

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**Influência do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre no sangue e fígado  
de curimatá, *Prochilodus scrofa*, (STEINDACHNER, 1881)**

**CLEONI DOS SANTOS CARVALHO**

*Tese de Doutorado*

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**Influência do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre no sangue e fígado  
de curimatá, *Prochilodus scrofa*, (STEINDACHNER, 1881)**

**CLEONI DOS SANTOS CARVALHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de Concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

**São Carlos - SP**

**2003**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C331ip

Carvalho, Cleoni dos Santos.

Influência do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre no sangue e fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881) / Cleoni dos Santos Carvalho . -- São Carlos : UFSCar, 2003.

107 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Bioquímica. 2. Enzimas glicolíticas. 3. Metalotionina.  
4. Hematologia. 5. Histologia (tecido). 6. *Prochilodus scrofa*.

I. Título.

CDD: 574.192 (20<sup>a</sup>)

*Ao Evandro, pelo carinho e por estar ao  
meu lado em todos os momentos difíceis*

## *AGRADECIMENTOS*

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, pela orientação, confiança e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos.

A FAPESP, pelo suporte financeiro dado ao processo 98/13171-6.

À Estação de Hidrobiologia e Piscicultura, Usina de Furnas, Furnas - MG, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

Ao prof. Dr. Tadeu Francisco Rantin (DCF/UFSCar) que permitiu a utilização de diversos equipamentos em seu laboratório.

À profa. Dra. Heloisa Selistre de Araujo (DCF/UFSCar) que permitiu a utilização de diversos equipamentos em seu laboratório e pela atenção no esclarecimento de dúvidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Dr. Rubens Rosa *in memoriam* pelos inestimáveis conselhos e orientação.

Ao José Roberto Sanches e ao Nelson S.A. Matos (DCF/UFSCar) pela colaboração e amizade.

Ao Jovino A. de Souza (DQ/UFSCar) pelo auxílio no desenvolvimento da etapa experimental.

Ao professores e funcionários do DCF pela colaboração e amizade.

À Laila R. B. dos Santos que auxiliou grandemente no preparo e interpretação do material de microscopia óptica.

Aos amigos do laboratório Fábio, Jorge, Eliane Monteiro, Eliane Oba, Luiz Henrique, Marcos, Marise, Sandro, André, Aurélia, Ellen, Mônica, Oscar, Cássio, Cleo, DW, Thomaz, Glauciane e todos aqueles que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

À Flavia, Rosenil, Jane e Guilherme pela amizade e ajuda dispensada durante todo este trabalho e por todos os momentos agradáveis que vocês me proporcionaram.

Aos amigos Cheila e Fernando pela essencial ajuda no momento em que mais precisei.

E em especial,

Aos meus pais, meus irmãos e sobrinhos que sempre me apoiaram e entenderam os meus sonhos e incentivaram a realização de mais esta etapa de minha vida.

Ao amor da minha vida Evandro, pela paciência, saudade e compreensão da minha ausência para que mais este passo pudesse ser dado.

E finalmente, a Deus pelo seu amor e misericórdia em minha vida.

**ORIENTADORA:**

**Profa. Dra. MARISA NARCISO FERNANDES**

---

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>Fatores ambientais na toxicidade do cobre</b> .....	5
<b>Objetivos</b> .....	9
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	10
<b>CAPÍTULO 2:</b>	
<b>TOXICIDADE DO COBRE EM <i>Prochilodus scrofa</i> (STEINDACHNER, 1881): INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA</b> .....	15
<b>Resumo</b> .....	15
<b>Introdução</b> .....	15
<b>Material e Métodos</b> .....	16
Animais .....	16
Procedimento Experimental .....	17
Resultados .....	18
Discussão .....	23
Referências Bibliográficas .....	25
<b>CAPÍTULO 3:</b>	
<b>ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM CURIMBATÁ, <i>Prochilodus scrofa</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO COBRE: INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA</b> .....	27
<b>Resumo</b> .....	27
<b>Introdução</b> .....	27
<b>Material e Métodos</b> .....	28
Animais .....	28
Procedimento Experimental .....	29
Coleta de sangue .....	29
Análise Estatística .....	30
Resultados .....	30
Discussão .....	33
Referências Bibliográficas .....	37
<b>CAPÍTULO 4:</b>	
<b>RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE <i>Prochilodus scrofa</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO COBRE: INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA</b> .....	39
<b>Resumo</b> .....	39

<b>Introdução</b> .....	39
<b>Material e Métodos</b> .....	41
Animais .....	41
Procedimento Experimental .....	41
Testes <i>in vivo</i> .....	41
Testes <i>in vitro</i> .....	42
Coleta do sangue .....	42
Coleta do fígado .....	43
Ensaio enzimáticos .....	43
a) Hexoquinase (HK) - ATP:D-Hexose-6-fosfotransterase, E.C.2.7.1.1. ....	43
b) Fosfofructoquinase (PFK)- ATP:D-Fructose-6-fosfato-1-fosfotransferase, E.C.2.7.1.11	44
c) Piruvatoquinase (PK) - ATP: Piruvato fosfotransferase, E.C. 1.11.1.7 .....	44
d) Lactato Desidrogenase (LDH) - L-Lactato:NAD, oxidoreductase; E.C. 1.1.1.27 .....	45
e) Glicose - 6 - fosfatodesidrogenase (G-6PDH) - D - Glicose-6-fosfato: NADP 1 - oxidoreductase, E.C.1.1.1.49 .....	45
f) Cálculo de atividade específica de cada enzima .....	46
Determinação dos metabólitos no sangue e no fígado .....	46
Análise estatística .....	47
Resultados .....	47
Experimentos <i>in vivo</i> .....	49
Experimentos <i>in vitro</i> .....	53
Discussão .....	58
Referências Bibliográficas .....	66

## **CAPÍTULO 5:**

### **INDUÇÃO DE METALOTIONINA NO FÍGADO DE *Prochilodus scrofa* APÓS EXPOSIÇÃO AO COBRE: INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA** .....

<b>Resumo</b> .....	69
<b>Introdução</b> .....	69
<b>Material e Métodos</b> .....	70
Animais .....	70
Procedimento Experimental .....	71
Acúmulo de cobre no fígado .....	72
Determinação da metalotionina na fração citossólica em Sephadex G-75 .....	72
Isolamento da metalotionina .....	73
Análise estatística .....	73
Resultados .....	73
Metalotionina na fração solúvel do fígado .....	74
Isolamento da metalotionina .....	77
Discussão .....	80

Referências Bibliográficas .....	83
<b>CAPÍTULO 6:</b>	
<b>EFEITOS SOBRE O TECIDO HEPÁTICO EM CURIMBATÁ, <i>Prochilodus scrofu</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO COBRE: INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA .....</b>	<b>87</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>87</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>87</b>
<b>Material e Métodos .....</b>	<b>88</b>
Animais .....	88
Protocolo Experimental .....	89
Coleta do fígado .....	89
Análise estatística .....	91
Resultados .....	92
Morfologia e morfometria do fígado .....	92
Análise quantitativa .....	96
Discussão .....	100
Referências Bibliográficas .....	103
<b>CAPÍTULO 7:</b>	
<b>Conclusão.....</b>	<b>107</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1</b>	Porcentagem cumulativa de mortalidade de <i>P. scrofa</i> em pH 4,5 a 20 °C .....	19
<b>Figura 2</b>	Porcentagem cumulativa da mortalidade de <i>P. scrofa</i> em pH a 20 °C .....	20
<b>Figura 3</b>	Porcentagem de mortalidade de <i>P. scrofa</i> em pH 4,5 a 30 °C .....	21
<b>Figura 4</b>	Porcentagem de mortalidade de <i>P. scrofa</i> aclimatados a 30 °C .....	22
<b>Figura 5</b>	CL <sub>50</sub> -96h para o cobre em relação ao pH e a temperatura em <i>P. scrofa</i> .....	23

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 1</b>	Mudanças no hematócrito (Hct), células vermelhas (RBC), concentração de hemoglobina ([Hb]), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de <i>P. scrofa</i> após exposição ao cobre (CL <sub>50</sub> -96 h) .....	32
-----------------	---	----

### CAPÍTULO 4

<b>Figura 1</b>	Atividade enzimática do Fígado de <i>P. scrofa</i> após exposição ao cobre (CL <sub>50</sub> -96 h) <i>in vivo</i> .....	51
<b>Figura 2</b>	Atividade enzimática da SE de <i>P. scrofa</i> após exposição ao cobre (CL <sub>50</sub> -96 h) <i>in vivo</i> .....	52
<b>Figura 3.</b>	Concentração de glicose do plasma e de glicogênio do fígado de <i>P. scrofa</i> após exposição ao cobre (CL <sub>50</sub> -96 h) .....	53
<b>Figura 4</b>	Atividade enzimática do Fígado de <i>P. scrofa</i> após exposição ao cobre <i>in vitro</i> (CL <sub>50</sub> -96 h) .....	57
<b>Figura 5</b>	Atividade enzimática da SE de <i>P. scrofa</i> após exposição ao cobre <i>in vitro</i> (CL <sub>50</sub> -96 h) .....	58

### CAPÍTULO 5

<b>Figura 1</b>	Acúmulo de cobre no fígado (µg.g <sup>-1</sup> peso seco) de <i>P. scrofa</i> .....	74
<b>Figura 2</b>	Perfil cromatográfico da fração citosólica do fígado de peixes expostos ao cobre em pH 4,5 – 20 °C (CL <sub>50</sub> -96 h) purificada da coluna de Sephadex G-75 .....	75
<b>Figura 3</b>	Perfil cromatográfico da fração citosólica do fígado de peixes expostos ao cobre em pH 8,0 – 20 °C (CL <sub>50</sub> -96 h) purificada da coluna de Sephadex G-75 .....	75
<b>Figura 4</b>	Perfil cromatográfico da fração citosólica do fígado de peixes expostos ao cobre em pH 4,5 – 30 °C (CL <sub>50</sub> -96h) purificada da coluna de Sephadex G-75 .....	75
<b>Figura 5</b>	Perfil cromatográfico da fração citosólica do fígado de peixes expostos ao cobre em pH 8,0 – 30 °C (CL <sub>50</sub> -96h) purificada da coluna de Sephadex G-75 .....	76
<b>Figura 6</b>	Purificação da MT do fígado de curimatá, expostos ao cobre em pH 4,5 (A) e controle pH 4,5 (B); exposto ao cobre em pH 8,0 (C) e controle pH 8,0 (D) a 20 °C, parcialmente purificada em gel de filtração Sephadex G-75 .....	76
<b>Figura 7</b>	Purificação da MT do fígado de curimatá, expostos ao cobre em pH 4,5 (A) e controle pH 4,5 (B); exposto ao cobre em pH 8,0 (C) e controle pH 8,0 (D) a 30 °C, parcialmente purificada em gel de filtração Sephadex G-75 .....	77
<b>Figura 8</b>	Perfil cromatográfico da fração citosólica da MT do fígado de curimatá expostos ao cobre em pH 4,5-20 (A) e 30 °C (B) (CL <sub>50</sub> -96h) purificada da coluna de DEAE-Sepharose .....	78
<b>Figura 9</b>	Perfil cromatográfico da fração citosólica da MT do fígado de curimatá expostos ao cobre em pH 8,0-20 (A) e 30 °C (B) (CL <sub>50</sub> -96h) purificada da coluna de DEAE-Sepharose .....	79
<b>Figura 10</b>	Purificação da MT do fígado de curimatá, expostos ao cobre em pH 4,5 (A) e 8,0 (B) –	

20 °C e expostos ao cobre em pH 4,5 e 8,0 – 30 °C (C), purificada em cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose .....	79
---	----

## CAPÍTULO 6

<b>Figura 1</b>	Sistema teste de pontos .....	91
<b>Figura 2</b>	Sistema de contagem aleatória de 20 campos de cada corte histológico .....	91
<b>Figura 3</b>	Sistema de contagem aleatória das histopatologias de cada corte histológico .....	91
<b>Figura 4</b>	Aspecto geral do fígado de <i>P. scrofa</i> do grupo controle em pH 7,0 a 20 e 30 °C .....	94
<b>Figura 5</b>	Tecido hepático de <i>P. scrofa</i> , grupos controle pH 7,0, 4,5 e pH 8,0 mostrando os hepatócitos (seta), vasos sanguíneos (VS) e melanomacrófago (*) a 20 e 30 °C .....	95
<b>Figura 6</b>	Tecido hepático de <i>P. scrofa</i> expostos ao cobre em pH 4,5 a 20 e a 30 °C .....	96

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela I</b>	CL <sub>50</sub> - 96h do cobre para <i>P. scrofa</i> em pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C .....	18
-----------------	---	----

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela I</b>	Valores médios (± SEM) dos parâmetros hematológicos de curimatá, <i>P.scrofa</i> dos grupos controles em pH 7,0, 4,5 e 8,0 e grupos expostos ao cobre em pH 4,5 e pH 8,0 (n = 8 em cada grupo) a 20 e 30 °C .....	31
-----------------	---	----

### CAPÍTULO 5

<b>Tabela I</b>	Atividade enzimática da SE de <i>P. scrofa</i> a 20 e 30 °C – estudos <i>in vivo</i> .....	48
<b>Tabela II</b>	Atividade enzimática do fígado de <i>P. scrofa</i> a 20 e 30 °C – estudos <i>in vivo</i> .....	49
<b>Tabela III</b>	Atividade enzimática da SE de <i>P. scrofa</i> a 20 e 30 °C – estudos <i>in vitro</i> .....	55
<b>Tabela IV</b>	Atividade enzimática do fígado de <i>P. scrofa</i> a 20 e 30 °C – estudos <i>in vitro</i> .....	56

### CAPÍTULO 6

<b>Tabela I</b>	Volumes de hepatócitos e seus núcleos de <i>P. scrofa</i> .....	97
<b>Tabela II</b>	Densidade de volume (Vv) das estruturas constituintes do fígado de <i>P. scrofa</i> .....	98
<b>Tabela III</b>	Alterações histopatológicas e grau de severidade das lesões (estágios) observadas no fígado de <i>P. scrofa</i> .....	99

## Abreviaturas

ATP	Adenosina Trifosfato
LDH	Lactato desidrogenase
GOT	L-alanina:2-oxoglutarato aminotransferase
GPT	L-aspartato:2-oxoglutarato aminotransferase
G6P	Glicose-6-fosfato
F6P	Frutose-6-fosfato
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
HK	Hexoquinase
PFK	Fosfofrutoquinase
PK	Piruvatoquinase
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
$NADP^+$	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
$NADP^+ + H^+$	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
$NAD^+$	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
$NADH^+ + H^+$	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
$\beta ME$	$\beta$ -Mercaptoetanol
UI	Unidades internacionais
ADP	Adenosina difosfato
EDTA	Etileno diamino tetracético
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amônia
GDH-TPI	Gliceraldeído desidrogenase-Triose fosfato isomerase
FDP	Frutose difosfato
PEP	Fosfoenol piruvato
KCl	Cloreto de Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio
$H_2SO_4$	Ácido sulfúrico
FruP <sub>2</sub> ALD	Frutose difosfato aldolase
RNA	Ácido ribonucleico

## RESUMO

Considerando que o efeito de poluentes em peixes e outros organismos se iniciam nos níveis enzimáticos podendo alterar a função das células e sua estrutura, o presente estudo teve como objetivo verificar a influência do pH e temperatura da água sobre os efeitos do cobre no fígado e sangue de *Prochilodus scrofa* através das análises hematológica, morfológica e enzimática. Exemplares jovens foram expostos (96 h) ao cobre dissolvido na água, em pH 4,5 e 8,0 a 20 e 30°C. A CL<sub>50</sub>-96h para o cobre a 20 °C foi determinada como 98 ± 0,9 µg.L<sup>-1</sup> em pH 4,5 e 16 ± 0,2 µg.L<sup>-1</sup> em pH 8,0. A 30 °C, CL<sub>50</sub>-96 h foi 88 ± 0,8 µg.L<sup>-1</sup> em pH 4,5 e 14 ± 0,5 µg.L<sup>-1</sup> em pH 8,0. Um grupo de animais foi mantido em pH 7,0 para avaliarmos apenas o efeito do pH. A mudança do pH da água causou aumento no hematócrito (Hct) em ambos os pHs e temperaturas, houve redução na concentração de hemoglobina ([Hb]) em água com pH 4,5 a 20 e 30 °C e aumento no número de eritrócitos (RBC) em pH 4,5 a 30 °C (p < 0,05). A exposição ao cobre causou aumento na [Hb] e RBC a 20 °C em ambos pHs e uma diminuição na [Hb] em pH 4,5 e RBC em pH 8,0 a 30 °C. Nos estudos *in vivo*, a concentração de glicose plasmática aumentou em pH 4,5 nos grupos controle e na presença do cobre em pH 4,5 a 30 °C (p,0,05). A concentração de glicogênio hepático foi maior a 20 °C (p<0,05). A atividade da PFK do fígado diminuiu nos grupos controles pH 4,5 a 20 °C e aumentou após a exposição ao cobre. Os estudos *in vitro* mostraram influência da temperatura e pH da água na atividade das enzimas regulatórias. A atividade das enzimas HK, PFK, PK, LDH e G6PDH diminuiu nos grupos controles em a 30 °C . Após a exposição ao cobre a atividade destas enzimas aumentou alcançando valores próximos ao controle pH 7,0. Na solução de eritrócitos o aumento na atividade da enzimas foi mais evidente na HK e PFK. Em relação as duas temperaturas o acúmulo de cobre foi maior na temperatura de 20 °C, entretanto, a indução da metalotionina (MT) isolada por DEAE-Sepharose e identificada por eletroforese em SDS-PAGE, foi mais evidente em peixes expostos a menor concentração de cobre em água com pH 8,0 (CL<sub>50</sub>-96h em água com pH 8,0). As alterações histopatológicas (hiperemia, vacuolização citoplasmática, degeneração celular e nuclear, necrose focal e aumento de melanomacrófagos) em *P. scrofa* foram relacionadas com a mudança do pH da água do que a exposição ao cobre. Estes resultados indicam que as mudanças na hematologia e na atividade de enzimas em resposta à variação do pH e presença do cobre no ambiente aquático são complexas. Entretanto, é possível concluir que: 1) o metabolismo anaeróbio prevaleceu no fígado de peixes aclimatados a 20 °C, *in vivo*, enquanto que, *in vitro*, a atividade das enzimas foi mantida sem alteração, exceto para a HK e PK que aumentaram a atividade. O aumento da atividade das enzimas regulatórias e associadas sugerem o uso da via glicolítica a 30 °C. 2) o cobre diminuiu a atividade destas enzimas em ambas temperaturas; 3) a atividade das enzimas regulatórias a 20 °C, na solução de eritrócitos dos grupos controle, *in vivo*, sugere preferência pelo metabolismo aeróbio. A adição do cobre estimulou a atividade da PFK em pH baixo e inibiu em pH alto sugerindo que neste pH a energia provavelmente provém do lactato formado pela LDH; 4) na solução de eritrócitos, a 20 °C, o cobre e o pH estimularam o metabolismo aeróbio em pH baixo e o metabolismo anaeróbio em pH alto, os quais foram evidenciados pelo aumento da atividade da PFK e da LDH, respectivamente; 5) a demanda de energia em altas temperaturas foi mantida pela atividade da PFK e LDH nos grupos controle e na presença de cobre prevaleceu o metabolismo anaeróbio em pH baixo e o metabolismo aeróbio em pH alto; 6) o aumento da concentração de MT sugere aumento do metabolismo com o aumento da temperatura que aumentou a síntese desta proteína e o maior acúmulo de cobre a 20 °C evidencia maior excreção de cobre nos peixes aclimatados a 30 °C; 7) as mudanças mais frequentes no tecido hepático observadas em todos os tratamentos mostrou que as lesões ocorreram em resposta à mudança do pH da água.

