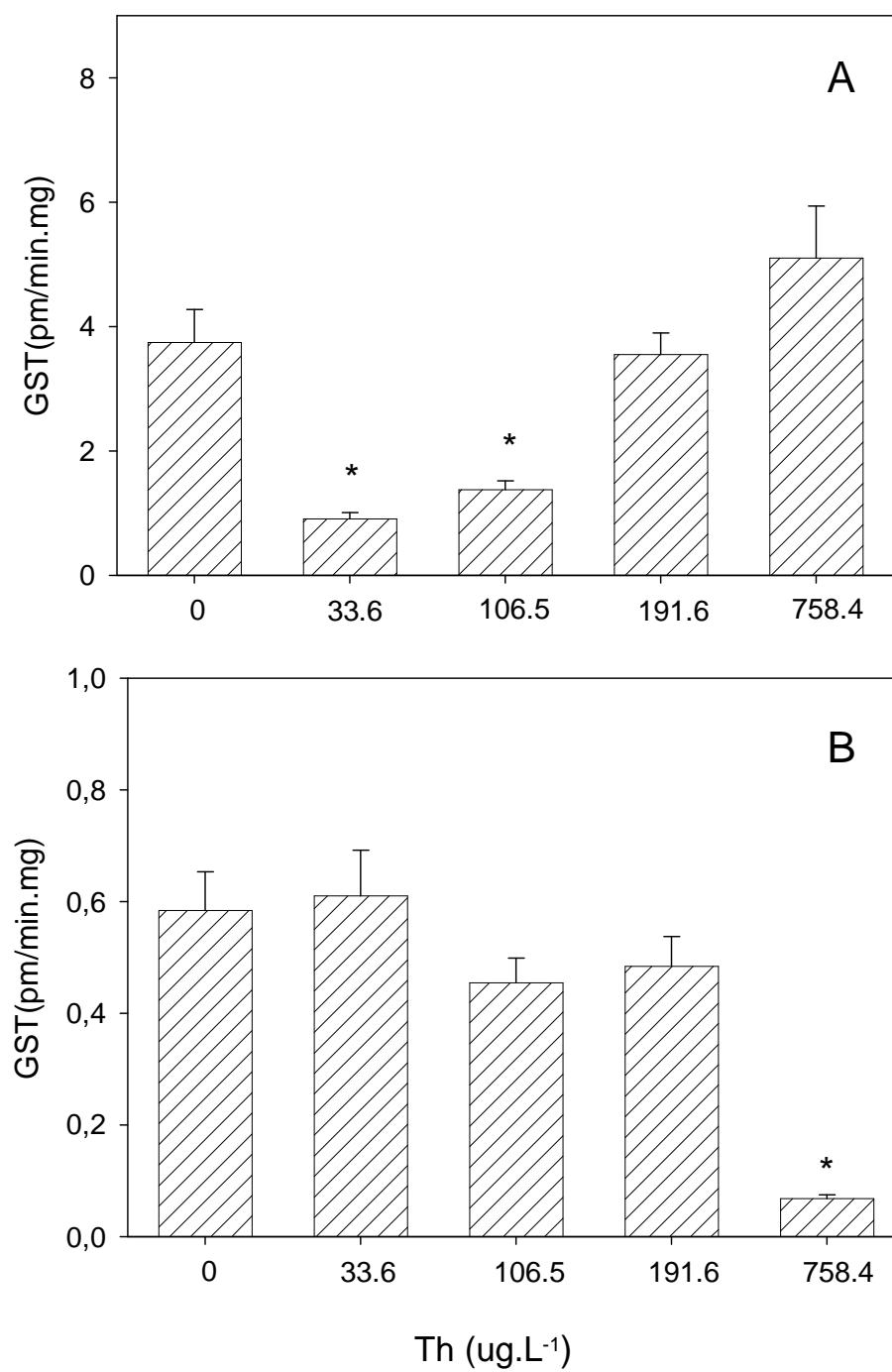


Figura 3

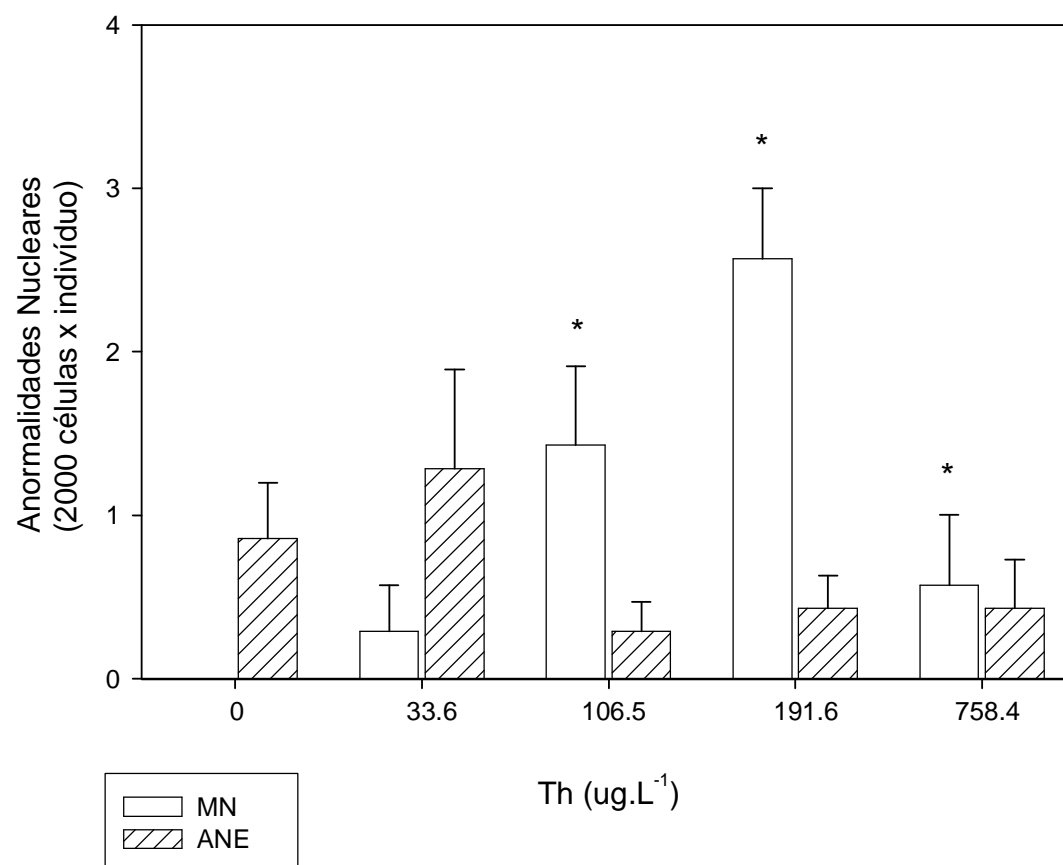


Figura 4

3 CONCLUSÕES

- Os parâmetros metabólicos intermediários analisados (glicogênio, glicose, lactato, proteína e amônia) em músculo esquelético de jundiás foram afetados (mas não de forma concentração-dependente) pela exposição às diferentes concentrações de Th testadas, sendo os efeitos mais pronunciados nas menores concentrações.
- A exposição dos jundiás às diferentes concentrações de Th testadas alterou os níveis de lipoperoxidação tecidual (TBARS), a atividade da catalase e da glutathione-S-transferase em fígado e músculo esquelético, mas não de modo concentração-dependente;
- A exposição dos jundiás a $106,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ Th ou concentrações mais elevadas aumentou a ocorrência de micronúcleos em eritrócitos, mas não houve alterações significativas em outras anormalidades nucleares eritrocíticas.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI J. M. S.; BUENO, A. M. S.; SILVA, C. R.; KHUNEN, S. Freqüência de eritrócitos micronucleados no sangue periférico de três populações naturais de *Geophagus brasiliensis*. **Genetic and Molecular Biology**, v. 21, n. 3 (Suppl.), p.99, 1998.

AGUDO, E. G. Materiais radioativos e radiação ionizante. In: OGA, S. (org.). **Fundamentos de Toxicologia**. 2^o ed. São Paulo: Atheneu. 2003. 467p.

AL-SABIT, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**. v. 343, p.121-135, 1995.