## ABSTRACT

Considering that the pollutants in fish and other animals begin at enzymatic levels, and may alter the cell function and structure, the main goal of the present study was to analyze the influence of the water pH and temperature on the copper effects in liver and blood of the freshwater fish, *Prochilodus scrofa* via hematological, morphological and enzymatic analysis. Juveniles specimens of *P. scrofa* acclimated to 20 and 30°C were exposed to copper (acute exposure) in static systems at water pH 4.5 and 8.0 to determine the 96h-LC<sub>50</sub>. Them groups of fish were exposed to 96h-LC<sub>50</sub> in the same water conditions for hematological analysis, determination of activity of regulatory and associated glycolitic enzymes from liver and blood “in vivo” and “in vitro” and liver morphological analysis. Groups of fish acclimated at 20 and 30°C were kept a water pH 7.0 and serve as control for the controls groups pH 4.5 and 8.0. The 96h-LC<sub>50</sub> were calculated as  $98 \pm 0.9$  and  $16 \pm 0.2$   $\mu\text{gCu.L}^{-1}$  respectively at pH 4.5 e 8.0 a 20°C and  $88 \pm 0.8$  e  $14 \pm 0.5$   $\mu\text{gCu.L}^{-1}$  em pH 4.5 e 8.0 a 30°C. The change in water pH caused an increase in the hematocrit (Hct) in both water pH and temperatures, reduction of hemoglobin concentration ([Hb]) at water pH 4.5 at 20 and 30°C and an increase in the number of erythrocytes (RBC) at pH 4.5 at 30°C ( $p < 0.05$ ). Copper exposure caused an increase in [Hb] and RBC at 20°C in both pHs and a reduction in the [Hb] at pH 4.5 and RBC at pH 8.0 a 30°C. “In vivo” studies showed an increase in the plasma glucose concentration of the control group pH 4.5 and in fish exposed to copper in pH 4.5 at 30°C ( $p < 0.05$ ). Hepatic glycogen concentration was higher at 20°C ( $p < 0.05$ ). The activity of PFK enzyme in liver was reduced in the control group pH4.5 at 20°C and increased after copper exposure. *In vitro* studies showed high influence of temperature on the regulatory enzymes. The activity of HK, PFK, PK, LDH and G6PHD was reduced in the control groups at 30°C. After copper exposure the activity of these enzymes increased reaching values similar of the controls pH 7.0. In the erythrocyte the increase of enzyme activity after copper exposure was more evident in the HK and PFK enzymes. Copper accumulation in liver was higher at 20°C however, the metallothionein induction that was isolated using DEAE-Sepharose and identified by SDS-PAGE, was more evident in fish exposed to low copper concentration in water but pH 8.0 (LC<sub>50</sub>-96h at water pH8.0). Liver histopathologies (hyperemia, cytoplasmic vacuolization, cellular and nuclear degeneration, focal necrosis and melanomacrophages) in *P. scrofa* was more related to the changes in water pH than copper exposure. These results evidenced that the changes in hematology and in the enzyme activities in response to pH and copper in the environment are complex. However, it is possible to conclude that: 1) the anaerobic metabolism prevailed in liver in fish acclimated to 20°C, *in vivo*, while, *in vitro*, the enzyme activity was kept without change, except for HK and PK that increased their activity. The activity decrease of the regulatory and associated enzymes suggest the use of glycolitic via for energy at 30°C; 2) copper decrease the activity of these enzymes in both temperatures; 3) the activities of regulatory enzymes at 20°C, in the erythrocyte from control groups, *in vivo*, suggest the mobilization of glucose. Copper addition in it showed activity stimulation in low pH (PFK) and inhibition in high pH (PFK) suggesting that in this pH the energy probably come from lactate produced by the LDH; 4) in the erythrocyte, at 20°C, the pH and copper effect suggest that the aerobic metabolism was stimulated at low pH and that the anaerobic metabolism was stimulated at high pH; it was evidenced by the increase of PFK and LDH activities, respectively; 5) the energetic demand at high temperature was maintained by the activity of PFK and LDH in the control groups and in the presence of copper prevailed the anaerobe at low pH and the aerobe at high pH; 6) the increase of metallothionein concentration suggests an increase of metabolism with the increase of temperature that increased the synthesis of this protein and the higher accumulation of copper at 20°C may evidence higher copper excretion in fish acclimated to 30°C; 7) the more frequent changes in the hepatic tissue found in all experiments showed low specificity of lesions as most of them occurred in response to change in water pH.

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais pesados é preocupante em relação aos efeitos tóxicos desses metais para as espécies aquáticas e para o homem. Os metais pesados entram nos corpos d'água a partir de uma grande variedade de efluentes industriais e de precipitações ácidas que se ligam a eles nos solos. Metais como cobre, zinco, cádmio, mercúrio (as formas metilada e não metilada), cromo, chumbo, níquel, arsênico, estanho e o alumínio tendem a se complexarem com substâncias orgânicas e inorgânicas reduzindo a sua biodisponibilidade no ambiente aquático (HEATH, 1995; BEAUMONT *et al.*, 2000).

Os metais pesados ocorrem na natureza e são essenciais para o funcionamento dos organismos, são os chamados elementos traço, como por exemplo, o cobre. Alguns são reconhecidos como nutrientes necessários aos animais e plantas, porém se a sua incorporação pelos organismos for excessiva, ultrapassando os níveis considerados normais, pode produzir efeitos tóxicos e letais. O efeito de poluentes em peixes, ou outros organismos, se iniciam primeiramente nos sistemas enzimáticos que podem alterar a função da célula como, por exemplo, a permeabilidade da membrana. Essas alterações afetam a integridade celular, como ultraestrutura e processos fisiológicos resultando em lesões histológicas, refletindo no comprometimento da função de um órgão. Alguns órgãos apresentam mudança compensatória quando a homeostase é alterada. Como resultado de uma exposição a poluentes o crescimento e a reprodução sofrem alterações, algumas substâncias afetam o sistema nervoso central e com isso alteram o comportamento, a osmorregulação e o metabolismo de hormônios sexuais. Finalmente, mudanças na função de um grupo de organismos em um ecossistema causam efeitos em outros organismos, se eles forem predadores ou presas (HEATH, 1995).

Toxicologistas moleculares e bioquímicos investigam as respostas de um órgão e sistemas celulares a agentes químicos. Este problema é particularmente evidente no ambiente aquático, porque os peixes e outros organismos são frequentemente expostos a estes agentes na própria água, complexados com o alimento, particulados ou dissolvidos na matéria orgânica. Esses tóxicos são, em geral, absorvidos através das brânquias,

pele, e intestino junto a absorção dos alimentos, e no sistema circulatório alcançam os demais órgãos (MALINS & OSTRANDER, 1994).

O estudo da assimilação, acumulação e excreção são fundamentais para a compreensão dos efeitos dos metais nos sistemas orgânicos de peixes. Os metais são transportados pelo sangue, na maioria dos casos, ligados a proteínas (SIMKISS & TAYLOR, 1981). O fígado é o principal órgão para homeostase dos metais, que são acumulados e concentrados na bile. A excreção é feita através das brânquias, bile (via fezes), rins e pele (HEATH, 1995; MALINS & OSTRANDER, 1994). As mudanças morfológicas no fígado, rins e brânquias têm sido observadas em peixes e, medidas do conteúdo do metal, têm revelado o acúmulo do mesmo nesses órgãos (HEATH, 1995; MAZON, 1997; MAZON *et al.*, 1999).

Exposições ao cobre causam mobilização do glicogênio no fígado aumentando a glicose sanguínea através da estimulação da fosforilase. A maior parte da molécula de glicogênio é degradada a glicose-1-fosfato pela ação da fosforilase. O cobre inibe o metabolismo oxidativo e isto pode ser compensado por estimulação da glicólise a qual é refletida em um aumento da atividade da lactato desidrogenase e da gliceraldeído desidrogenase. Os efeitos na atividade de enzimas oxidativas são pontos chaves no controle de fluxo de carbono através da glicólise e do ciclo de ácido cítrico, inibição da hexoquinase e glicose-6-fosfatase pode causar uma redução na glicogenólise e gliconeogênese, respectivamente. O cobre causa diminuição de ATP no fígado e no músculo de peixes, devido à demanda de energia atribuída a processos de desintoxicação no fígado, provoca também inibição de alguns sistemas enzimáticos como xantina oxidase, fosfatase alcalina e ácida, alanina aminotransferase, glicose-6-fosforilase e desidrogenase succínica (HEATH, 1995).

A determinação da distribuição subcelular de contaminantes nos peixes permite verificar a via metabólica da substância tóxica e predizer possíveis modelos de desintoxicação. A ação dos metais pesados tem sido muito investigada e ênfase tem sido dado às metalotioninas encontradas no citoplasma das células das brânquias, intestino, rins e fígado de peixes. As metalotioninas sequestram os metais e servem como um mecanismo de proteção para os animais porque mantêm a concentração de metal livre extremamente baixa, evitando as alterações induzidas pelos metais (PASSINO & KRAMER, 1982; HAMILTON & MEHRLE, 1986; HEATH, 1995; STILMANN, 1995; MAYER *et al.*, 2003).

As metalotioninas são polipeptídeos de baixo peso molecular com grupos sulfidrilas devido a grande quantidade de cisteína na molécula e são encontradas em uma ampla variedade de organismos. Devido a presença de grupos sulfidrilas na sua molécula as metalotioninas podem se ligar aos metais divalentes, tais como o cobre, zinco, mercúrio, cádmio e cromo. Vários estudos têm mostrado que os metais induzem a síntese de metalotioninas adicionais resultando no aumento da tolerância desses organismos aos efeitos tóxicos do metal (SIMKISS & TAYLOR, 1981; KITO *et al.*, 1982 a, b; LEY *et al.*, 1983; HAMILTON & MEHRLE, 1986; DUTTON *et al.*, 1993; HEATH, 1995; DANG, 2000; BRAGIGAND & BERTHET, 2003).

Segundo HAMILTON & MEHRLE (1986), se os animais são expostos à doses excessivas do metal a síntese de metalotionina poderá não ser suficiente, o metal se difundirá nos outros compartimentos celulares e alterações patológicas poderão ser produzidas (hipótese “spillover”). As metalotioninas protegem complexos enzimáticos ou tecidos somente se a tionina for sintetizada em uma quantidade equivalente a quantidade de entrada dos metais no animal. Vesículas e grânulos contendo metais são encontrados dentro e fora da célula em uma variedade de organismos; o cobre, por exemplo, pode ser armazenado nos lisossomos hepáticos, ligados a metalotioninas. Alguns autores sugerem que esses grânulos são locais de acúmulo de desintoxicação dos metais e servem como indicadores biológicos de poluição (KITO *et al.*, 1982 a, b; LEY *et al.*, 1983; HAMZA-CHAFFAI *et al.*, 1999). A metalotionina provavelmente é a última defesa metabólica antes das lesões patológicas e morte celular, e medidas de concentração destas proteínas poderão auxiliar na avaliação da intoxicação de metais em peixes.

Vários métodos para a identificação das metalotioninas têm sido utilizados em peixes, dentre eles destacam-se os de YAMAMOTO *et al.* (1978) e McCARTER & ROCH (1983) que purificaram através de cromatografia de filtração em gel, Sephadex G-75, a metalotionina do hepatopâncreas de *Cyprinus carpio*, e fígado de *Oncorhynchus kisutch*, respectivamente; KITO *et al.* (1982 a) analisaram a síntese da metalotionina no hepatopâncreas, rim, brânquias, intestino, baço, bile e músculo em diferentes espécies de peixes *Carassius carassius*, *Leuciscus*, *Tribolodon hakonesis*, *Lateolabrax japonicus* e *Plecoglossus altivelis*, através de cromatografia de filtração em gel, Sephadex G-75; McCARTER *et al.* (1982) utilizaram Sephadex G-75 e DEAE-celulose em fígado de *O. kisutch*; KITO *et al.* (1982 a) utilizaram Sephadex G-75 e DEAE-Sephadex A-25 para a

obtenção da metalotionina do hepatopâncreas de *C. carpio*; LEY *et al.* (1983), em fígado de *Oncorhynchus mykiss*, utilizaram Sephadex G-75 e DEAE-Sephadex A-25; McCARTER & ROCH (1984) verificaram a síntese e a cinética de metalotionina no sangue, brânquias, rim e fígado de *O. kisutch* e para a detecção da metalotionina utilizaram cromatografia em Sephadex G-75; BROWN *et al.* (1990) em fígado, rim, intestino e brânquias de *Scorpaena guttata*, determinaram através de purificação em Sephadex G-75 a presença da metalotionina e sua concentração; HOGSTRAND & HAUX (1990) em fígado de *Haemulon sciurus* utilizaram Sephadex G-75 e anticorpos de coelho (RIA) para a análise; HAO *et al.* (1993) estudando cérebro de *O. mykiss*, utilizaram Sephadex G-75 e cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A-25, a metalotionina foi aplicada em eletroforese SDS-poliacrilamida para a visualização da banda proteica; HAMZA-CHAFFAI *et al.* (1995) utilizaram brânquias e fígado de *Diplodus annularis*, *Scorpaena porcus* e *Scorpaena scrofa*, as amostras foram analisadas através de pulso polarográfico (DPP) a qual se baseia na determinação de compostos SH; DANG *et al.* (1999) em brânquias de *Oreochromis mossambicus*, detectaram a metalotionina através da técnica de imunorreação; AHMAD *et al.* (2000) em fígado de *Channa punctatus*, determinaram a metalotionina em Sephadex G-50 e Q-Sepharose e a visualização da banda proteica foi em eletroforese SDS-poliacrilamida. MAYER *et al.*, (2003) que utilizaram células de linhagem de truta e salmão e, após exposição ao zinco e prata, verificaram a síntese da metalotionina.

A propriedade ecotoxicológica do metal depende da sua capacidade em se complexar com radicais sulfetos livres e com macromoléculas. A distribuição e concentração de cobre nos tecidos de peixes depende da sua forma, concentração na água, dieta, tempo de exposição, metabolismo e capacidade de eliminação do tecido. Dentre os metais pesados, poucos trabalhos relatam o efeito do cobre em bioquímica, particularmente, em enzimas do metabolismo oxidativo, enzimas antioxidantes, metabolismo de lipídeos e síntese de energia. Estudos envolvendo a influência do cobre no metabolismo de lipídeos têm sido realizados em alguns tecidos de peixes. SIVARAMAKRISHNA *et al.* (1992) verificaram a influência do cobre no metabolismo lipídico de *Labeo rohita* e mostraram que concentrações letais de cobre provocavam decréscimo nos lipídeos totais, aumento nos ácidos graxos livres, glicerol e atividade da lipase nas brânquias, fígado, músculo e cérebro entretanto, a exposição a concentrações subletais de cobre

provocou aumento nos níveis de lipídeos totais, ácidos graxos livres, glicerol e atividade da lipase em todos os órgãos analisados.

Os efeitos do cobre foram analisados na atividade da glutamato oxalacética transaminase do plasma em *Salvelinus fontinalis* (McKIM *et al.*, 1970); na atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase em *O. kisutch* (LORZ & McPHERSON, 1976), *Platichthys flesus* (STAGG & SHUTTLEWORTH, 1982), *Lepomis macrochirus* (HEATH, 1987) e em *O. mossambicus* (PELGROM *et al.*, 1995); na atividade da Delta-amino levulinate desidratase em *Pimelodus maculatus* (RODRIGUES *et al.*, 1989); na atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase em *Dicentrarchus labrax* (ROCHE & BOGÉ, 1993). LETT *et al.* (1976) verificaram o efeito do cobre na bioenergética de *O. mykiss*. O cobre afetou, inicialmente, o crescimento, alimentação e composição corporal dos animais. A redução inicial do crescimento, segundo esses autores, deveu-se, possivelmente, à uma elevada taxa metabólica e desprendimento de energia, associada ao mecanismo excretório para o cobre e processos de desintoxicação. TÓTH *et al.* (1996) em *C. carpio* expostos ao sulfato de cobre, verificaram aumento na atividade da LDH e na concentração de glicose, no plasma, sendo que a via anaeróbia tornou-se essencial no metabolismo desses animais, observaram também aumento de 130% na atividade da GOT e de 300% na GPT. KRAMER *et al.* (1992) estudaram o efeito do cloreto de mercúrio associado com a privação de alimento em metabólitos da glicólise e do ciclo de Krebs em *Gambusia holbrooki*. Nos animais controle, a privação causou diminuição na concentração de G-6-P e F-6-P e, nos animais expostos ao metal, causou diminuição na concentração de G-6-P e F-6-P, aumento na concentração de piruvato,  $\alpha$ -cetogluturato, succinato e malato. O aumento nos metabólitos do ciclo de Krebs reflete maior atividade no ciclo em resposta à exposição do mercúrio, provavelmente, devido a demanda de energia associada com a manutenção da homeostase sob condições de estresse e processos de desintoxicação.

### ***Fatores ambientais na toxicidade do cobre***

As características químicas e físicas da água e a biologia da espécie em questão têm influência na toxicidade do cobre (LAURÉN & McDONALD, 1985; MAZON & FERNANDES, 1999; LEMUS & CHUNG, 1999; TAO *et al.*, 1999, 2001). Entre os vários fatores ambientais que influenciam a toxicidade do cobre em peixes, o pH, dureza da água e a temperatura, têm importância fundamental.

A temperatura é importante do ponto de vista fisiológico e bioquímico. O efeito da temperatura nas propriedades cinéticas e estruturais de enzimas de animais peilotérmicos reflete fatores específicos de adaptações bioquímicas desses organismos, como por exemplo a energia de ativação e a afinidade da enzima ao substrato que é definida pela constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) (HOCHACHKA & SOMERO, 1968).

Os processos físico-químicos, incluindo as reações bioquímicas dos organismos vivos, são sensíveis à mudanças de temperatura. Com relação às enzimas, dois tipos de mecanismos podem ser aplicados nos efeitos intrínsecos de mudanças na temperatura e função catalítica. No primeiro mecanismo, uma variante enzimática é expressa durante o período de aclimatização ou aclimatação, a qual foi adaptada especificamente para funcionar em uma certa temperatura. No segundo mecanismo, a quantidade de enzima, dentro da célula, é ajustada à nova temperatura sem uma mudança qualitativa na forma da proteína. A mudança na quantidade de enzimas durante a aclimatização ou aclimatação ocorre através de ajustes nas taxas de renovação de proteínas (MOERLAND, 1995). Segundo BALDWIN *et al.* (1975) a atividade total de enzimas nos tecidos pode ser ajustada por mudanças na eficiência catalítica como também por alteração na quantidade da enzima que constitui uma vantagem adaptativa para espécies que dependem de um grau maior da glicólise anaeróbia e que apresentam conteúdo energético menor.

Segundo VAL & ALMEIDA-VAL (1995), os efeitos da temperatura (15, 25 e 35 °C) na LDH dos músculos esqueléticos e cardíaco de *Mylossoma duriventris* em pH 7,5 ou 6,0 são maiores que os observados em pH 8,5, enquanto que, em *Colossoma macropomum*, a LDH do músculo cardíaco não apresentou alteração nos valores de  $K_M$ , nas diferentes temperaturas. A manutenção do  $K_M$ , em pHs fisiológicos para a LDH do músculo cardíaco é importante porque este músculo não sustenta uma alta taxa de glicólise anaeróbia. Valores de alta afinidade, isto é,  $K_M$  baixo para a LDH, asseguram baixa taxa de glicólise anaeróbia no músculo cardíaco para ambas espécies.

As mudanças na temperatura causam alteração nos pHs intracelulares, a combinação pH x temperatura tem um efeito significativo na regulação da atividade das enzimas no organismo. A dependência do pH intracelular em relação a temperatura pode afetar o desempenho de muitas enzimas (YANCEY & SOMERO, 1978; SOMERO, 1981; OZERNYUK *et al.*, 1994). Uma alteração na temperatura promoverá uma mudança

compensatória na afinidade da enzima ao substrato. A temperatura ótima, ou temperatura fisiológica, é definida como a temperatura na qual os valores de  $K_M$  são mínimos, este fato tem importância nos mecanismos de adaptação biológica (HOCHACHKA & SOMERO, 1968). As temperaturas altas, como as encontradas na Amazônia, aumentam a necessidade de energia no animal e, conseqüentemente, aumentam os valores de  $K_M$ , diminuindo a afinidade da enzima pelo substrato.

Nos peixes a regulação fisiológica dos eletrólitos é sensível aos estressores ambientais e a redução do pH da água mobiliza os metais. WAIWOOD & BEAMISH (1978) associaram o aumento da toxicidade do cobre ao pH baixo enquanto que CHACOUMAKOS *et al.* (1979), CUSIMANO *et al.* (1986) e LAURÉN & McDONALD (1985) sugeriram que a ação tóxica dos metais pode ser um efeito combinado do estresse osmorregulatório e produção de muco pelas brânquias. A perda de íons sódio pelas brânquias é o resultado de um desequilíbrio entre influxo e efluxo de íons. O mecanismo de ação do cobre, alumínio e hidrogênio no transporte de sódio e permeabilidade nas brânquias ainda não está bem esclarecido. LAURÉN & McDONALD (1985) verificaram alterações no transporte de sódio em *O. mykiss* exposta ao cobre. Em concentrações abaixo de 0,4  $\mu\text{M}$  o cobre inibiu a entrada de sódio e estimulou a saída em concentrações acima de 2,0  $\mu\text{M}$ . Altas concentrações de cobre e hidrogênio estimularam a saída de sódio contribuindo com a perda deste íon.

A forma na qual o cobre pode ocorrer na água, as substâncias que podem complexar-se com o metal e que podem estar presentes no ambiente aquático, tem sido intensamente estudada, algumas das variabilidades devem-se a característica da água que podem modificar a toxicidade do cobre (PICKERING & HENDERSON, 1966; SHAW & BROWN, 1974; HOWARTH & SPRAGUE, 1978). O sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) na água se dissocia em  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , o cobre na forma de íon livre é tóxico ao peixe. O íon cobre pode se complexar com íons carbonatos e hidróxidos e assim produzir  $\text{CuCO}_3$ ,  $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{-2}$ ,  $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$  e  $\text{CuOH}^+$ , na qual a forma  $\text{CuOH}^+$  pode ser a mais tóxica (SHAW & BROWN, 1974).

O comportamento do cobre com íons carbonatos e hidróxidos é determinado pela alcalinidade e pH da água. Na água doce, o cobre cúprico (forma mais tóxica do metal) reage com o bicarbonato e hidróxido para dar malaquita [ $2 \text{Cu}^{2+} + \text{HCO}_3^- + 2 \text{OH}^- \leftrightarrow \text{Cu}_2(\text{OH})_2 \text{CO}_3 + \text{H}^+$ ]. Em concentrações baixas de cobre (menor que 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e pHs abaixo de 8,0, a reação entre cobre cúprico e dióxido de carbono é insignificante em

comparação com o que ocorre entre cobre cúprico e bicarbonato ( $\text{Cu}^{2+} + \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CuCO}_3 + \text{H}^+$ ), desta forma, com exceção de águas ácidas, a concentração do cobre complexado com carbonato poderá exceder ao cobre cúprico (= íon cobre) (SHAW & BROWN, 1974).

Além das alterações no equilíbrio iônico a hematologia pode fornecer dados importantes para a compreensão do efeito dos metais em peixes. McKIM *et al.* (1970) que estudaram o efeito do cobre ( $24$  a  $69 \mu\text{g.L}^{-1}$ ;  $12^\circ\text{C}$ ; pH  $7,4$ ) durante  $6$  e  $21$  dias, em *Salvelinus fontinalis*, verificaram aumento no hematócrito (Hct), número de eritrócitos (RBC) e concentração de hemoglobina ([Hb]) o mesmo foi observado por MISHRA & SRIVASTAVA (1980), em *Colisa fasciatus* expostos ao cobre ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ – $96\text{h}$ ;  $25^\circ\text{C}$ ; pH  $7,3$ ). Estes autores consideraram estas respostas como sendo, provavelmente, um mecanismo homeostático para compensar a perda de sangue devido a hemorragia após a exposição ao metal. DICK & DIXON (1985) que estudaram o efeito da exposição aguda e crônica do cobre em *Salmo gairdneri*, ( $15^\circ\text{C}$ ; pH  $7,8$ ) observaram diminuição significativa nos eritrócitos em exposição aguda. HEATH (1987) verificou o efeito do cobre ( $0,77 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $20^\circ\text{C}$ ; pH  $7,7$ ) e do NaCl ( $250 \text{ mM}$ ), em *Lepomis macrochirus*. Esses animais exibiram aumento no Hct na presença do cobre e do NaCl enquanto que nos animais expostos somente ao cobre não houve mudança nos valores do Hct, sendo esta resposta atribuída ao estresse. BENSON *et al.* (1988) observaram diminuição no Hct, [Hb] e RBC em *Pimephales promelas*, *Notemigonus crysoleucas* e *L. macrochirus* quando expostos a diferentes concentrações de cádmio. BANERJEE & HOMECHAUDHURI (1990) que estudaram o efeito do cobre ( $10,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $29^\circ\text{C}$ ; pH  $7,26$ ) em *Heteropneustes fossilis* verificaram nas primeiras horas de exposição diminuição nos valores de Hct, RBC e [Hb]; após  $6$  horas e até  $48$  horas de exposição verificaram aumento nos valores de Hct, RBC e [Hb] e após  $60$  e até  $72$  horas de exposição os valores sanguíneos novamente diminuiram. Estes autores atribuíram o decréscimo inicial nos valores sanguíneos como hemodiluição sendo reflexo de problemas ocasionados por alterações no fluxo de sódio pelas brânquias. Entretanto, o aumento no Hct, RBC e [Hb] foi atribuído a hemoconcentração. NUSSEY *et al.* (1995) verificaram o efeito do cobre ( $0,16$  e  $0,40 \text{ mg.L}^{-1}$  –  $96\text{h}$  e  $0,40 \text{ mg.L}^{-1}$  -  $4$  semanas) em *O. mossambicus* a  $19$  e  $29^\circ\text{C}$ . O cobre induziu aumento do RBC, [Hb] e Hct. Não houve diferença nas variáveis sanguíneas entre as duas temperaturas estudadas.

No Brasil, o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do DCF/UFSCar vem, desde 1995, estudando os efeitos do cobre em *Prochilodus scrofa* considerando as características físicas e químicas da água do rio Mogi-Guaçu, SP. Esses estudos revelaram que essa espécie tem alta sensibilidade ao cobre ( $CL_{50} = 29 \pm 3 \mu\text{g.L}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 7,0 \pm 0,1$ ) e que ocorre um grande acúmulo de cobre no fígado, brânquias, rins e inclusive no plasma de animais expostos a concentração letal de cobre (MAZON & FERNANDES, 1999). Além disso, a exposição ao cobre provocou alterações histopatológicas nesses órgãos até na concentração de  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Resolução CONAMA no. 20, de 20/06/1986) adotada como limite de cobre para a preservação da vida aquática (MAZON *et al.*, 1999 e 2002).

Considerando que o efeito de poluentes em peixes e outros organismos altera a função das células e sua estrutura, o presente trabalho teve como objetivo:

### **OBJETIVOS**

Verificar a influência do pH e da temperatura na água sobre o efeitos do cobre no fígado e sangue de curimatá, *Prochilodus scrofa* por análise hematológica, morfológica, enzimática e indução de metalotionina.

#### ***Os objetivos específicos foram:***

- a) Determinar a  $CL_{50-96h}$  para o cobre em *Prochilodus scrofa* em água com pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C;
- b) Determinar os efeitos do cobre, pH (4,5 e 8,0) em duas temperaturas (20 e 30 °C) nos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos em *Prochilodus scrofa*;
- c) Determinar a concentração de glicose plasmática e glicogênio hepático e a atividade das enzimas regulatórias da via glicolítica (hexoquinase, piruvatoquinase e fosfofrutoquinase), a atividade das enzimas associadas: glicose-6-fosfato desidrogenase e lactato desidrogenase no sangue e fígado de *Prochilodus scrofa*;
- d) Determinar a atividade das enzimas regulatórias da via glicolítica (hexoquinase, piruvatoquinase e fosfofrutoquinase), a atividade das enzimas associadas: glicose-6-fosfato desidrogenase e lactato desidrogenase no sangue e fígado de *Prochilodus scrofa* após exposição ao cobre *in vitro*;

f) Verificar o efeito da CL<sub>50</sub>-96h para o cobre em *Prochilodus scrofa* em água com pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C na indução da metalotionina no fígado;

g) Verificar as alterações histopatológicas em *Prochilodus scrofa* após exposição ao cobre (CL<sub>50</sub>-96h) em água com pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C;

Assim, seguindo-se o Capítulo 1 (Introdução geral), no capítulo 2, são apresentados os valores das CL<sub>50</sub>-96h do cobre para *Prochilodus scrofa* determinadas em água com pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C.

No capítulo 3, os parâmetros hematológicos e os índices hematimétricos para *Prochilodus scrofa* mantidos em água com pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C e expostos ao cobre são apresentados e discutidos.

No capítulo 4, a atividade das enzimas regulatórias e associadas do sangue e do fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa* foram determinadas *in vivo* e *in vitro* após a exposição a CL<sub>50</sub>-96h para o cobre em água com pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C.

No capítulo 5, foi determinado o acúmulo de cobre e isolada e identificada a metalotionina no fígado de *Prochilodus scrofa* após a determinação da CL<sub>50</sub>-96h em água com pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C.

No capítulo 6, as alterações histopatológicas no fígado de *Prochilodus scrofa* expostos ao cobre (CL<sub>50</sub>-96h) em água com pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C foram identificadas e quantificadas.

### Referências Bibliográficas

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* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1523, p. 37-48, 2000.

BALDWIN, J.; STOREY, K.B.; HOCHACHKA, P.W. Lactate dehydrogenase isoenzymes on cellulose acetate. **Biochem. J.**, v. 84, p. 83.

BANERJEE, S.; HOMECHAUDHURI, S. Hematological monitoring of a bio-indicator fish, *Heteropneustes fossilis*, on a exposure to copper toxicity. Israel. J. **Aquaculture, Bamidgeh**, v. 42, n. 2, p. 46-51. 1990.

BEAUMONT, M.W.; BUTLER, P.J.; TAYLOR, E.W. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon muscle metabolism and membrane potential. **Aquatic Toxicol.**, v. 51, p. 259-272. 2000.

BENSON, W.H.; WATSON, C.F.; BAER, K.N.; STACKHOUSE, A. Response of hematological and biochemical parameters to heavy metal exposure: implications in environmental monitoring. **Mar. Environ. Res.**, v. 24, p. 219-222, 1988.

- BRAGIGAND, V.; BERTHET, B. Some methodological aspects of metallothionein evaluation. **Comp. Biochem. Physiol. (A)**, v.134, p. 55-61, 2003.
- BROWN, D.A.; BAY, S.M.; PATRICK HERSHELMAN, G. Exposure of scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to cadmium: effects of acute and chronic exposures on cytosolic distribution of cadmium, copper and zinc. **Aquatic Toxicol.**, v. 16, p. 295-310, 1990.
- CHAKOUMAKOS, C.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Toxicity of copper to cutthroat trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, pH and hardness. **Amer. Chem. Soc.**, v. 13, n. 2, p. 213-219, 1979.
- CUSIMANO, R.F.; BRAKKE, D.F.; CHAPMAN, G. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 43, p. 1497-1503, 1986.
- DANG, Z.; LOCK, R.A.C.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S.E. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. **Am. J. Physiol.**, 277 (Regulatory Integrative Comp. Physiol.), v. 46, p. 320-331, 1999.
- DANG, Z. Adaptative stress responses in fish gills. Ph D Thesis. University of Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands, 2000.
- DICK, P.T.; DIXON, D.G. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. **Fish. Soc. British Isles.**, v. 4, p. 475-481, 1985.
- DUTTON, M.D., STEPHENSON, M., KLAVERKAMP, J.F. Metallothionein in fish. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 12, p. 1193-1202, 1993.
- HAMILTON, S.T., MEHRLE, P.M. Metallothionein in fish: Review of its importance in assessing stress from metal contaminants. *Transact. American Fish. Soc.*, 115: 596-609, 1986.
- HAMZA-CHAFFAI, A.; COSSON, R.P.; AMIARD-TRIQUET, C.; EL ABED, A. Physico-chemical forms of storage of metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein-like proteins in gills and liver of marine fish from the Tunisian coast: ecotoxicological consequences. **Comp. Biochem. Physiol., (C)**, v. 111, p. 329-341, 1995.
- HAMZA-CHAFFAI, A.; AMIARD, J.C.; COSSON, R.P. Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of the clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non-linear model using Box-Cox transformation. **Comp. Biochem. Physiol., (C)**, v. 123, p. 153-163, 1999.
- HAO, R.; PFEIFFER, R.F.; EBADI, M. Purification and characterization of metallothionein and its activation of pyridoxal phosphokinase in trout (*Salmo gairdneri*) brain. **Comp. Biochem. Physiol., (B)**, v.104, n. 2, p. 293-298, 1993.
- HEATH, A.G. Effects of waterborne copper or zinc on the osmoregulatory response of bluegill to a hypertonic NaCl challenge. **Comp. Biochem. Physiol., (C)** v. 88, n. 2, p. 307-311, 1987.
- HEATH, A.G. Water pollution and fish physiology. **CRC Press**, Lewis Publishers, 2<sup>nd</sup> ed. 1995.
- HOCHACHKA, P.W.; SOMERO, G.N. The adaptation of enzymes to temperature. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 27, p. 659-668, 1968.
- HOGSTRAND, C.; HAUX, C. Metallothionein as a indicator of heavy-metal exposure in two subtropical fish species. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 138, p. 69-84, 1990.
- HOWARTH, R.S.; SPRAGUE, J.B. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. **Water Res.**, v. 12, p. 445-462, 1978.
- KITO, H.; OSE, Y.; MIZUHIRA, V.; SATO, T.; ISHIKAWA, T.; TAZAWA, T. Separation and purification of (Cd, Cu, Zn) metallothionein in carp hepato-pancreas. **Comp. Biochem. Physiol., (C)** v. 73, n. 1. p. 121-127, 1982a.

- KITO, H.; TAZAWA, T.; OSE, Y.; SATO, T.; ISHIKAWA, T. Formation of metallothionein in fish. **Comp. Biochem. Physiol., (C)** v. 73, n. 1, p.129-134, 1982b.
- KRAMER, V.J.; NEWMAN, M.C.; ULTSCH, G.R. Changes in concentrations of glycolysis and Krebs cycle metabolites in mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, induced by mercuric chloride and starvation. **Environ. Biol. Fish.**, v. 34, p. 315-320, 1992.
- LAURÉN, D.J.; McDONALD, D.G. Influence of water hardness, pH and alkalinity on the mechanism of copper toxicity in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 43, p. 1488-1486, 1985.
- LEMUS, M.J.; CHUNG, K.S. Effect of temperature on copper toxicity, accumulation and purification in tropical fish juveniles *Petenia kraussii* (Pisces, Cichlidae). **Caribbean Journal of Science**, v.35, n. 1-2, p. 64-69, 1999.
- LETT, P.; FARMER, G.F.; BEAMISH, F.W.H. Effect of copper on some aspects of the bioenergetics of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Fish. Res. Board. Can.**, v. 33, p. 1335-1342, 1976.
- LEY, H.L.; FAILLA, M.L.; CHERRY, D.S. Isolation and characterization of hepatic metallothionein from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comp. Biochem. Physiol., B.** v. 74, n. 3, p. 507-513, 1983.
- LORZ, H.W.; McPHERSON. Effects of copper or zinc in fresh water on the adaptation to sea water and ATPase activity, and the effects of copper on migratory disposition of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **J. Fish. Res. Board. Can.**, v. 33, p. 2023-2030, 1976.
- MALINS, D.C; OSTRANDER, G.K. Aquatic Toxicology: **Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**, Lewis Publishers, Boca Raron, FL. 1994.
- MAYER, G.D.; LEACH, A.; KLING, P.; OLSSON, P.E.; HOGSTRAND, C. Activation of the rainbow trout metallothionein-A promoter by silver and zinc. **Comp. Biochem. Physiol., (B)**. v. 134, p. 181-188, 2003.
- MAZON, A.F.; FERNANDES, M.N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 63, p. 797-804, 1999.
- MAZON, A.F.; CERQUEIRA, C.C.C.; MONTEIRO, E.A.S.; FERNANDES, M.N. Acute copper exposure in freshwater fish: morphological and physiological effects. In: **Biology of Tropical Fishes** (Val, A.L. & ALMEIDA VAL, VAL, V.M., eds.), INPA, Manaus, v.21, p. 263-275, 1999.
- MAZON, A.F.; CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the south american tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environ. Res.**, v. 88 (A), p. 52-63, 2002.
- McCARTER, J.A.; MATHESON, A. T.; ROCH, M.; OLAFSON, R.W.; BUCKLEY, J.T. Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper - II. Distribution of copper between high and low-molecular-weight proteins in liver cytosol and the possible role of metallothionein in detoxification. **Comp. Biochem. Physiol., (C)** v. 72, n.1, p. 21-26, 1982.
- McCARTER, J.A.; ROCH, M. Hepatic metallothionein and resistance to copper in juvenile coho salmon. **Comp. Biochem. Physiol., (C)**. v. 74, n. 1, p. 133-137, 1983.
- McCARTER, J.A.; ROCH, M. Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper - III. Kinetics of metabolism of metallothionein. **Comp. Biochem. Physiol., (C)**. v. 77, n.1, p.83-87, 1984.
- McKIM, J.M.; CHRISTENSEN, G.M.; HUNT, E.P. Changes in the blood of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) after short-term and long-term exposure to copper. **J. Fish. Res. Bd. Can.**, v. 27, p. 1883-1889, 1970.

- MISHRA, S.; SRIVASTAVA, A.K. The acute toxic effects of copper on the blood of a teleost. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 4, p. 191-194, 1980.
- MOERLAND, T.S. Temperature: Enzyme and organelle in: Hochachka and Mommsen, **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 5, Amsterdam, Elsevier. 1995.
- NUSSEY, G.; VAN VUREN, J.H.J.; du PREEZ, H.H. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (CICHLIDAE). **Comp. Biochem. Physiol. (C)** v. 111, n. 3, p. 369-380, 1995.
- OZERNYUK, N.D.; KLYACHKO, O.S.; POLOSUKHINA, E.S. Acclimation temperature affects the functional and structural properties of lactate dehydrogenase from fish (*Mysgurnus fossilis*) skeletal muscles. **Comp. Biochem. Physiol., (B)** v. 107, n. 1, p. 141-145, 1994.
- PASSINO, M.; KRAMER, J.M. Subcellular distribution of mercury in liver of lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Experientia**, v.38, p. 689-690. 1982.
- 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 a sublethal copper exposure. **Aquatic toxicol.**, v. 32, p. 303-320, 1995.
- PICKERING, Q.H.; HENDERSON, P. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warm water fishes. **Air water Pollut Int J.**, v. 10, p. 453-463, 1966.
- ROCHE, H.; BOGÉ, G. Effects of Cu, Zn, and salts on antioxidant enzyme activities *in vitro* of red blood cells of a marine fish *Dicentrarchus labrax*. **Toxic in Vitro**, v. 7, n. 5, p. 623-629, 1993.
- RODRIGUES, A.L.; BELLINASSO, M.L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). **Comp. Biochem. Physiol., (B)** v. 94, n. 1, p. 65-69, 1989.
- SHAW, T.L.; BROWN, V.M. The toxicity of some forms of copper to rainbow trout. **Water Research.**, v. 8, p. 377-382, 1974.
- SIMKISS, K.; TAYLOR, M.; 1981. Cellular mechanisms of metal ion detoxification and some new indices of pollution. **Aquatic. Toxicol.**, v. 1, p. 279-290, 1981.
- SIVARAMAKRISHNA, B.; SURESH, A.; VENKATARAMANA, P.; RADHAKRISHNAIAH, K. Copper influenced changes of lipid metabolism in the tissues of freshwater teleost *Labeo rohita* (Hamilton). **Biochem. Int.**, v. 26, n. 2, p. 335-342, 1992.
- SOMERO, G.N. pH-temperature interactions on proteins: principles of optimal pH and buffer system design. **Mar. Biol. Letters.**, v. 2, p. 163-178, 1981.
- STAGG, R.M.; SHUTTLEWORTH, T.J. The effects of copper on ionic regulation by the gills of the seawater-adapted flounder (*Platichthys flesus* L.). **J. Comp. Physiol.**, v. 149, p. 83-90, 1982.
- TAO, S.; LIANGT, T.; CAO, J.; DAWSON, R.; LIU, C. F. Synergistic effect of copper and lead uptake by fish. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 44, p. 190-195, 1999.
- TAO, S.; WEN, Y. ; LONG, A.; DAWSON, R.; CAO, J.; XU, F. Simulation of acid-base condition and copper speciation in the fish microenvironment. **Comp. Chem.**, v. 25, p. 215-222, 2001.
- TÓTH, L.; JUHÁSZ, M.; VARGA, T.; CSIKKEL-SZÓLNOKI, A.; NEMCSÓK, J. Some effect of CuSO<sub>4</sub> on carp. **J. Environ. Sci. Health., (B)** v. 31, n. 3, p. 627-635, 1996.
- VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Fishes of the Amazon and their environment. Physiological and Biochemical Aspect – **Zoophysiology**, v. 32, 224 pp, 1995.