ANJOS, R. M.; VEIGA, R.; SOARES, T.; SANTOS, A. M. A.; AGUIAR, J. G.; FRASCÁ, M. H. B. O.; BRAGE, J. A. P.; UZÊDA, D.; MANGIA, L.; FACURE, A.; MOSQUERA, B.; CARVALHO, C.; GOMES, P. R. S. Natural radionuclide distribution in Brazilian commercial granites. **Radiation Measurements**. v. 39, p. 245-253, 2005.

ATSDR (Agency for toxic and disease registry). **Toxicological profile for thorium**. U.S Public Health Service In: collaboration with: U.S. Environmental Protection Agency, October, p. 174, 1990.

AU, W. W. & RIBEIRO. L. R. Estratégias para a condução de estudos em monitoramento genotóxico de populações humanas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. 355 p.

BAINY, A. C. D.; SAITO, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**. v. 34, p. 151-162, 1996.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002. 211p.

BALDISSEROTTO, B. Biologia do Jundiá. In: BALDISSEROTTO, B. RAÜNS NETO, J. (org.). **Criação de Jundia**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2004. 232p.

BELLÓ, A. R. R.; FORTES E.; BELLÓ-KLEIN, A.; BELLÓ. A. A.; LLESUY, S. F.; ROBALDO, R. B.; BIANCHINI, A. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 42, p. 233-236, 2000.

BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática. In: MAIA, N. B; MARTOS, H. L; BARRELLA, W (org.). **Indicadores ambientais: conceitos e aplicação**. São Paulo: EDUC, 2001. 285p.

BICKHAM, J. W.; SANDHU, S.; HERBERT, P. D. N.; CHIKHI, L., ATHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**. v.463, p. 33-51, 2000.

BUENO, A. M. S.; PEREIRA, C. A. B., RABELLO-GAY, M. N. *In situ* cytogenetic biomonitoring: on the need for using several end-points. **Genetic and Molecular Biology**, v.21, n.3 (Suppl.), p.98, 1998.

BUENO, A. M. S.; PEREIRA, C. A. B., RABELLO-GAY, M. N. Environmental genotoxicity evaluation using cytogenetic and points in wild rodents. **Environmental Health Perspective**, v. 108, n.12, 1165-1169, 2000.

CARRASCO K. R.; TILBURY, K. L; MAYERS, M. S. Assessment of the piscine micronuclei test as *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal Fisheries and Aquatic Science** v.47, p. 2123-2136,1990.

CAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fish subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**. v. 43. p. 569-574, 2005.

DELLA ROSA, H. V.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; COLACIOPPO, S. Toxicologia ocupacional. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 467p.

DEPLEDGE, M. H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: FOSSI, M. C. and LEOZIO, C. (Eds.). **Nondestructive biomarkers in vertebrates**. Lewis Publ., London, p. 271-285, 1993.

(ECETOC) EUROPEAN CHEMICAL INDUSTRY ECOLOGY AND TOXICOLOGY CENTRE. **Assessment factors in human health risk assessment**. Technical Report, v. 68. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels, 1995.

ESTEVES, F. A. 1998. **Fundamentos de Limnologia**, Rio de Janeiro: Interciência. 2^oed. 602p.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**. 455: 81-95, 2000.

FERNÍCOLA, N. A. G. G.; BOHRER-MOREL, M. B. C. & BAINY, A. C. D. Ecotoxicologia. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. (coord.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: Intertox. 2003, 322p.

FERRONSKY, V. I. & POLYAKOV, V. A. **Environmental isotopes in the hydrosphere**. John Wiley & Sons, 1982. 466p.

FÖRSTNER, U. Contaminated sediments. Lecture notes in earth. **Sciences**, v. 21, p.157, 1989.

GABELMAN, J. W. Migration of uranium and thorium-exploration significance. Tulsa, Amer. Assoc. Petro. Geol. **Studies in Geology**, v.3. p. 168, 1997.

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

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Radical Medicine**, v. 10, p. 93-100, 1991.

GOYER, R. A. Toxic effects of metals. In: KLAASSEM, C. D. (E.d.). Casarett and doull's toxicology the basic science of poisons. 5 ed. New York: Mc Graw Hill, p. 691-736, 1996.