YANCEY, P.H.; SOMERO, G.N. Temperature dependence of intracellular pH: Its role in the conservation of pyruvate apparent  $K_M$  values of vertebrate lactate dehydrogenases. **J. Comp. Physiol.**, v. 125, p. 129-134, 1978.

WAIWOOD, K.G.; BEAMISH, F.W.H. Effects of copper, pH and hardness on the critical swimming performance of rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). **Water Res.**, v. 12, p. 611-619, 1978.

## CAPÍTULO 2

### **TOXICIDADE DO COBRE EM *PROCHILODUS SCROFA* (STEINDACHNER, 1881): INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA**

#### **Resumo**

Os peixes são sensíveis as variações ambientais e mudanças no pH da água provocam ajustes do pH nestes organismos para manter a homeostase e, similarmente, a exposição aos metais também provoca desequilíbrios na regulação iônica. O objetivo do presente trabalho foi verificar a interação do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre em *P. scrofa*, curimatá. Os animais foram aclimatados a 20 e 30 °C em pH 7,0 e dureza total de  $\text{CaCO}_3 = 24 \text{ mg L}^{-1}$ . *P. scrofa* foram expostos durante 96 h a diferentes concentrações de cobre em água com pH 4,5 e 8,0 na mesma temperatura de aclimação (20 e 30 °C). A  $\text{CL}_{50-96 \text{ h}}$  para o cobre a 20 °C foi determinada como  $98 \pm 0,9 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  em pH 4,5 e  $16 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  em pH 8,0. A 30 °C, a  $\text{CL}_{50-96 \text{ h}}$  foi  $88 \pm 0,8 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  em pH 4,5 e  $14 \pm 0,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  em pH 8,0. Os grupos de animais expostos ao cobre em pH 4,5 mostraram-se agitados com hiperventilação enquanto que grupos de animais expostos ao cobre em pH 8,0 apresentaram redução na natação e aumento na produção de muco. Os resultados deste estudo mostraram que os animais expostos ao cobre em água com pH 8,0 apresentaram maior sensibilidade ao cobre do que os animais em água com pH 4,5, nas duas temperaturas.

#### **Introdução**

O cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) tem um papel importante no metabolismo celular, entretanto, ele pode ser tóxico em concentrações ambientais elevadas. De forma geral, sua biodisponibilidade e toxicidade dependem de vários fatores, incluindo as características químicas e físicas da água e a biologia das espécies afetadas (LAURÉN & McDONALD, 1985; MAZON & FERNANDES, 1999; TAO *et al.*, 1999). Entre os vários fatores ambientais que influenciam a toxicidade do cobre em peixes, o pH, a alcalinidade e a dureza da água, têm importância fundamental (TAO *et al.*, 2000). A biodisponibilidade do cobre no ambiente aquático depende dos fatores citados acima que podem favorecer as reações de complexação e a absorção dos metais (TAO *et al.*, 2000). Vários trabalhos descrevem a especiação do metal em ambientes aquáticos e têm demonstrado que uma forma predominante do metal no ambiente é potencialmente mais significativa na toxicidade aos organismos aquáticos do que a concentração total desse metal na água (TAO *et al.*, 1999; 2000 e 2001). A toxicidade do cobre e de outros metais pode variar com o tamanho, idade e estado nutricional dos peixes. Por exemplo, as  $\text{CL}_{50}$  para o cobre ( $\text{CuSO}_4$ ; pH 7,3-7,8; a 20,5 °C) em *Cyprinus carpio* é  $640 \pm 250 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  para peixes com 30 dias e  $5450 \pm 750 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  para peixes com 6 meses mostrando que os jovens são mais sensíveis ao cobre (KARAN *et al.*, 1998). Além

disso, as variações de temperatura no ambiente aquático exercem efeitos consideráveis em vários processos fisiológicos, tais como aumento da taxa metabólica, que se refletem na mudança de atividade de enzimas. Dentro de limites, uma alteração da temperatura pode deixar certas substâncias químicas biodisponíveis, uma vez que ela aumenta a solubilidade de sais e metais.

Os testes de toxicidade têm sido utilizados para avaliar o efeito dos efluentes e de outras substâncias consideradas tóxicas aos organismos e, apesar de não evidenciarem efeitos que poderiam ocorrer em tempos mais prolongados de exposição como por exemplo, na reprodução e no crescimento, fornecem dados fundamentais para o desenvolvimento e adoção de critérios na melhoria da qualidade da água. A dose aplicada em um teste de toxicidade mostra a concentração máxima que pode ser retida no organismo-teste como resultado de muitos processos internos incluindo absorção, distribuição nos tecidos, biotransformação em metabólitos ativos ou inativos e excreção. *P. scrofa* é uma espécie comercialmente importante nas regiões do Brasil e a concentração de cobre, nestes ambientes, está abaixo de  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ , entretanto, em algumas épocas do ano pode chegar à concentração de  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  (CETESB, 1994-2000). *P. scrofa* é uma espécie migratória o que pode favorecer o contato destes animais com águas contaminadas por metais e com características físicas e químicas alteradas. Assim o objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito interativo do pH baixo (4,5) e do pH alto (8,0) em duas temperaturas (20 e 30 °C) na toxicidade para o cobre ( $\text{CL}_{50}$ -96h) em *P. scrofa*.

## Material e Métodos

### *Animais*

Exemplares jovens de *P. scrofa*, curimatá (W= 15-25 g; L= 10-15 cm) foram obtidos da estação de Hidrobiologia e Aquacultura de Furnas-MG, Brasil e mantidos em tanques de 1.000 L a  $25 \pm 1$  °C com fluxo contínuo de água (pH =  $7,3 \pm 0,2$ ; condutividade =  $8,3 \pm 0,3 \mu\text{S}$  e dureza =  $24,5 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$  como  $\text{CaCO}_3$ ) e aeração constante (100 % de saturação de  $\text{O}_2$ ) durante 30 dias. Após a aclimação dois tanques contendo 500 peixes foram utilizados para a aclimação a 20 °C e a 30 °C. A temperatura da água foi alterada em 1 °C a cada dois dias até atingir as temperaturas de aclimação. O ajuste térmico foi obtido com um resfriador de líquidos (RT 20.00)

ligado a um controlador de temperatura (termostato FULL GAUGE), ou um aquecedor (2.000 W) conectado a um termostato. Os peixes foram mantidos nestas temperaturas por 30 dias até o início dos experimentos. As características físicas e químicas da água foram mantidas exceto a temperatura. O fotoperíodo foi de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada durante a aclimação. O pH, dureza e alcalinidade da água foram similares aos encontrados para *P. scrofa* em seu habitat natural e a temperatura representa a média mínima e máxima dos valores durante o inverno e verão (CETESB 1994-2000). A alimentação foi suspensa 24 horas antes do experimento.

### *Procedimento Experimental*

Para a determinação da concentração letal para 50% dos organismos testes ( $CL_{50-96h}$ ) foram utilizados sistemas estáticos com aeração constante e duração de 96 horas. A mortalidade foi registrada a cada 24 h de exposição.

A escolha das concentrações utilizadas para os testes foi feita a partir da análise das concentrações do íon cobre nas águas do rio Mogi-Guaçu, Município de Pirassununga-SP (a concentração média de cobre foi de  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (CETESB, 1994-2000), e dos resultados obtidos por MAZON & FERNANDES (1999) que determinaram a  $CL_{50-96h}$  em  $29 \mu\text{gCu}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 7,3) e por TAKASUSUKI (2000) que determinou a  $CL_{50-96h}$  em  $200 \mu\text{gCu}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 4,5) e  $14 \mu\text{gCu}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 8,0) a  $25^\circ\text{C}$  em *P. scrofa*.

Os aquários teste tinham capacidade para 180-200 litros de água e 8 exemplares de *P. scrofa* foram distribuídos de maneira a não ultrapassar o máximo de 1 g de peixe  $\text{L}^{-1}$ . As condições físico-químicas da água utilizada nos testes como temperatura, fotoperíodo (12 horas) e oxigênio dissolvido (aeração constante) foram controladas e as características de dureza, pH e condutividade medidas no início e fim dos experimentos. As características físico-químicas da água foram as mesmas mantidas durante o período de aclimação com exceção da temperatura e do pH. O cobre foi utilizado na forma de  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  para os testes de toxicidade e o ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e hidróxido de sódio (NaOH) P.A. foram utilizados para atingir e manter o pH desejado (pH 4,5 e 8,0).

Os testes foram realizados com 3 réplicas totalizando 24 exemplares de *P. scrofa* por concentração testada. As concentrações utilizadas foram 73, 75, 77, 80, 90, 100, 120, 130, 150 e  $180 \mu\text{g Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  para o pH 4,5 a  $20^\circ\text{C}$ ; 10, 14,5, 15, 15,5, 16, 17, 18, 19, 20 e  $25 \mu\text{g Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  para o pH 8,0 a  $20^\circ\text{C}$ ; 70, 80, 82, 85, 87, 90, 100, 110, 112 e  $115 \mu\text{g Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  para o pH 8,0 a  $20^\circ\text{C}$ .

L<sup>-1</sup> para o pH 4,5 a 30 °C; 10, 11, 12, 14, 15, 20, 25 e 30 µg Cu.L<sup>-1</sup> para o pH 8,0 a 30 °C µg Cu L<sup>-1</sup>, além do controle, 0µg Cu.L<sup>-1</sup>.

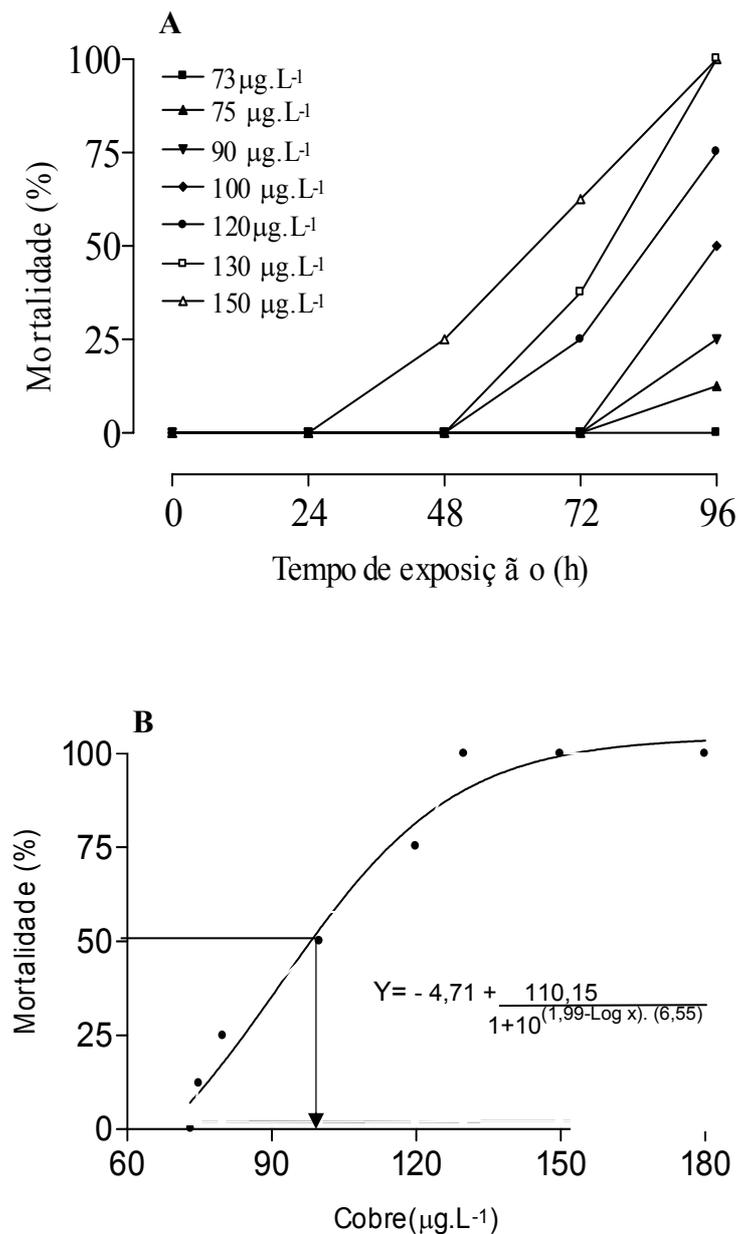
A partir dos dados de mortalidade em cada experimento as CL<sub>50</sub>-96h foram calculadas usando o método Trimmed Spearman-Kärber e o programa "LC<sub>50</sub> Program JSphear test" (HAMILTON *et al.*, 1977,1978) com intervalo de confiança de 95%.

### Resultados

Durante os experimentos não ocorreu mortalidade dos animais nos grupos controle pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C (Tabela 1). Os animais aclimatados a 20 °C em pH 4,5 expostos ao cobre em 73 µg.L<sup>-1</sup> não morreram durante o experimento e na concentração de 130 µg.L<sup>-1</sup> houve 100 % de mortalidade em 96 horas de exposição (Fig. 1A). O resultado do teste para CL<sub>50</sub>-96 a 20 °C, para o cobre em pH 4,5 foi de 98 ± 9 µg.L<sup>-1</sup> (Tabela 1 e Fig. 1B).

**TABELA I. CL<sub>50</sub> - 96h do cobre para *P. scrofa* em pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C.**

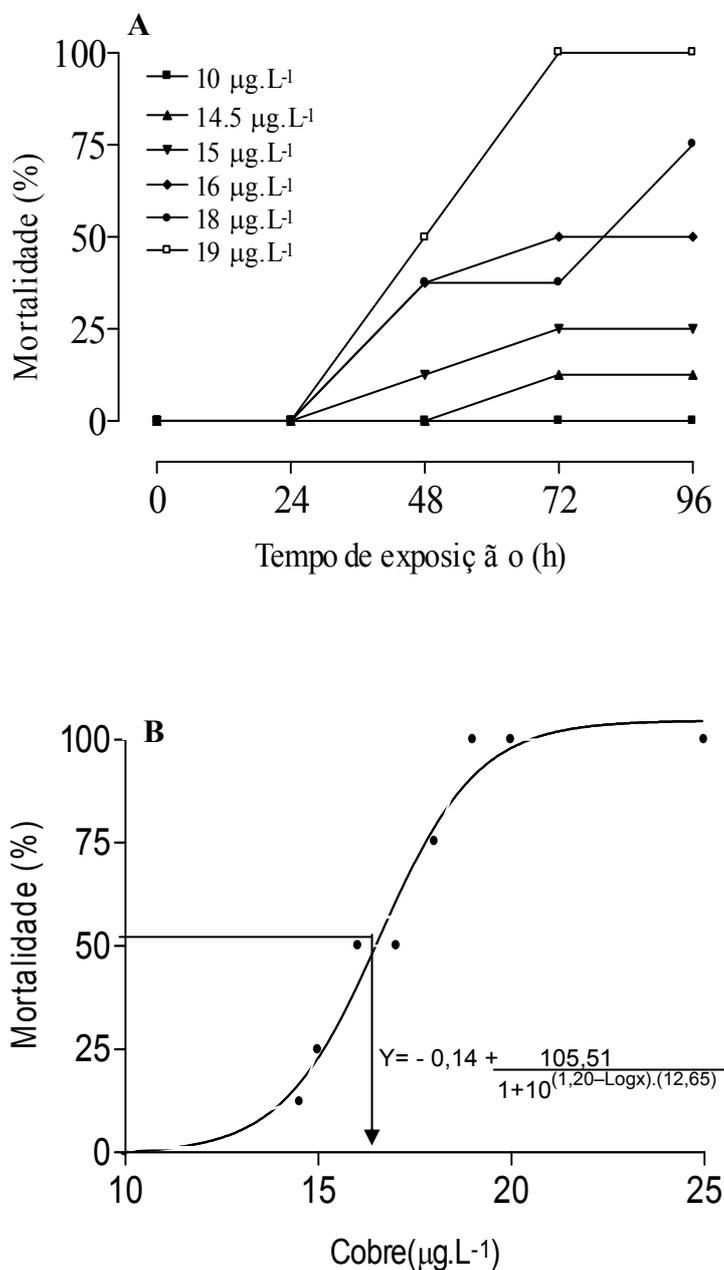
Água		Sobrevivência Controle (%)	Cobre CL <sub>50</sub> -96h (µgCu.L <sup>-1</sup> )
Temperatura	pH		
20 °C	4,5	100	98 ± 9
	8,0	100	16 ± 2
30 °C	4,5	100	88 ± 8
	8,0	100	14 ± 5



**Figura 1.** (A) Porcentagem cumulativa de mortalidade de *P. scrofa* em pH 4,5 a 20 °C durante 96 horas de exposição em diferentes concentrações de cobre na água (µgCu.L<sup>-1</sup>). (B) Curva da porcentagem de mortalidade de *P. scrofa* em resposta a diferentes concentrações de cobre na água (µgCu.L<sup>-1</sup>), aclimatados a 20 °C, em pH 4,5, mostrando a CL<sub>50</sub> em 96 horas de exposição. Log<sub>10</sub> (CL<sub>50</sub>) = 1,99.

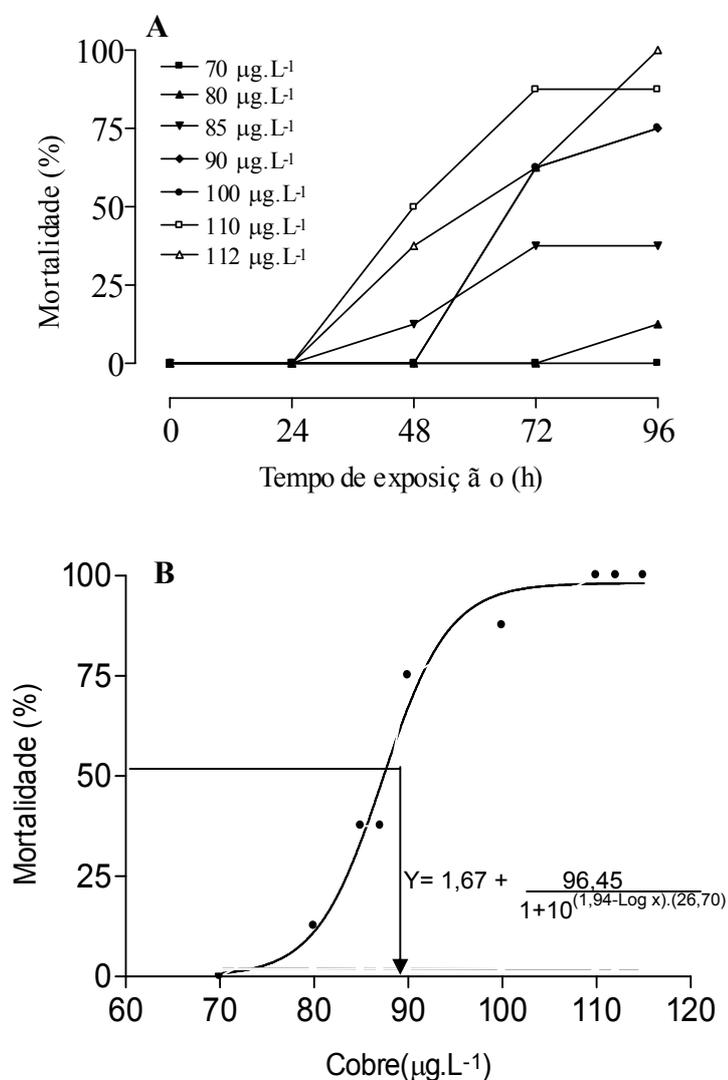
Os animais aclimatados a 20 °C em pH 8,0 e expostos a concentração de cobre de 10 µg.L<sup>-1</sup> não morreram durante todo o experimento entretanto, na concentração de 18 µg.L<sup>-1</sup> houve 75 % de mortalidade após 96 horas de experimento (Fig.2A) e em água

com  $19 \mu\text{g.L}^{-1}$ , 100% dos animais morreram em 72 horas de exposição. Nessa temperatura e pH a  $\text{CL}_{50-96}$  foi de  $16 \pm 2 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Tabela 1 e Fig. 2B).



**Figura 2.** (A) Porcentagem cumulativa da mortalidade de *P. scrofa* em pH 8,0 a  $20^{\circ}\text{C}$ , em pH 8,0, durante 96 horas de exposição em diferentes concentrações de cobre na água ( $\mu\text{gCuL}^{-1}$ ). (B) Curva da porcentagem de mortalidade de *P. scrofa* em resposta a diferentes concentrações de cobre na água ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ ), aclimatados a  $20^{\circ}\text{C}$ , em pH 8,0 mostrando a  $\text{CL}_{50}$  em 96 horas de exposição (B);  $\text{Log}_{10}(\text{CL}_{50}) = 1,20$ .

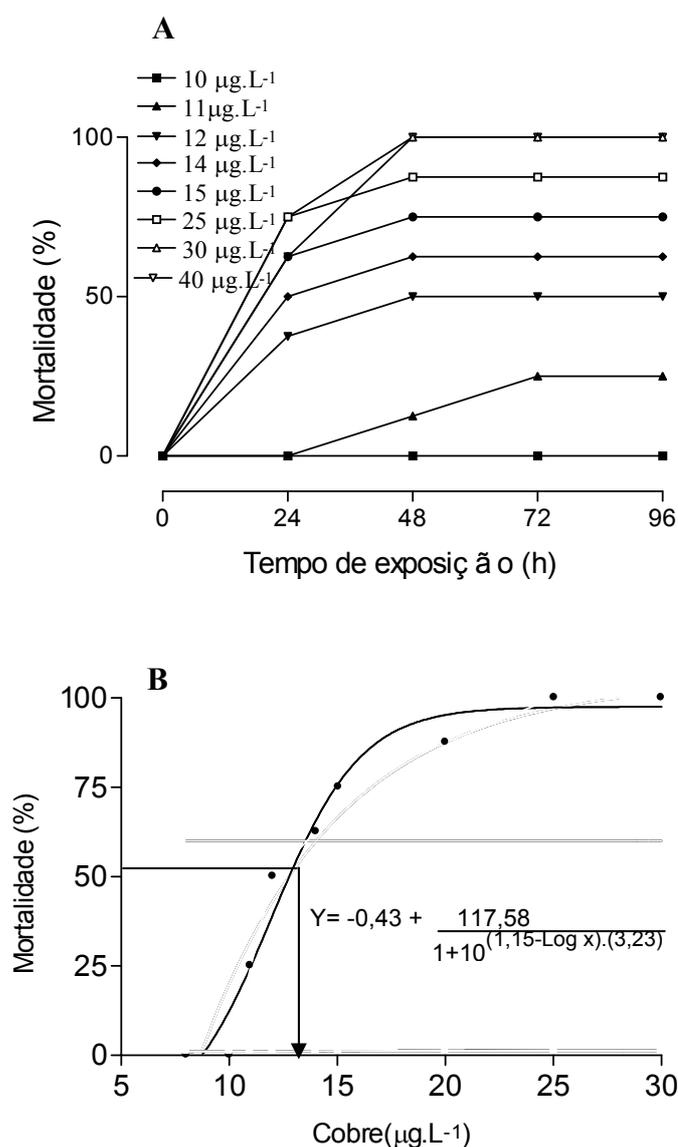
Os animais aclimatados a 30 °C em pH 4,5 e expostos a concentração de cobre de 70  $\mu\text{g.L}^{-1}$  não morreram durante o experimento e na concentração de 112  $\mu\text{g.L}^{-1}$  houve 100% de mortalidade em 96 horas de exposição (Fig. 3A). A 30 °C a  $CL_{50}$ -96 h para o cobre em pH 4,5 foi de  $88 \pm 8 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Tabela 1 e Fig.3B).



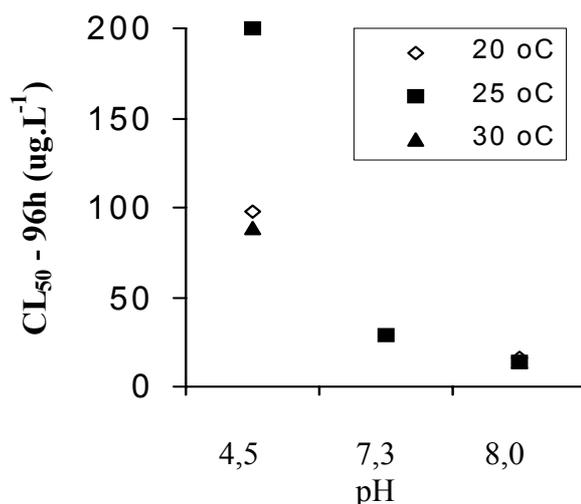
**Figura 3.** (A) Porcentagem de mortalidade de *P. scrofa* em pH 4,5 a 30 °C, durante 96 horas de exposição em diferentes concentrações de cobre na água ( $\mu\text{g Cu.L}^{-1}$ ) (B) Curva da porcentagem de mortalidade de *P. scrofa* em resposta a diferentes concentrações de cobre na água ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ ), aclimatados a 30 °C, em pH 4,5, mostrando a  $CL_{50}$  em 96 horas de exposição.  $\text{Log}_{10} (CL_{50}) = 2,0$ .

Os animais aclimatados a 30 °C em pH 8,0 e expostos a concentração de cobre de 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  não morreram durante o experimento porém na concentração de 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$  houve 100 % de mortalidade após 48 h de exposição (Fig. 4A). A 30 °C a  $CL_{50}$ -96 h para o cobre em pH 8,0 foi de  $14 \pm 5 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Tabela 1 e Fig.4B).

Não houve diferença significativa entre os valores da  $CL_{50}$  nos pH 4,5 e pH 8,0 em relação as temperaturas (20 e 30 °C) (Tabela 1).



**Figura 4.** (A) Porcentagem de mortalidade de *P. scrofa* em pH 8,0 a 30 °C, durante 96 horas de exposição em diferentes concentrações de cobre na água ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ ). (B) Curva da porcentagem de mortalidade de *P. scrofa* em resposta a diferentes concentrações de cobre na água ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ ), aclimatados a 30 °C, em pH 8,0, mostrando a  $CL_{50}$  em 96 horas de exposição.  $\text{Log}_{10}(CL_{50}) = 1,08$ .



**Figura 5.** CL<sub>50</sub>-96h para o cobre em relação ao pH e a temperatura em *P. scrofa*; pH 7,3 a 25 °C (Mazon & Fernandes, 1999); pH 4,5 e pH 8,0 a 25°C (Takasusuki, 2000) e pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C (presente estudo).

### Discussão

O pH (baixo e alto) influenciou na CL<sub>50</sub>-96h e, portanto, na toxicidade do metal para *P. scrofa* provavelmente devido a biodisponibilidade e a especiação do cobre pelo pH da água. A CL<sub>50</sub>-96h para o cobre em *P. scrofa* determinada no presente estudo mostra que o pH é um fator determinante para a sobrevivência desta espécie. O cobre foi mais tóxico em *P. scrofa* expostos ao pH alto em ambas as temperaturas e aparentemente, a temperatura não apresentou influência na toxicidade do metal.

As CL<sub>50</sub>-96h em pH 4,5 ( $98 \pm 9 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) e pH 8,0 ( $16 \pm 2 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) a 20 °C e em pH 4,5 ( $88 \pm 8 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) e pH 8,0 ( $14 \pm 5 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) a 30 °C mostram que estes valores estão acima e abaixo, respectivamente da CL<sub>50</sub>-96h ( $29 \pm 3 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) determinada por MAZON & FERNANDES (1999) a 25 °C em pH 7,3 (Fig. 5). A CL<sub>50</sub>-96h em pH 8,0 está relativamente próxima daquela determinada por TAKASUSUKI (2000), entretanto, a CL<sub>50</sub>-96h em pH 4,5 difere da determinada por este autor para esta espécie. A CL<sub>50</sub>-96h determinada para o cobre em *P. scrofa* foi 200 µg.L<sup>-1</sup> em pH4,5 e 14 µg.L<sup>-1</sup> em pH 8,0 a 25 °C (TAKASUSUKI, 2000) o que mostra uma maior sensibilidade ao cobre a 20 e 30 °C em pH 4,5 (Fig. 5). A CL<sub>50</sub> calculada para esta espécie foi semelhante às determinadas para *Pimephales promelas*, *Carassius auratus* e *Poecilia reticulatus* em água com dureza (20 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>), pH (7,5) e temperatura (25°C) similares (PICKERING & HENDERSON, 1966). CUSIMANO *et al.* (1986) verificaram que

*Oncorhynchus mykiss* exposta a vários metais, foi mais tolerante aos efeitos do cobre em pH baixo. Os resultados do presente estudo corroboram com o encontrado em *O. mykiss* por CUSIMANO *et al.* (1986) com o aumento da toxicidade do cobre acompanhando o aumento do pH (CRIST *et al.*, 1990). A competição do cobre com o íon hidrogênio pelos sítios de ligação do cálcio na superfície da membrana branquial e a sua maior afinidade por estes sítios do que o íon hidrogênio e o próprio cálcio parece ser a explicação da menor toxicidade do cobre em pH baixo (HOWARTH & SPRAGUE, 1978). Assim a maior toxicidade desse metal em pH alto poderia ser explicada pela baixa concentração de íons hidrogênio e de íons cálcio em água mole o que favoreceria a ligação do cobre na superfície da membrana branquial facilitando a tomada do metal pelo animal. Em contraste, alguns autores associaram o aumento da toxicidade do cobre ao pH baixo (WAIWOOD & BEAMISH, 1978).

A ação tóxica dos metais pode ser um efeito combinado do estresse osmorregulatório, o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) inibe a entrada de sódio e estimula a saída deste íon porque compete diretamente com o íon  $\text{H}^+$  (CHACOUMAKOS *et al.*, 1979; CUSIMANO *et al.*, 1986; LAURÉN & McDONALD, 1985) e de produção de muco pelas brânquias (TAO *et al.*, 1999; 2000; 2001). Segundo SORENSEN (1991) o cobre é especialmente tóxico em pH 9,0 e a excreção de  $\text{CO}_2$  pelas brânquias, diminui o pH em áreas próximas, ioniza hidroxilas e libera  $\text{Cu}^{2+}$  que podem ser levados para o epitélio das brânquias podendo alcançar os tecidos.

O comportamento e algumas respostas de *P. scrofa*, submetidos ao cobre em pH alto a 20 e 30 °C, tais como letargia, perda de equilíbrio e aumento na produção de muco foram semelhantes aos observados por MAZON & FERNANDES (1999) e TAKASUSUKI (2000) e evidencia uma maior sensibilidade destes animais nestas condições. Como discutido por TAO *et al.* (2001), os dois fatores mais importantes que afetam a especiação e, portanto a biodisponibilidade do cobre nas brânquias são a mudança de pH e a secreção de muco. Esses autores verificaram em *Cyprinus carpio* a produção de muco pelas brânquias na presença de cobre ( $0,5 - 20,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em pHs 5,5 a 10,5 a 23 °C. Estes autores observaram que em pHs 6 e 9 a espécie de cobre que predominou na água foi a forma livre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e a forma complexada ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ), respectivamente. Nas brânquias, a forma predominante, em pH ácido, foi o complexo cobre-muco e íons cobre livres. Segundo estes autores a produção de muco e variação de pH influenciou a biodisponibilidade do cobre nas brânquias os quais foram

significativamente menores do que na água, especialmente sob condições ácidas sendo que a produção de muco pelas brânquias teve uma ação protetora em carpas submetidas ao cobre. A produção de muco em excesso, pode ter efeito protetor moderando a ação do cobre nos tecidos, entretanto, pode também influenciar na difusão resultando na diminuição da troca gasosa pelas brânquias nos animais ou ainda funcionar como estoque de metal devido as características aniônicas na superfície branquial.

A mudança na temperatura, nos ambientes aquáticos, pode alterar o efeito do metal. LEMUS & CHUNG (1999) em *Petenia kraussii*, determinaram a CL<sub>50</sub>-96h para o cobre de 4850 e de 2840 µg.L<sup>-1</sup> a 22 e 30 °C, respectivamente. A temperatura alta foi mais tóxica para estes animais. RAO & KHAN (2000), verificaram a interação de 3 temperaturas (15, 20 e 25 °C) na toxicidade do cobre em molusco, *Dreissena polymorpha*, e constataram que, quando a temperatura foi aumentada a taxa respiratória destes animais aumentou, potencializando a toxicidade do cobre. A 20 °C a CL<sub>50</sub> em 48 horas de exposição ao cobre foi de 775 µg.L<sup>-1</sup> e a 25 °C foi de 238 µg.L<sup>-1</sup>. Estes autores demonstraram que altas temperaturas podem aumentar a toxicidade do cobre e possivelmente de outros metais. Altas temperaturas aumentam a necessidade de energia no animal, afetando o desempenho de muitas espécies em processos de desintoxicação. O aumento da temperatura, por sua vez, acelera o metabolismo e acentua o efeito do cobre nos organismos. Em relação aos nossos resultados a combinação do pH com a temperatura, não apresentou diferença na toxicidade do cobre para *P. scrofa*.

De acordo com os valores da CL<sub>50</sub> para o cobre determinados para *P. scrofa* o cobre é mais tóxico para esta espécie em pH alto (8,0) e as características físico-química da água alteram a toxicidade do metal influenciando a sua biodisponibilidade e especiação.

### Referências Bibliográficas

- CETESB (1994-2000). Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo.
- CHACOUMAKOS, C.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Toxicity of copper to cutthroat trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, pH and hardness. **Amer. Chem. Soc.**, v.13 (2), p. 213-219, 1979
- CRIST, R.H.; MARTIN, J.R.; GUPTILL, P.W.; ESLINGER, J.M.; CRIST, D.R. Interaction of metals and protons with algae. 2. ion exchange in adsorption and metal displacement by protons. **Environ. Sci. Tech.**, v. 24, p. 337-342, 1990.
- CUSIMANO, R.F.; BRAKKE, D.F.; CHAPMAN, G. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 43, p. 1497-1503, 1986.

- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.** 11 (7), 714-719. Correction **12 (4)**, 417, 1978.
- HOWARTH, R.S.; SPRAGUE, J.B. Copper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. **Water Res.**, 12, 445-462. 1978.
- KARAN, V.; VITOROVIC, V.; TUTUNDZIC, V.; POLEKSIC, V. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 40, p. 49-55, 1998.
- LAURÉN, D.J.; McDONALD, D.G. Influence of water hardness, pH and alkalinity on the mechanism of copper toxicity in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 43, p. 1488-1486, 1985.
- LEMUS, M.J.; CHUNG, K.S. Effect of temperature on copper toxicity, accumulation and purification in tropical fish juveniles *Petenia kraussii* (Pisces: Cichlidae). Caribbean Journal of Science, v.35, n.1-2, p. 64-69, 1999.
- MAZON, A.F.; FERNANDES, M.N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 63, p. 797-804, 1999.
- PICKERING, Q.H.; HENDERSON, P. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warm water fishes. **Air water Pollut Int J.**, v. 10, p. 453-463, 1996.
- RAO, E.G.V.P.; KHAN, M.A.Q. *Zebra mussels*: Enhancement of copper toxicity by high temperature and its relationship with respiration and metabolism. **Water Environ. Res.**, v. 72, n. 2, p. 175-178, 2000.
- SORENSEN, E.M. Metal poisoning in fish. CRC Press, Boca Raton. 374 p, 1991.
- TAO, S.; LIANGT, T.; CAO, J.; DAWSON, R.; LIU, C. F. Synergistic effect of copper and lead uptake by fish. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 44, p. 190-195, 1999.
- TAO, S.; LONG, A.; LIU, C.; DAWSON, R. The influence of mucus on copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 47, p. 59-64, 2000.
- TAO, S.; WEN, Y. ; LONG, A.; DAWSON, R.; CAO, J.; XU, F. Simulation of acid-base condition and copper especiation in the fish microenvironment. **Comp. Chem.**, v. 25, p. 215-222, 2001.
- TAKASUSUKI, J. (2000). Toxicidade dos íons cobre em curimatá, *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881), em pH 8,0 e pH 4,5, São Carlos - UFSCar, 102 p. Tese (Doutorado).
- WAIWOOD, K.G.; BEAMISH, F.W.H. Effects of copper, pH and hardness on the critical swimming performance of rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). **Water Res.**, v. 12, p. 611-619, 1978.

## CAPÍTULO 3

### ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM CURIMBATÁ, *PROCHILODUS SCROFA* APÓS EXPOSIÇÃO AO COBRE: INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA

#### Resumo

A alteração na hematologia auxilia nos estudos das respostas fisiológicas dos peixes, diante de um fator ambiental e pode ser indicador de estresse ou da exposição aos poluentes. Dentre os poluentes do meio aquático, o presente estudo avaliou o efeito do cobre, em curimbatá. *Prochilodus scrofa*, jovens, foram expostos a CL<sub>50</sub>-96 h para o cobre (pH 4,5 =  $98 \pm 0,9 \mu\text{gCu.L}^{-1}$  e em pH 8,0 =  $16 \pm 0,2 \mu\text{gCu.L}^{-1}$  a 20 °C e pH 4,5 =  $88 \pm 0,8 \mu\text{gCu.L}^{-1}$  e em pH 8,0 =  $14 \pm 0,5 \mu\text{gCu.L}^{-1}$  a 30 °C) e as alterações hematológicas foram então avaliadas. Houve interação da temperatura, variação do pH e presença de cobre nos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos. A mudança do pH aumentou o hematócrito (Hct) e diminuiu a concentração de hemoglobina [Hb] e número de eritrócitos (RBC) nos grupos controle enquanto que na presença de cobre não houve mudança nos valores do Hct. A [Hb] e o RBC tiveram respostas diferentes com a mudança do pH, temperatura e presença de cobre. O volume corpuscular médio (VCM) dos grupos controle em 20 e 30 °C aumentou e a hemoglobina corpuscular média (HCM) diminuiu e após a exposição ao cobre o VCM diminuiu a 20 °C e aumentou a 30 °C. As mudanças verificadas podem ser consideradas como mudanças primárias as quais podem levar a respostas fisiológicas secundárias afetando vários órgãos. As alterações observadas no presente trabalho representam respostas iniciais ao cobre na tentativa do animal em manter a homeostase.

#### Introdução

As variáveis hematológicas têm sido utilizadas como diagnose clínica para determinar o efeito de poluentes em peixes e também como indicadores de estresse (TORT *et al.*, 1987; CYRIAC *et al.*, 1989; NUSSEY *et al.*, 1995). Estes estudos auxiliam na compreensão das respostas fisiológicas dos organismos aquáticos diante de mudanças externas no ambiente provocadas pelos metais. O estresse ambiental causa uma variedade de mudanças detectáveis e reconhecíveis no sangue e tecidos de peixes e, por esta razão, o sangue destes animais tem sido utilizado para o monitoramento da qualidade ambiental e como um indicador de mudanças fisiológicas ou patológicas nestes organismos. Com o desenvolvimento industrial e a utilização de sulfato de cobre na piscicultura o aumento nos níveis de cobre no ambiente pode causar alterações no metabolismo dos organismos aquáticos. A concentração de cobre nas águas brasileiras é, geralmente, inferior a  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ , entretanto, devido ao desenvolvimento industrial a

quantidade de cobre, na água, tem aumentado consideravelmente (CETESB, 1994-2000).

As características químicas e físicas da água influenciam na toxicidade do cobre (LAURÉN & McDONALD, 1986; MAZON & FERNANDES, 1999; TAO *et al.*, 1999). O pH e a temperatura têm importância fundamental na  $CL_{50}$  para o cobre. A mudança do pH da água potencializa a ação do cobre e em água com pH alto (8,0) a toxicidade do metal em *P. scrofa* é maior (Capítulo 2). A avaliação de mudanças fisiológicas e bioquímicas no sangue de peixes expostos a estressores ambientais é um método sensível que auxilia na interpretação dos efeitos dos metais na sobrevivência, reprodução e crescimento destes organismos (McKIM *et al.*, 1970; GABRYELAK *et al.*, 2000; DETHLOFF *et al.*, 2001).