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

GUL, S.; BELGE – KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; SAHAN, A.; DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. **Environment International**, v.30(5), 605 - 609, 2004.

HACON, S. S. Avaliação e gestão do risco ecotoxicológico à saúde humana. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (coord.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: Intertox. 2003, 322p.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed., Oxford University Press, 1999.

HARRIS, J. H. The use of fish in ecological assessments. **Australian Journal of Ecology**, v. 20, p.65-80, 1995.

HEDDLE, J. A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 44, p.63-69, 1973.

HILL, E. F.; FLEMING, W. J. Anticholinesterase poisoning of birds field monitoring and diagnosis of acute poisoning. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.1, p. 27-38, 1982.

HOOKE S. E. & FISHER, N. S. Sublethal toxicity of silver in zooplankton: importance of exposure pathways and implications for toxicity testing. **Environment Toxicology Chemistry**, v.20, p. 568-574, 2001.

JANES, N & PLAYLE, R. C. Modeling silver binding to fish gills of rainbow trout. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.14, p.1847-1858, 1995.

JULIÃO, L. Q. C., LIPSZTEIN, J. L., AZEREDO, A. M. G. F., Dantas, B. M. & Dias Da Cunha, K. M. A. Thorium worker's bioassay data. **Radiation Protection Dosimetry**, 53 (1-4), p. 285-288, 1994.

KHUNEN, S.; FERREIRA, J. F.; AGOSTINI, J. M. Avaliação da frequência de hemócitos micronucleados em mexilhão *Perna perna* (Mollusca: bivalvia) expostos ao óleo diesel. **Genetic and Molecular Biology**, v.21, n.3, (Suppl.), p. 99, 1998.

LANGMUIR, D. & HERMAN, J.S. The mobility of thorium in natural waters at low temperatures. **Geochemical et Cosmochemica Acta**, v.44, p. 1753-1766, 1980.

LARSON, A.; JOHANSSON-SJOBECK, M. J.; FANGE, R. Comparative study of some hematological and biochemical blood parameters in fishes from the Skagerrak. **Journal of Fish Biology**, London, v.9, p.425-440, 1976.

LEOZIO, C. & FOSSI, M. C. Nondestructive biomarkers strategy: perspectives and applications. In: FOSSI, M. C. and LEOZIO, C. (Eds.). **Nondestructive biomarkers in vertebrates**. Lewis Publ., London, 1993. 297-312p.

LIPSZTEIN, J. L.; DIAS DA CUNHA, K. M.; AZEREDO, A.M.G.; JULIÃO, L.; SANTOS, M.; MELO, D.R.; SIMÕES FILHO, F.F.L. **Journal of Environmental Radioactivity**, v.54, p.189-199, 2001.

LLESUY, S. F. Introducción y especies activas de oxígeno. In: **Estresse oxidativo e antioxidantes**. MARRONI, N. P. (org.) Canoas: Ed. ULBRA, 2002. 196p.

LITTLE, R. E. & GLADEN, B. C. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. **Reproductive Toxicology**, v.13, p. 347–352, 1999.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.57, p. 195-211, 1993.

LUCHESE, M. E. P. Meio urbano: Considerações sobre o ambiente, os poluentes e a *Drosophila* como bioindicador. **Acta Biológica Leopoldênsia**, v. 18, n.2, p. 5-19, 1996.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; Dias, A. L. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology Society of Genetics**, v.29 (1), p. 148-158, 2006.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. Y. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000.

MITCHELMORE, C. L. & CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v.399, p.135-147, 1998.

MOUROGOV, V. M. Nuclear power development: Global challenges and strategies, **IAEA Bulletin**, 39/2, 1997.

NASCIMENTO, I. A. ; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (coord.). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, São Paulo, 2006. 464p.

NOVELLI, E. L. B.; RODRIGUES, N. L. & RIBAS, B. O. Superoxide radical and toxicology of environmental nickel exposure, **Human Exp. Toxicology**, v.14. p.248-251, 1995.

ORUC, E. O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azimphosmethyl. **Comparative Biochemistry Physiology. Comparative Pharmacology & Toxicology**, v.137(1), p. 43-51, 2004.