O objetivo do presente trabalho foi determinar o efeito do cobre nas variáveis hematológicas como concentração de hemoglobina ([Hb]), número de eritrócitos (RBC), hematócrito (Hct) e índices hematimétricos como volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em pH 7,0, 4,5 e 8,0 a 20 e 30 °C.

## Material e Métodos

### *Animais*

Exemplares de *P. scrofa*, curimatá (W= 15-25 g; L= 10-15 cm) foram obtidos da estação de Hidrobiologia e Aquacultura de Furnas-MG, Brasil e mantidos em tanques de 1.000 L a  $25 \pm 1$  °C com fluxo contínuo de água (pH =  $7,3 \pm 0,2$ ; condutividade =  $8,3 \pm 0,3$   $\mu$ S e dureza =  $24,5 \pm 0,2$  mg L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>) e aeração constante (100 % de saturação de O<sub>2</sub>) durante 30 dias. Após aclimação ao laboratório dois tanques com 500 animais cada foram utilizados para aclimação a 20 °C e a 30 °C. A temperatura da água foi diminuída ou aumentada em 1 °C a cada dois dias até chegar a 20 °C ou 30 °C com auxílio de um resfriador de líquidos (RT 20.00) ligado a um controlador de temperatura (termostato FULL GAUGE) ou um aquecedor (2000 W) conectado a um termostato. Os peixes foram mantidos nas temperaturas de aclimação por 30 dias até o início dos experimentos. As características físicas e químicas da água foram as mesmas descrita acima exceto para a temperatura. O fotoperíodo do laboratório foi de 12 horas. O pH e dureza da água foram semelhantes aos descritos para o habitat natural de *P.*

*scrofa*, e a temperatura representa a média mínima e máxima dos valores durante o inverno e verão (CETESB 1994-2000).

#### *Procedimento Experimental*

Oito exemplares de *P. scrofa* foram distribuídos aleatoriamente em aquários de 200 L de forma a não ultrapassar o máximo de 1 g de peixe L<sup>-1</sup>. As condições físico-químicas da água foram mantidas constantes durante os experimentos ajustando-se os pHs em 4,5 ou 8,0. Foram utilizados aquários nas mesmas condições descritas anteriormente com exceção do pH que foi mantido em 7,0 a 20 e a 30 °C. Os animais deste grupo serviram como controle dos grupos controle em água com pH 4,5 e água com pH 8,0. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início dos testes e durante os mesmos. A diminuição do pH foi obtida com a adição de 1,0 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado e o aumento com adição de, aproximadamente 1,0 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2,0 M. Após a mudança do pH, as temperaturas foram estabilizadas em 20 e 30 °C e o cobre (agente químico – íon Cu) foi adicionado a água na forma de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) antes da transferência dos animais para os aquários. *P. scrofa* foram submetidos ao cobre em concentrações de CL<sub>50</sub>-96 h determinadas previamente para o cobre a 20 °C em pH 4,5 = 98 ± 0,9 µg.L<sup>-1</sup> e em pH 8,0 = 16 ± 0,2 µg.L<sup>-1</sup> e a 30 °C em pH 4,5 = 88 ± 0,8 µg.L<sup>-1</sup> e em pH 8,0 = 14 ± 0,5 µg.L<sup>-1</sup> (Capítulo 1).

#### *Coleta de sangue*

O sangue venoso, dos animais dos grupos controle e dos grupos expostos ao cobre (96 h), foi coletado por punção do vaso caudal em seringas de insulina (1,0 mL) heparinizadas. O hematócrito (Hct), número de eritrócitos (RBC) e a concentração de hemoglobina ([Hb]) foram conduzidos imediatamente.

A determinação do hematócrito (Hct = %) foi realizada em réplicas utilizando-se o método de microhematócrito, a concentração de hemoglobina (Hb = g100mL<sup>-1</sup>) foi determinada segundo o método de formação de cianometahemoglobina e a contagem do número de eritrócitos (RBC) foi feita em câmara de Neubauer após a diluição do sangue em formol citrato 4%.

Os índices hematimétricos foram obtidos a partir dos valores determinados para hematócrito, concentração de hemoglobina e número de eritrócitos. Os valores obtidos foram aplicados nas seguintes fórmulas:

$$\text{VCM (Volume Corpuscular Médio)} = \text{Hct} \cdot 10 / \text{Er}$$

$$\text{HCM (Hemoglobina Corpuscular Média)} = \text{Hb} \cdot 10 / \text{Er}$$

$$\text{CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média)} = \text{Hb} \cdot 100 / \text{Hct}$$

#### *Análise Estatística*

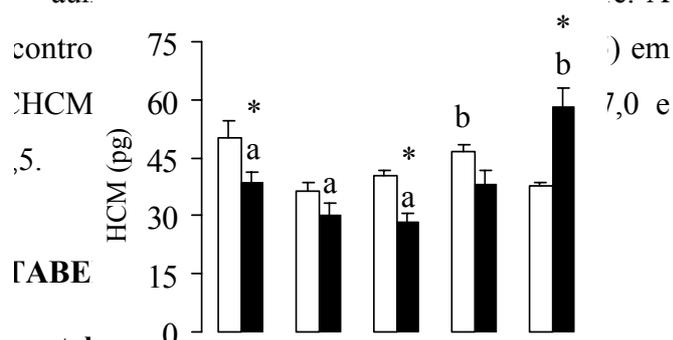
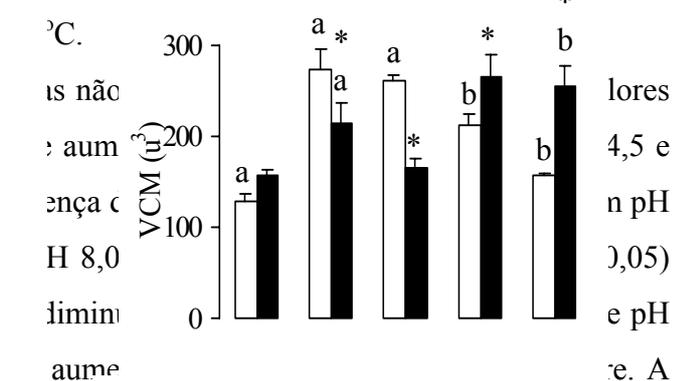
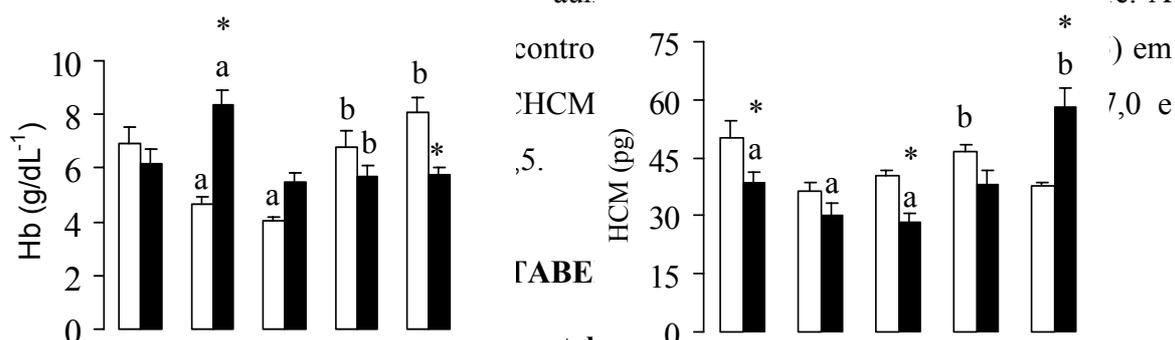
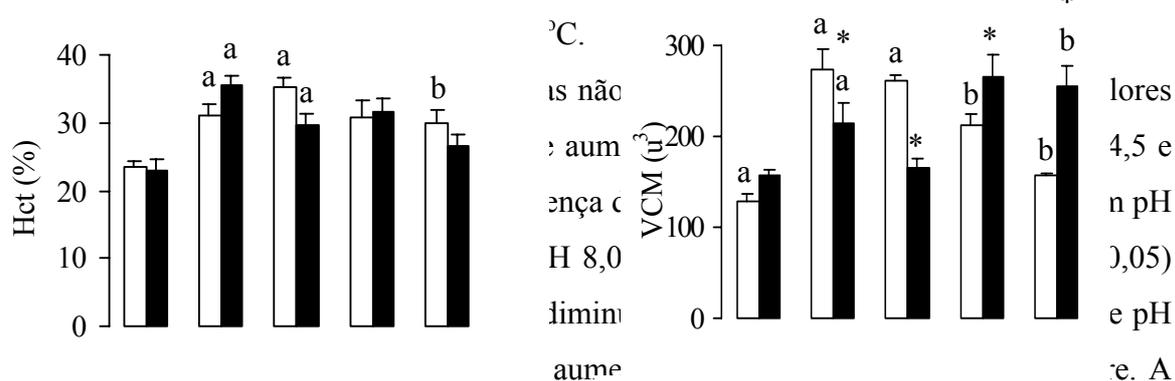
A análise estatística foi efetuada utilizando o programa “Sigma Stat”, comparando-se os resultados obtidos nos grupos controle com os resultados dos grupos expostos ao cobre a 20 e 30 °C e pH 4,5 e pH 8,0. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  SEM. Neste estudo foi feita a análise de variância com três fatores "Three-way" (ANOVA) para estabelecer se as médias dos tratamentos foram ou não estatisticamente iguais. O teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% foi utilizado para determinar quais as médias que eram estatisticamente diferentes sempre que as diferenças foram detectadas na análise da variância.

### **Resultados**

Nenhum peixe dos grupos controle morreu durante os experimentos. A Tabela I e a Fig. 1 mostram os valores médios  $\pm$  S.E.M. de Hct, RBC, [Hb] e índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) dos animais dos grupos controle (pH 7,0, 4,5 e 8,0) e grupos experimentais após exposição ao cobre (96 h) em pH 4,5 e 8,0 a 20 e 30 °C.

Em relação ao controle pH 7,0, nos grupos controle (pH 4,5 e 8,0) o Hct aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) a 20 e 30 °C, a [Hb] e o RBC diminuíram ( $P < 0,05$ ) a 20 °C e aumentaram ( $P < 0,05$ ) a 30 °C nos controles. O VCM aumentou ( $P < 0,05$ ) enquanto que a HCM diminuiu ( $P < 0,05$ ) a 20 e a 30 °C. A CHCM diminuiu ( $P < 0,05$ ) a 20 e a 30 °C em pH 8,0. Na presença do cobre o Hct não apresentou diferença significativa em relação aos controles pH 4,5 e pH 8,0. A [Hb] diminuiu ( $P < 0,05$ ) em pH 4,5 a 30 °C e aumentou ( $P < 0,05$ ) em pH 8,0 a 20 °C. O RBC aumentou ( $P < 0,05$ ) em pH 4,5 e pH 8,0 a 20 °C e diminuiu ( $P < 0,05$ ) em pH 4,5 e 8,0 a 30 °C. Com relação aos índices hematimétricos o VCM diminuiu ( $p < 0,05$ ) em pH 4,5 e pH 8,0 a 20 °C e aumentou

( $p < 0,05$ ) em pH 8,0 a 30 °C. A CHCM teve aumento ( $p < 0,05$ ) em pH 4,5 e pH 8,0 a 20

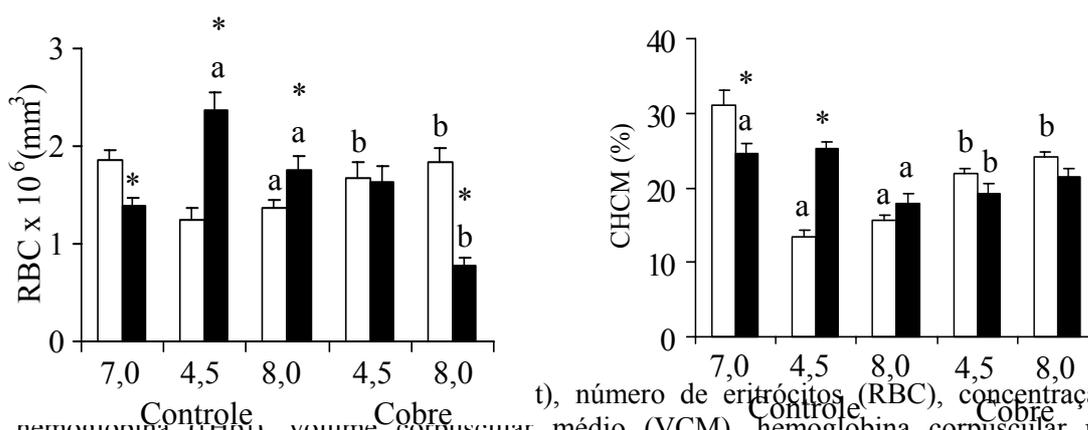


Val em

Controle em pH 4,5 e pH 8,0 (n = 8 em cada grupo) a 20 e 30 °C.

<sup>a</sup> $P < 0,05$  em relação ao controle - pH 7,0; <sup>b</sup> $P < 0,05$  em relação ao controle - pH 4,5; <sup>c</sup> $P < 0,05$  em relação ao controle - pH 8,0; <sup>d</sup> $P < 0,05$  em relação ao Cu<sup>2+</sup> - pH 4,5; <sup>e</sup> $P < 0,05$  em relação ao Cu<sup>2+</sup> - pH 8,0.

Parâmetros	Controle			Exposição ao cobre (CL <sub>50</sub> -96 h)		
	20 °C	pH 7,0	pH 4,5	pH 8,0	pH 4,5	pH 8,0
Hematócrito (%)	23,50 ± 0,72	31,03 ± 1,72	35,26 ± 1,30 <sup>a</sup>	30,83 ± 2,56	29,98 ± 1,87	
Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	1,86 ± 0,09	1,25 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,17	1,83 ± 0,15 <sup>b</sup>	
Hemoglobina (g/dL)	6,93 ± 0,59	4,63 ± 0,33 <sup>a</sup>	4,02 ± 0,13 <sup>a</sup>	6,79 ± 0,61	8,06 ± 0,55 <sup>b,d</sup>	
VCM (μm <sup>3</sup> )	128,90 ± 8,31	274,17 ± 21,56 <sup>a</sup>	260,57 ± 12,95 <sup>a,b</sup>	212,16 ± 12,95 <sup>a,b,c</sup>	156,20 ± 3,12 <sup>b,c</sup>	
HCM (pg)	50,07 ± 4,48	36,34 ± 2,26	40,58 ± 1,30	46,44 ± 1,89	37,83 ± 0,92	
CHCM (%)	30,95 ± 2,05	13,46 ± 0,74 <sup>a</sup>	15,64 ± 0,75 <sup>a,c</sup>	21,83 ± 0,72 <sup>a,b</sup>	24,21 ± 0,48 <sup>a,b,d</sup>	
30 °C						
Hematócrito (%)	23,00 ± 1,51	35,47 ± 1,37 <sup>a</sup>	29,63 ± 1,58 <sup>a,b</sup>	31,72 ± 1,77 <sup>a</sup>	26,57 ± 1,77 <sup>b</sup>	
Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	1,38 ± 0,09	2,37 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,75 ± 0,14 <sup>b</sup>	1,64 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,07 <sup>a,b,c,d</sup>	
Hemoglobina (g/dL)	6,14 ± 0,55	8,39 ± 0,49 <sup>a</sup>	5,48 ± 0,345 <sup>b</sup>	5,67 ± 0,42 <sup>b</sup>	5,78 ± 0,28 <sup>b</sup>	
VCM (μm <sup>3</sup> )	157,01 ± 6,74	214,06 ± 23,64	165,15 ± 11,16	264,80 ± 24,46 <sup>a,c</sup>	254,26 ± 23,55 <sup>a,c</sup>	
HCM (pg)	38,61 ± 2,59	30,27 ± 2,89	28,34 ± 2,16	38,03 ± 3,53	58,26 ± 4,97 <sup>a,b,c,d</sup>	
CHCM (%)	24,51 ± 1,47	25,36 ± 0,67	17,93 ± 1,19 <sup>a,b</sup>	19,18 ± 1,31 <sup>a,b</sup>	21,44 ± 1,23	



t), número de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina ([Hb]), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de *P. scrofa* após exposição ao cobre (CL<sub>50</sub>-96h). As barras representam a média dos valores ( $\pm$  SEM); Grupos experimentais a 20 °C (colunas claras); Grupos experimentais a 30 °C (colunas escuras). (n = 8 em cada grupo). <sup>a</sup> $P < 0,05$  em relação aos controles a 20 e a 30 °C; <sup>b</sup> $P < 0,05$  em relação ao Cu<sup>2+</sup> a 20 e a 30 °C; \* $P < 0,05$  em relação a 20 e a 30°C.

## Discussão

A qualidade da água é um dos fatores responsáveis por variações na hematologia. As alterações hematológicas observadas em peixes auxiliam na compreensão dos efeitos de exposições crônicas e sobrevivência, reprodução e crescimento nestes animais ocasionados após exposição aos metais.

As características química e física da água, como o pH, alteram a toxicidade do cobre (CL<sub>50</sub>) (Capítulo 2). O aumento no Hct nos grupos controle a 20 °C provavelmente pode ser devido ao aumento no VCM enquanto que a 30 °C deveu-se também ao aumento no RBC. Os eritrócitos, devido ao desequilíbrio osmótico, aumentam de volume com entrada de água, sendo estas respostas comuns ao estresse ambiental provocados pela mudança de pH. Sabe-se que a exposição dos peixes à águas ácidas provoca diminuição dos níveis de NaCl no sangue e, eventualmente, o animal pode desenvolver uma acidose, ocorre também diminuição na excreção de amônia e aumento temporário na concentração de amônia no sangue (LAURÉN & McDONALD, 1985; CUSIMANO *et al.*, 1986; McDONALD *et al.*, 1989; MATEY & KOMOV, 1992; BEAUMONT *et al.*, 2000). Existem poucos estudos em águas alcalinas mas os animais podem desenvolver alcalose no sangue com redução na tomada de sódio e excreção de amônia. Com o aumento da temperatura a necessidade de energia aumenta levando a um aumento na capacidade de captação do oxigênio do ambiente o que pode ter concorrido para a liberação do eritrócito na corrente sanguínea pelos órgãos hematopoiéticos e conseqüente aumento do RBC a 30 °C. A diminuição do HCM e CHCM (pH 8,0) a 20 °C e a 30 °C dos grupos controle podem indicar que o animal teve dificuldades em captar o oxigênio pelas brânquias. Nos casos em que houve redução do HCM e CHCM mas aumento do RBC, essa diminuição provavelmente deve-se ao aumento de eritrócitos imaturos com baixa quantidade de hemoglobina.

O efeito combinado do pH da água com a exposição ao cobre mostrou que o cobre induziu aumento no RBC e [Hb] em pH 4,5 e pH 8,0 a 20 °C o que pode indicar uma tentativa do animal para elevar a capacidade do sangue em captar o oxigênio garantindo o fornecimento de quantidades adequadas de oxigênio aos tecidos. As variações dos valores encontrados nos índices hematimétricos em relação aos seus respectivos controles, como diminuição no VCM em pH 4,5 e pH 8,0 e aumento no HCM (pH 4,5) e CHCM sugerem aumento na demanda de oxigênio resultante de desequilíbrios iônicos

no epitélio branquial provocados pelo cobre e pH. O aumento no HCM e no CHCM dos animais expostos ao cobre sugerem liberação de eritrócitos maduros dos órgãos de estocagem como o baço. Segundo CYRIAC *et al.* (1989) e NUSSEY *et al.* (1995) os metais estimulam a eritropoiese em peixes.

*P. scrofa* experimentou condições de anemia, após exposição ao cobre a 30 °C, com diminuição no RBC (pH 4,5 e pH 8,0) acompanhada de diminuição na [Hb] (pH 4,5). Isto pode ser devido a uma hemodiluição sendo um mecanismo no qual o animal reduz a concentração de uma substância tóxica na circulação do sangue. A hemodiluição foi também observada por CYRIAC *et al.* (1989) em *Oreochromis mossambicus* (28 °C; pH 6,8) expostos ao cobre e ao mercúrio. A hemodiluição é a causa provável da diminuição da [Hb] em peixes expostos ao cobre levando a um quadro de anemia além de interferir na habilidade do peixe em transportar oxigênio aos tecidos e segundo NUSSEY *et al.* (1995) pode resultar também na diminuição da atividade física. Nossos resultados, como diminuição na [Hb] e RBC, podem ser comprovados nos índices hematimétricos com aumento do VCM (pH 4,5 e pH 8,0) e diminuição na CHCM (pH 4,5) e corroboram com o encontrado por TORT, *et al.* (1987) em *Scyliorhinus canicula*, tubarão, submetidos ao cobre (2 a 16 mg.L<sup>-1</sup>) tendo diminuição no Hct, RBC e [Hb]. Entretanto, *Oncorhynchus mykiss* expostas a 0,6 mg.L<sup>-1</sup> de cobre (15 °C; pH 8,3) tiveram aumento no RBC e nenhum efeito no Hct e na [Hb] que foram atribuídos ao aumento no volume das células com relação ao conteúdo de água (WANG *et al.*, 1998). A mesma espécie exposta a 3,82 e 10,06 µg.L<sup>-1</sup> de cobre (17-19 °C; pH 7,0-8,0) apresentou os valores do Hct diminuídos, enquanto que a exposição prolongada ao cobre diminuiu o volume dos eritrócitos reduzindo a capacidade de captação do oxigênio (DETHLOFF *et al.*, 2001). *O. mossambicus* expostos ao cobre (0,40 mg.L<sup>-1</sup>; a 29 °C; pH 7,3) mantiveram os valores do Hct e [Hb] constantes mas o RBC diminuiu sendo atribuída a destruição ou inibição na síntese de eritrócitos (NUSSEY *et al.*, 1995). MAZON & FERNANDES (1999) verificaram que *P. scrofa*, expostos ao cobre (29 µg.L<sup>-1</sup>; pH 7,3 a 25 °C) aumentou RBC e [Hb] e não houve alteração no VCM, HCM e CHCM enquanto que CERQUEIRA & FERNANDES (2002) com a mesma espécie e tratamento verificaram aumento no Hct, RBC e na [Hb] e aumento no VCM e CHCM durante o período de recuperação e os autores sugeriram uma tentativa do peixe de elevar a capacidade do sangue em captar e transportar oxigênio de forma a garantir o fornecimento de quantidades adequadas de oxigênio aos tecidos. *Salmo trutta*

mantiveram o Hct e [Hb] normais quando expostos ao cobre ( $0,08 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ ,  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) em pH 5,0 (BEAUMONT *et al.*, 2000). TAKASUSUKI (2000) estudando o efeito do cobre ( $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 4,5, em *P. scrofa*, verificou que estes animais apresentaram aumento no RBC e diminuição no HCM. Nossos resultados em relação aos índices hematimétricos como aumento no VCM e HCM em pH 4,5 e pH 8,0 a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  mostra que estas variações estão associadas a uma resposta ao estresse ambiental, como já discutido anteriormente.

No presente trabalho, apesar do *P. scrofa* ser mais sensível ao cobre em pH 8,0 ( $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ ) e, portanto, mais tolerante ao cobre em pH 4,5, o cobre parece ter efeito maior nos parâmetros hematológicos neste pH. O efeito negativo da variação do pH no ambiente aquático foi potencializado na presença dos metais. Estes efeitos combinados podem resultar na inibição de transporte ativo de íons, desequilíbrio no balanço ácido-básico e hipóxia interna nos peixes, provocados por danos estruturais nas brânquias.

Efeitos do cobre associado ao mercúrio em organismos aquáticos apresentaram respostas semelhantes aos encontrados em animais expostos ao cobre. Em *O. mossambicus* (pH 6,8;  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) os valores da [Hb] dos animais expostos ao cobre foram menores em 24 h de exposição e em 72 h a [Hb] aumentou. A [Hb] aumentou nos animais expostos ao cobre e mercúrio em 120 e 168 h de exposição; em 72, 120 e 168 h de exposição ao cobre e ao mercúrio ( $150 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) os animais apresentaram aumento no Hct, estas respostas foram atribuídas ao estresse causado pelos metais durante as primeiras horas de exposição resultando em hemoconcentração (CYRIAC *et al.*, 1989).

A mudança da temperatura no ambiente aquático tem efeito no metabolismo dos animais e pode influenciar nas respostas hematológicas em peixes. A temperatura baixa ( $12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) associada ao cobre aumentou o Hct, RBC e [Hb] em *Salvelinus fontinalis* (McKIM *et al.*, 1970) e em *Colisa fasciatus* sendo que nestas espécies este efeito foi observado a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (MISHRA & SRIVASTAVA, 1980) e diminuição do RBC em *Salmo gairdneri* expostos ao cobre a  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (DICK & DIXON, 1985). HEATH (1987) a  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  com cobre e NaCl (250 mM) em *Lepomis macrochirus* verificaram aumento no Hct na presença do cobre e do NaCl enquanto que nos animais expostos somente ao cobre não houve mudança nos valores do Hct. BANERJEE & HOMECHAUDHURI (1990) estudaram o efeito do cobre a  $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$  em *Heteropneustes fossilis* verificaram nas primeiras horas de exposição diminuição nos valores de Hct, RBC e [Hb]; após 6 horas houve aumento no Hct, RBC e [Hb] até 48 horas de exposição e após 60 e até 72 horas

de exposição os valores sangüíneos novamente diminuíram. Estes autores atribuíram o decréscimo inicial nos valores sangüíneos como hemodiluição sendo reflexo de problemas ocasionados por alterações no fluxo de sódio pelas brânquias. Entretanto, o aumento no Hct, RBC e [Hb] foi atribuído a hemoconcentração. NUSSEY *et al.* (1995) verificaram o efeito do cobre (160 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ -96h e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ - 4 semanas) em tilápia (*O. mossambicus*) a 19 e 29 °C. Não houve diferença nas variáveis sangüíneas entre as duas temperaturas estudadas e, após exposição ao cobre, observaram eritrocitopenia. O cobre induziu aumento do RBC, [Hb] e Hct devido ao aumento na demanda por oxigênio causado pela destruição no epitélio branquial, o qual levou a um desequilíbrio na troca gasosa.

Nossos resultados mostraram que a temperatura influenciou na hematologia de *P. scrofa*. O aumento da temperatura aumenta a necessidade de energia do animal, a [Hb] e do RBC nos grupos controle aumentaram indicando que o animal está captando maior quantidade de oxigênio devido a demanda de energia causada pelo aumento da temperatura, o VCM e HCM diminuíram a 30 °C, entretanto, a 30 °C os valores da [Hb] e do RBC foram menores do que a 20 °C enquanto que o VCM e HCM (pH 8,0) aumentaram a 30 °C na presença de cobre. Apesar do aumento da temperatura, o cobre teve efeito negativo dificultando a tomada de oxigênio nesta espécie.

As alterações descritas em peixes após exposição aos metais mostram respostas diferentes, dependendo das condições físicas e químicas da água, da biologia da espécie e concentração de cobre utilizada, e, é importante salientar que algumas das respostas compensatórias devem ser atribuídas às características individuais e à espécie.

O aumento da temperatura agrava problemas no transporte de oxigênio, em peixes, reduzindo a solubilidade do oxigênio na água e diminuindo a afinidade do oxigênio com a hemoglobina, tornando o transporte deste gás para o sangue difícil. Este decréscimo na afinidade ocorre ao mesmo tempo em que os tecidos aumentam a necessidade de oxigênio, também como resultado do aumento da temperatura.

A análise dos nossos resultados mostra que mudanças fisiológicas estão ocorrendo na presença do cobre, pH baixo e alto a 20 e 30 °C e que os parâmetros hematológicos podem indicar a extensão da ação tóxica do metal servindo como um indicador de poluição aquática.

### Referências Bibliográficas

- BANERJEE, S.; HOMECHAUDHURI, S. Hematological monitoring of a bio-indicator fish, *Heteropneustes fossilis*, on a exposure to copper toxicity. *Israel. J. Aquaculture, Bamidgeh*, v. 42, n. 2, p. 46-51. 1990.
- BEAUMONT, M.W.; BUTLER, P.J.; TAYLOR, E.W. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon muscle metabolism and membrane potential. *Aquatic Toxicol.*, v. 51, p. 259-272. 2000.
- CUSIMANO, R.F.; BRAKKE, D.F.; CHAPMAN, G. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 43, p. 1497-1503, 1986.
- CETESB (1994-2000). Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo. CETESB, São Paulo.
- CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v. 52, p. 83-91, 2002.
- CYRIAC, P.J.; ANTONY, A.; NAMBISAN, N.K. (1989). Haemoglobin and hematocrit values in the fish *Oreochromis mossambicus* (Peters) after short term exposure to copper and mercury. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 43, p. 315-320, 1989.
- DETHLOFF, G.M.; BAILEY, H.C.; MAIER, K.J. Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical, and immunological parameters of wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 40, p. 371-380. 2001.
- DICK, P.T.; DIXON, D.G. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *Fish. Soc. British Isles.*, v. 4, p. 475-481, 1985.
- GABRYELAK, T.; FILIPIAK, A.; BRICHON, G. Effects of zinc on lipids of erythrocytes from carp (*Cyprinus carpio* L.) acclimated to a different temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.*, (C) v. 127, p. 335-343, 2000.
- HEATH, A.G. Effects of waterborne copper or zinc on the osmoregulatory response of bluegill to a hypertonic NaCl challenge. *Comp. Biochem. Physiol.*, (C), v. 88, n. 2, p. 307-311, 1987.
- LAURÉN, D.J.; McDONALD, D.G. Influence of water hardness, pH and alkalinity on the mechanism of copper toxicity in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 43, p. 1488-1486. 1985.
- MATEY, V.E.; KOMOV, V.T. The effect of aluminum and low pH of water on gill ultrastructure and electrolyte content in blood plasma of juvenile *Salmo salar*. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, v. 28, n.5, p. 453-460. 1992.
- MAZON, A.F.; FERNANDES, M.N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 63, p. 797-804, 1999.
- McDONALD, D.G.; TANG, Y.; BOUTILIER, R.G. Acid and ion transfer across the gills of fish: mechanisms and regulation. *Can. J. Zool.*, v. 67, p. 3046-3054, 1989.
- McKIM, J.M.; CHRISTENSEN, G.M.; HUNT, E.P. Changes in the blood of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) after short-term and long-term exposure to copper. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, v. 27, p. 1883-1889, 1970.
- MISHRA, S.; SRIVASTAVA, A.K. The acute toxic effects os copper on the blood of a teleost. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 4, p. 191-194, 1980.
- NUSSEY, G.; VAN VUREN, J.H.J.; du PREEZ, H.H. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (CICHLIDAE). *Comp. Biochem. Physiol.*, (C), v.111, n. 3, p. 369-380, 1995.

TAO, S.; LIANGT, T.; CAO, J.; DAWSON, R.; LIU, C. F. Synergistic effect of copper and lead uptake by fish. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 44, p. 190-195, 1999.

TAKASUSUKI, J. Toxicidade dos íons cobre em curimatá, *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881), em pH 8,0 e pH 4,5, São Carlos - UFSCar, 102 p. Tese (Doutorado). 2000.

TORT, L.; TORRES, P.; FLOS, R. Effects on dogfish haematology and liver composition after acute copper exposure. **Comp. Biochem. Physiol., (C)**, v. 87, n. 2, p. 349-353. 1987.

WANG, T.; KNUDSEN, P.K.; BRAUNER, C.J.; BUSK, M.; VIJAYAN, M.M.; JENSEN, F.B. Copper exposure impairs intra and extracellular acid-base regulation during hypercapnia in the fresh water rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Comp. Physiol.**, v. 168, p. 591-599, 1998.

## CAPÍTULO 4

### RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE *PROCHILODUS SCROFA* APÓS EXPOSIÇÃO AO COBRE: INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA

#### RESUMO

As alterações nas atividades de algumas enzimas da via glicolítica podem servir como indicadores do comprometimento da produção de energia animal por metais pesados e são avaliações importantes na toxicologia de mamíferos mas pouco tem sido feito com respeito aos peixes. As respostas bioquímicas em sangue e fígado de *Prochilodus scrofa* foram analisadas após exposição ao cobre *in vivo* e *in vitro* em água com pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C. As CL<sub>50</sub>-96 h para o cobre foram em água com pH 4,5 ( $98 \pm 0,9 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) e água com pH 8,0 ( $16 \pm 0,2 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) a 20 °C e água com pH 4,5 ( $88 \pm 0,8 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) e água com pH 8,0 ( $14 \pm 0,5 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) a 30 °C. *P. scrofa* jovens foram expostos ao cobre (CL<sub>50</sub>-96h) em pH 4,5 e 8,0 a 20 e 30 °C nos testes *in vivo* e nos testes *in vitro* o cobre foi adicionado diretamente no homogenado de fígado e na solução de eritrócitos. A concentração de glicose plasmática e de glicogênio hepático foram determinados nos estudos *in vivo* e a atividade de enzimas regulatórias da via glicolítica (HK, PFK e PK) e enzimas associadas (LDH e G6PDH) da suspensão eritrocitária e do fígado de curimatá foram determinadas em ambos estudos *in vivo* e *in vitro*. Nos estudos *in vivo*, a concentração de glicose plasmática diminuiu em pH 4,5 e 8,0 nos grupos controle e não foi observado influência da temperatura enquanto que na presença do cobre em pH 4,5 a 30 °C a concentração de glicose aumentou sensivelmente. A concentração de glicogênio foi maior a 20 °C. Houve influência da temperatura e do pH sobre os efeitos do cobre nas enzimas analisadas principalmente na atividade das enzimas regulatórias. A atividade das enzimas HK, PFK e PK, do fígado e eritrócitos diminuiu nos grupos controles e nos grupos expostos ao cobre aumentou, sendo que a atividade da PFK e a PK, do fígado, a diminuição foi mais evidente. A atividade da LDH do fígado e eritrócitos teve aumento nos grupos controle a 20 °C enquanto que a 30 °C diminuiu no fígado e aumentou nos eritrócitos, o mesmo comportamento foi observado na presença do cobre. A atividade da G6PDH, dos grupos controle, apresentou-se estável nas duas temperaturas estudadas enquanto que nos grupos expostos ao cobre, pH 8,0, houve diminuição da atividade no fígado a 30 °C e aumento da atividade no eritrócito. Nos estudos *in vitro* houve influência da temperatura e do pH sobre os efeitos do cobre nas enzimas analisadas principalmente na atividade das enzimas regulatórias. A atividade das enzimas HK, PK, LDH e G6PDH aumentou nos grupos controles e nos grupos expostos ao cobre no fígado e nos eritrócitos a 20 e 30 °C. A 30 °C a atividade da maioria das enzimas estudadas diminuiu nos controles e quando expostos ao cobre a atividade aumentou consideravelmente. Nos eritrócitos o aumento da atividade da HK e PFK foi mais evidente.

#### Introdução

Para manter a homeostase, a maquinaria celular, sob diferentes condições metabólicas, deve regular vias metabólicas individuais. O controle das vias metabólicas é realizado por regulações irreversíveis de enzimas chaves no início e no fim das vias metabólicas de forma que o fluxo metabólico pode ser controlado por poucas enzimas. As alterações na atividade de enzimas, nos organismos aquáticos, podem servir como indicadores da toxicidade de pesticidas, metais e outros poluentes mas pouco tem sido feito em relação aos peixes. Em recentes anos, os problemas de contaminação

ambiental, por uma ampla variedade de poluentes químicos, incluindo os metais, tem recebido maior atenção. Muitos metais apresentam afinidade ao sulfeto ligando-se em pontes de sulfetos nas enzimas e alteram a sua forma e função, outros ligam-se em grupamento carboxílico de proteínas ( $-\text{CO}_2\text{H}$ ) e grupamentos amina ( $-\text{NH}_2$ ). Íons cádmio, cobre, chumbo e mercúrio ligam-se nas membranas celulares alterando o transporte de elétrons (MANAHAM, 1991) e podem ainda se ligar a proteínas, no interior das células, em sítios livres ou ocupados por outros metais resultando na distorção da atividade biológica da proteína devido a competição entre os metais por algum ligante em particular ou por uma via metabólica (SIMKISS & TAYLOR, 1981). O cobre, por exemplo, pode interagir com grupamentos SH e S-S de muitas proteínas alterando a atividade de muitas enzimas (BERLIM, 1979; ANTOGNELLI *et al.*, 2003; RYU *et al.*, 2003). Segundo NICHOLLS *et al.* (1989) alguns efeitos envolvem alterações no sítio ativo, ligações com fosfatos ou resíduos de aminoácidos das enzimas. LAURÉN & McDONALD (1985) relataram inibição da  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase pelo cobre o que compromete a absorção ativa de íons  $\text{Na}^+$  nos animais de água doce.

O cobre é um metal essencial para os animais e plantas, e sendo um co-fator para várias enzimas como citocromo oxidase, superóxido dismutase e álcool desidrogenase. Porém, pode se tornar tóxico se a sua concentração no ambiente exceder os limites fisiológicos. Entre os fatores ambientais que influenciam a toxicidade do cobre em peixes, o pH, a dureza e a temperatura da água têm importância fundamental. A temperatura e o pH são muito importantes do ponto de vista fisiológico e bioquímico. O pH tem grande influência na toxicidade do cobre em *P. scrofa* (Capítulo 2). Segundo HOCHACHKA & SOMERO (1985) e OZERNYUK *et al.* (1994) o  $K_M$  das enzimas aumenta com a elevação da temperatura e tende a ser maior para as enzimas de espécies adaptadas a altas temperaturas (YANCEY & SOMERO, 1978; SOMERO, 1981; OZERNYUK *et al.*, 1994). O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito do cobre na concentração de glicose plasmática e glicogênio hepático e na atividade de enzimas regulatórias (HK, PFK e PK) e enzimas associadas (LDH e G6PDH) da via glicolítica *in vivo* e *in vitro* onde o metal foi adicionado diretamente ao homogeneizado de fígado e da solução de eritrócitos (SE). O estudo *in vivo* visa contribuir na elucidação das conseqüências do efeito tóxico do cobre em ambientes com características alteradas e os experimentos *in vitro* foram efetuados para facilitar a interpretação dos efeitos do cobre sobre as mesmas enzimas.

## Material e Métodos

### *Animais*

Exemplares jovens de *P. scrofa* (W= 15-25 g; L= 10-15 cm) foram obtidos da estação de Hidrobiologia e Aquacultura de Furnas-MG, Brasil e mantidos a em tanques de 1000 L a  $25 \pm 1$  °C com fluxo contínuo de água (pH =  $7,3 \pm 0,2$ ; condutividade =  $8,3 \pm 0,3$   $\mu\text{S}$  e dureza =  $24,5 \pm 0,2$  mg L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>) e aeração constante (100 % de saturação de O<sub>2</sub>) durante 30 dias. Após aclimatação ao laboratório dois tanques com 500 animais cada foram utilizados para a aclimatação a 20 e a 30 °C. A temperatura da água foi diminuída ou aumentada em 1 °C a cada dois dias até chegar a 20 °C ou 30 °C com auxílio de um resfriador de líquidos (RT 20.00) ligado a um controlador de temperatura (termostato FULL GAUGE) ou um aquecedor (2000 W) conectado a um termostato e então os peixes foram mantidos nesta temperatura por 30 dias até o início dos experimentos. As características físicas e químicas da água foram as mesmas descrita acima exceto para a temperatura. O fotoperíodo do laboratório foi de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para esta espécie. O pH, dureza e alcalinidade da água foram similares aos encontrados para *P. scrofa* em seu habitat natural e a temperatura representa a média mínima e máxima dos valores durante o inverno e verão (CETESB 1994-2000).