PAASIVIRTA, J. **Chemical Ecotoxicology**, Lewis Publishers, 1991. 210 p.

PAOLIELLO, M. M. B & SILVA, E. S. Toxicodinâmica. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (coord.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, São Paulo: Intertox, 2003. 322p.

PAPAS, A. M. Determinants of antioxidant status in humans. **Lipids**, v. 31, p. 77-82, 1996.

PASSI, S.; RICCI, R.; CATAUDELLA, S.; FERRANTE, I.; DE SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Fatty acid pattern, oxidation product development and antioxidant loss in muscle tissue of rainbow trout and *Dicentrarchus labrax* during growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 2587-3492, 2004

PORTO, M.F.A. Estabelecimento de parâmetros de controle da poluição. In: BRANCO et al. **Hidrologia Ambiental**. São Paulo: ABRH/ EDUSP, v.3. 1991.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. 2^o ed. Washington: Taylor & Francis, 1995. 1125p.

REGOLI, F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v.50, p. 351-361, 2000.

RIBEIRO, L. R & MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (org.). **Mutagênese Ambiental**, Canoas: Ulbra, 2003. p. 21-27.

ROMÉO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFURIE, 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, p. 185-194, 2000.

SCHMID, W.; ARAKAKI, D. T.; BRESLAU, N. A.; CULBERTSON, J. S. The chinese hamster bone marrow as an *in vivo* test system. In: Cytogenetic results on basic aspects of the methodology obtained with alkylating agents. **Human. II**, 1971. 103-118p.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 1996., 156f. PhD Thesis - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden, 1996.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L.R. & FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. 355p.

SILVA, J. & FONSECA, M. B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 422p.

SINDERMAN, C. J. Neoplastic diseases. In: **Principal Diseases of Marine fish and Shellfish**. 2^oed. Acad. Press, Inc., 1990. 173-199p.

STARNEs, J. W.; Cantu, G.; Farrar R. P. & Kehrer J. P. Skeletal muscle lipid peroxidation in exercised and food-restricted rats during aging. **Journal of Applied Physiology**, v. 67(1), p. 69-75, 1989.

STOHS, S. J. & BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v.18, p. 321-336, 1995.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1715 - 1733, 1996.

TERRA, N. R.; LEMOS, C. T.; FEIDEN, I. R.; CORREA, L. M. Ensaio biológicos na avaliação da qualidade ambiental. In: TUCCI, C. E. M.; MARQUES D. M. L. M. (org.). **Avaliação e Controle da Drenagem Urbana**. Porto Alegre: ABRH. v. 2. 2001. 226p.

ÜNAK, T. What is the potential use of thorium in the future energy production technology? **Progress in Nuclear Energy**, v.37(1), p. 137-144, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. **Estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses: MDT/ UFSM**. Pró Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. 6ª. Ed. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2005. 63p..

VIDELA. L. A.; FERNÁNDEZ, V.; CARRIÓN, Y.; AZZAVIS, L. A.; BAINY, A. C. D.; JUNQUEIRA, V. B. C. Cellular oxidative stress induced by xenobiotics and hormonal changes. **Ciência e Cultura**. v.47, p. 385 – 394, 1995.

YAMAMOTO, M.; MASHINO, T.; NAGANO, T.; HIROBE, M. The reactivity of superoxide: a potent oxidant generated in situ from superoxide and CO₂. **Tetrahedron Letters**, v.30, p. 4133-4136, 1989.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. - **Principle of ecotoxicology**. London, Taylor & Francis, 1996. 321p.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). International Programme on Chemical Safety- IPCS. Principles for assessment of risk to human health from exposure to chemicals. **Environmental Health Criteria**, Geneva, v. 219, 1999.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Decision-making environmental health**. 2000.

WILHELM FILHO, D.; GUILIVI, C.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in marine fish. I. Teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.106, p. 409-413,1993.

WILSON, D. J. **The use of thorium as an alternative nuclear fuel**, Australian Atomic Energy Commission, Research Establishment, 1992.

WINZER, K.; WINSTON, G. W.; BECKER, W.; VAN NOORDEN, C. J. F.; KOCHLER, A. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 52(2), p. 143-155, 2001.