### *Procedimento Experimental*

#### *Testes in vivo*

Foram utilizados aquários de vidro com capacidade de 200 litros de água e 8 exemplares de *P. scrofa* distribuídos aleatoriamente em cada aquário de forma a não ultrapassar o máximo de 1 g de peixe L<sup>-1</sup>. As condições de temperatura, fotoperíodo (12 horas), oxigênio dissolvido (aeração constante), dureza ( $24 \pm 1$  como CaCO<sub>3</sub>) e pH (4,5 ou 8,0, de acordo com o pH teste) foram mantidas constantes durante os experimentos. Os peixes controle em água pH 4,5 e pH 8,0 foram mantidos nas mesmas condições descritas acima com exceção do pH que foi mantido em pH 7,3 a 20 e a 30 °C. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início dos testes e durante os mesmos. O pH foi diminuído com adição de 1,0 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado e aumentada para pH 8,0 com adição de, aproximadamente 1,0 mL de hidróxido de sódio

(NaOH) 2,0 M. Após a mudança do pH, as temperaturas foram estabilizadas em 20 e 30 °C e o cobre (agente químico – íon Cu) foi adicionado à água na forma de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) antes da transferência dos animais para os aquários. *P. scrofa* foram submetidos ao cobre em concentrações de  $\text{CL}_{50}$ -96 h determinadas previamente para o cobre a 20 °C em pH 4,5 =  $98 \pm 0,9 \mu\text{g.L}^{-1}$  e em pH 8,0 =  $16 \pm 0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  e a 30 °C em pH 4,5 =  $88 \pm 0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$  e em pH 8,0 =  $14 \pm 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Capítulo 2). Após 96h de exposição ao cobre foi coletado o sangue dos animais dos grupos controle e dos animais dos grupos expostos ao cobre e em seguida o fígado foi removido.

#### Testes *in vitro*

Exemplares de *P. scrofa*, aclimatados a 20 e 30 °C foram mantidos durante 96h, sem a presença de cobre, em água com pH 4,5 e pH 8,0. Após esse período, foram retirados amostras de sangue e fígado para as determinações enzimáticas. Os homogeneizados e a solução de eritrócitos (SE) obtidos dos animais controles (expostos ao pH 7,0, 4,5 e 8,0) foram usados como fonte de enzima. O metal, sulfato de cobre, foi adicionado diretamente nas amostras diluídas da SE e do homogeneizado de fígado seguindo a concentração determinada na  $\text{CL}_{50}$ -96h para os pHs 4,5 e 8,0 a 20 e 30 °C (Capítulo 2). Um volume igual de água destilada foi adicionado nas amostras controles. Após a incubação de 2h a 20 e 30 °C a atividade das enzimas foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item ensaios enzimáticos.

#### Coleta do sangue - preparação do homogenado

O sangue venoso foi coletado por punção do vaso caudal em seringas de insulina (1,0 mL) heparinizadas. As amostras sangüíneas foram mantidas em gelo até as etapas subsequentes da preparação do material. O sangue total foi centrifugado a 480 Xg, durante 10 minutos, a 4 °C. O precipitado (eritrócitos) foi obtido como descrito por ROSA *et al.* (1983). O precipitado foi lavado em tampão glicina-fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4^-$  0,025M; glicina 0,05M) pH 7,8 e centrifugado a 480 Xg, durante 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi aspirado e descartado, esta operação foi repetida por mais 2 vezes. Os eritrócitos foram ressuspensos em tampão glicina-fosfato, pH 7,8, e o material hemolizado, por choques térmicos, e centrifugado a 1085 Xg, a 4 °C durante 30 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas e concentração de proteína. A concentração de proteína foi determinada

pelo método de LOWRY *et al.* (1951) a 660 nm, utilizando-se como padrão protéico a albumina sérica bovina.

#### *Coleta do fígado*

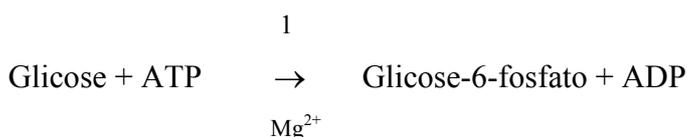
Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por secção da medula, o fígado foi dissecado, lavado em tampão de homogeneização (Tris- HCl 0,1 M; pH 7,4, DTT 1,0 mM e EDTA 1,0 mM) a 4 °C, cortado e, em seguida, homogeneizado em homogeneizador de Potter-Elvehjem com o tampão de homogeneização descrito acima na proporção de 3 volumes por grama de tecido. O material foi centrifugado a 10,000 Xg, durante 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado nas determinações enzimáticas e dosagem de proteína pelo método de LOWRY *et al.* (1951).

#### *Ensaio enzimáticos*

Os seguintes meios de reação foram utilizados na determinação das atividades enzimáticas em espectrofotômetro Spectronic Genesys 5, com circulador de água para manter constante a temperatura na câmara das cubetas.

#### ***a) Hexoquinase (HK) - ATP:D-Hexose-6-fosfotransterase, E.C.2.7.1.1.***

A HK, a primeira enzima da via glicolítica, pela fosforilação do ATP, transforma a glicose em Glicose-6-fosfato (G-6-P), de acordo com a seguinte reação :



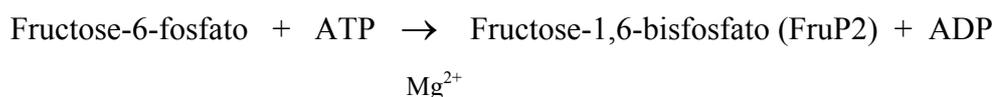
A atividade da HK foi realizada de acordo com o método de UYEDA & RACKER (1965) espectrofotometricamente em cubetas de 2,0 mL contendo glicose 25mM, NADP<sup>+</sup> 0,55 mM, ATP 3,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 7,4 mM, βME 5 mM, 0,3 UI de G-6-PDH em solução tampão Tris-HCl 74 mM, pH final 7,4, ao qual foi adicionado o homogeneizado de fígado e da SE.

Para a determinação da atividade de HK foi utilizado um sistema auxiliar, a Glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6PDH), que atua sobre a G-6-P com suporte coenzimático de NADP<sup>+</sup> transformando a G-6-P em 6-fosfogliconato e NADPH+H<sup>+</sup> e que por sua vez

é convertida em Ribulose-5-fosfato e  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  por ação da 6-fosfogliconato desidrogenase (6-PGDH).

**b) Fosfofrutoquinase (PFK) - ATP:D-Fructose-6-fosfato-1-fosfotransferase, E.C.2.7.1.11**

A PFK catalisa a fosforilação da frutose-6-fosfato pelo ATP em frutose1,6-bisfosfato+ ATP de acordo com a seguinte reação :



A atividade da PFK foi determinada fotometricamente de acordo com o método de LAYZER *et al.* (1969), em cubetas de 2,0 mL contendo F-6-P 1,0 mM, ATP 1,0 mM,  $\text{MgCl}_2$  5,0 mM,  $\text{NADH}+\text{H}^+$  0,1 mM, EDTA 1,0 mM,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  3,0 mM, GDH-TPI 2,0 UI, FDP 5,0 mM, aldolase - 1,0 UI, cristalina, de músculo de coelho em Tris-HCl 50 mM, pH final 8,2, ao qual era adicionado o homogeneizado de fígado e da SE.

Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado um sistema auxiliar, a frutose-bisfosfato aldolase, a qual envolve a clivagem da frutose1,6-bisfosfato para formar gliceraldeído-3-fosfato e fosfodihidroxiacetona-3-fosfato e a enzima auxiliar triose fosfato isomerase (TPI), que catalisa a interconversão dessas duas trioses em fosfodihidroxiacetona. Esta, por ação da glicerol-3-fosfato desidrogenase e  $\text{NADH}+\text{H}^+$  transforma a fosfodiidroxiacetona em fosfoglicerol e  $\text{NAD}^+$ .

**c) Piruvatoquinase (PK) - ATP: Piruvato fosfotransferase, E.C. 1.11.1.7**

A PK catalisa a transferência de fosfato a partir do fosfoenolpiruvato e ADP para produzir ATP e ácido pirúvico de acordo com a seguinte reação:



A atividade da PK foi determinada fotometricamente de acordo com o método de BUCHER & PFLEIDERER (1955). Em cubetas de 2,0 mL, contendo PEP 1,0 mM,  $\text{NADH}+\text{H}^+$  0,1 mM, KCl 70 mM,  $\text{MgCl}_2$  8,0 mM, ADP 1,0 mM, LDH 3,0 UI em

tampão Tris-HCl 40 mM, pH final 7,4 era adicionado o homogeneizado de fígado e da SE.

Para a determinação da atividade foi utilizado um sistema auxiliar, a lactato desidrogenase (LDH) a qual faz a transformação reversível de piruvato para lactato com suporte coenzimático do sistema  $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$ .

***d) Lactato Desidrogenase (LDH) - L-Lactato:NAD, oxidorreductase; E.C. 1.1.1.27***

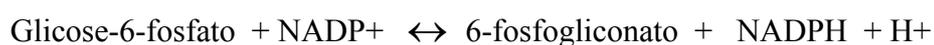
A LDH catalisa a transformação reversível do lactato para piruvato com suporte coenzimático do sistema  $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$ , de acordo com a seguinte reação:



A atividade da LDH foi determinada fotometricamente de acordo com o método de BERGMEYER (1974), em cubetas de 2,0 mL, contendo piruvato de sódio 1,0 mM,  $\text{NADH}+\text{H}^+$  0,14 mM em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH final 7,4, ao qual foi adicionado o homogeneizado de fígado e da SE.

***e) Glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6PDH) - D-Glicose-6-fosfato: NADP 1-oxidorreductase, E.C.1.1.1.49***

A G-6PDH catalisa a seguinte reação:



A atividade da G-6PDH foi determinada fotometricamente pelo método descrito por BERGMEYER (1974), em cubetas de 2,0 mL contendo  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{NADP}^+$  0,39 mM, G-6-P 5,0 mM, em tampão glicina 80 mM, pH final 7,6, ao qual foi adicionado o homogeneizado de fígado e da SE.

Para a determinação da atividade da G-6PDH foi utilizado o mesmo procedimento descrito para a HK. Observações: No caso da G-6PDH é essencial notar que à formação do 6-fosfogliconato se segue a sua posterior oxidação, por ação da 6-fosfogliconato desidrogenase (6-PGDH), a ribulose-5-fosfato e  $\text{CO}_2$ , com formação de um segundo  $\text{NADH} + \text{H}^+$ .

As atividades enzimáticas foram determinadas a 20 °C para os grupos de animais aclimatados a 20 °C e a 30 °C para os grupos de animais aclimatados a 30 °C em espectrofotômetro Spectronic Genesys 5, com circulador de água para manter constante a temperatura na câmara das cubetas e por monitoramento da mudança da absorvância do NADH+ H<sup>+</sup> ou NADPH a 340 nm. A atividade de cada enzima foi determinada em 8 sobrenadantes preparados da SE e dos extratos de fígado de 8 animais de cada grupo.

***e) Cálculo de atividade específica de cada enzima***

A atividade específica de cada enzima estudada foi expressa em unidades internacionais IU/mg de proteína e o cálculo foi efetuado empregando-se a expressão:

$$\frac{\Delta \text{abs/min} \times \text{diluição}}{\varepsilon \times V \times C_{(\text{proteína})}}$$

Onde,

V= volume da tomada de amostra

$\Delta \text{abs/min}$ = diferença em absorvância obtida experimentalmente, por minuto de tempo de medida

C= concentração da proteína no sistema

Diluição= diluição da amostra ou do preparado original

$\varepsilon$  = coeficiente de extinção molar. No caso de piridino-nucleotídeos (NAD, NADH+H<sup>+</sup>, NADP, NADPH+H<sup>+</sup>),  $\varepsilon$  = 6,22, medido em cubeta de 1,0 cm de caminho óptico, quando 1,0 mol de tais coenzimas é oxidado ou reduzido, por mol de substrato metabolizado. Ex. medida de PK e da LDH;  $\varepsilon$  = 12,44, quando 2 moles de piridinonucleotídeo estão envolvidos no processo de medida. Ex. PFK+ sistema auxiliar contendo FruP<sub>2</sub>ALD que cinde fructose-bisfosfato em 2 triosefosfatos.

A atividade das enzimas da SE e do homogenado de fígado estão representadas como %.

***Determinação dos metabólitos no sangue e no fígado***

A concentração de glicose foi determinada de acordo com o método NIKKILA & HYVARIWEN (1962) da o-toluidina tendo sido utilizado o kit LabTest nº 28. A reação entre açúcares redutores e a o-toluidina produz soluções coloridas cuja intensidade é proporcional à concentração dos glicídios presentes. No caso da glicose, esta, através do seu grupo redutor, condensa-se com a o-toluidina formando mistura em equilíbrio de

glicosil-o-toluidina e a correspondente base de Schiff, de coloração azul-esverdeada, cuja absorbância é medida em 630 nm. O glicogênio hepático foi determinado pelo método de DUBOIS *et al.* (1956) modificado por BIDINOTO *et al.* (1997). As amostras de fígado foram dissolvidas em KOH 6 N sendo acrescentado à solução, álcool etílico e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%), centrifugados a 3000 Xg durante 3 minutos e o precipitado dissolvido em água destilada. A amostra foi lida em espectrofotômetro (GENESYS 5) a 480 nm e os resultados expressos em  $\mu\text{mols unidades glicosil-glicose.g}^{-1}$ .

### *Análise Estatística*

A análise estatística foi efetuada utilizando o programa “Sigma Stat”, comparando-se os resultados obtidos nos grupos controle com os resultados dos grupos expostos ao cobre a 20 e 30 °C e pH 4,5 e pH 8,0. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  SEM. Neste estudo foi feita a análise de variância com três fatores "Three-way" (ANOVA) para estabelecer se as médias dos tratamentos foram ou não estatisticamente iguais. O teste de Tukey com 95% de intervalo de confiança foi utilizado para determinar quais as médias que eram estatisticamente diferentes sempre que as diferenças foram detectadas na análise da variância.

## **Resultados**

Nenhum peixe dos grupos controle morreu. A atividade enzimática (UI/mg proteína) é mostrada nas Tabelas 1 e 2 - estudos *in vivo* e Tabelas 3 e 4 – estudos *in vitro*. Os valores médios de atividade das enzimas regulatórias (HK, PFK e PK) e das enzimas associadas (LDH e G6PDH) da SE e do fígado dos experimentos *in vivo* dos grupos controle em pH 7,0, 4,5 e 8,0 e expostos ao cobre em pH 4,5 e 8,0 a 20 e a 30 °C são mostrados nas figuras 1 e 2, respectivamente. A concentração de glicose plasmática e glicogênio hepático, dos grupos controle em pH 7,0, 4,5 e 8,0 e expostos ao cobre em pH 4,5 e 8,0 a 20 e a 30 °C são mostrados na figura 3. Os valores médios de atividades enzimáticas das enzimas regulatórias (HK, PFK e PK) e associadas (LDH e G6PDH) obtidos na SE e no fígado dos experimentos *in vitro* dos grupos controle em pH 7,0, 4,5 e 8,0 e expostos ao cobre em pH 4,5 e 8,0 a 20 e a 30 °C são mostrados nas figuras 4 e 5, respectivamente.

**TABELA I. Atividade enzimática da suspensão eritrocitária de *P. scrofa* a 20 e a 30 °C (n=8 em cada grupo) - estudos *in vivo*. <sup>a</sup>P< 0,05 em relação ao controle - pH 7,0; <sup>b</sup>P< 0,05 em relação ao controle - pH 4,5; <sup>c</sup>P< 0,05 em relação ao controle - pH 8,0; <sup>d</sup>P< 0,05 em relação ao Cu<sup>2+</sup>- pH 4,5; <sup>e</sup>P< 0,05 em relação ao Cu<sup>2+</sup>- pH 8,0. Os valores da tabela representam a média ± SEM.**

Enzimas	Controle			Exposição ao cobre (CL <sub>50</sub> -96 h)		
	20 °C	pH 7,0	pH 4,5	pH 8,0	pH 4,5	pH 8,0
HK		9,06 ± 0,69	9,80 ± 0,59	9,64 ± 0,55	11,66 ± 0,99	14,24±0,97 <sup>a,b,c,d</sup>
PFK		7,23 ± 0,37	5,15 ± 0,28 <sup>a</sup>	6,70 ± 0,27 <sup>b</sup>	8,19 ± 0,49 <sup>b</sup>	6,40 ± 0,37 <sup>d</sup>
PK		39,28 ± 0,58	34,51 ± 2,55	47,59 ± 3,88 <sup>b</sup>	46,95 ± 4,94 <sup>a,b</sup>	27,21± 2,72 <sup>c,d</sup>
LDH		33,28 ± 0,85	30,01 ± 1,68	24,76 ± 2,07 <sup>a</sup>	25,26 ± 1,48 <sup>a</sup>	36,98±0,72 <sup>b,c,d</sup>
G6PDH		15,59 ± 0,86	13,30 ± 0,98	13,55 ± 0,79	11,26 ± 0,86 <sup>a</sup>	13,89 ± 0,76
30 °C						
HK		16,98 ± 0,72	18,49 ± 1,1	15,27 ± 0,88	16,42 ± 1,02	14,24±0,97 <sup>b</sup>
PFK		8,17 ± 0,53	7,52 ± 0,48	8,32 ± 0,47	7,98 ± 0,43	5,36 ± 0,40 <sup>a,b,c,d</sup>
PK		59,71 ± 4,14	38,58 ± 2,99 <sup>a</sup>	42,87 ± 3,07 <sup>a</sup>	54,67 ± 3,62 <sup>b</sup>	55,06± 2,23 <sup>b</sup>
LDH		29,90 ± 1,87	31,51 ± 2,62	24,72 ± 1,29	40,19 ± 2,41 <sup>a,c</sup>	37,30±2,7 <sup>c</sup>
G6PDH		16,48 ± 0,74	18,33 ± 1,18	14,17 ± 0,87 <sup>b</sup>	15,88 ± 0,60	22,62±1,28 <sup>a,b,c,d</sup>

**TABELA II. Atividade enzimática do fígado de *P. scrofa* a 20 e a 30 °C (n=8 em cada grupo) - estudos *in vivo*.** <sup>a</sup>*P* < 0,05 em relação ao controle - pH 7,0; <sup>b</sup>*P* < 0,05 em relação ao controle – pH 4,5; <sup>c</sup>*P* < 0,05 em relação ao controle – pH 8,0; <sup>d</sup>*P* < 0,05 em relação ao Cu<sup>2+</sup> - pH 4,5; <sup>e</sup>*P* < 0,05 em relação ao Cu<sup>2+</sup> - pH 8,0. Os valores da tabela representam a média ± SEM.

Enzimas	Controle			Exposição ao cobre (CL <sub>50</sub> -96 h)	
	20 °C pH 7,0	pH 4,5	pH 8,0	pH 4,5	pH 8,0
HK	7,37 ± 0,57	5,76 ± 0,50	7,97 ± 0,38 <sup>b</sup>	6,43 ± 0,40	6,97 ± 0,35
PFK	13,00 ± 0,57	15,01 ± 1,09	13,53 ± 0,60	10,53 ± 0,83 <sup>b</sup>	12,33 ± 0,57
PK	34,83 ± 1,29	26,25 ± 3,05	28,94 ± 1,71	28,14 ± 1,30	33,76 ± 1,81 <sup>d</sup>
LDH	26,80 ± 0,68	37,72 ± 3,11 <sup>a</sup>	30,23 ± 0,65 <sup>b</sup>	31,62 ± 1,48	30,23 ± 0,87 <sup>b</sup>
G6PDH	15,68 ± 0,71	16,88 ± 1,21	18,09 ± 1,17	15,54 ± 1,15	17,15 ± 0,34
30 °C					
HK	15,54 ± 0,94	11,12 ± 0,52 <sup>a</sup>	11,66 ± 0,45 <sup>a</sup>	9,33 ± 0,45 <sup>a</sup>	12,73 ± 0,53 <sup>a,d</sup>
PFK	19,16 ± 0,67	12,46 ± 0,80 <sup>a</sup>	9,78 ± 0,60 <sup>a,b</sup>	8,17 ± 0,38 <sup>a,b</sup>	5,36 ± 0,33 <sup>a,b,c,d</sup>
PK	40,46 ± 1,58	31,89 ± 1,20 <sup>a</sup>	26,26 ± 1,29 <sup>a,b</sup>	16,88 ± 1,16 <sup>a,b,c</sup>	9,92 ± 0,77 <sup>a,b,c,d</sup>
LDH	33,23 ± 1,15	25,46 ± 1,88 <sup>a</sup>	19,83 ± 1,15 <sup>a,b</sup>	24,12 ± 0,83 <sup>a</sup>	26,53 ± 0,99 <sup>a,c</sup>
G6PDH	33,23 ± 1,07	28,40 ± 1,07	40,73 ± 1,54 <sup>a,b</sup>	29,21 ± 2,05 <sup>c</sup>	24,65 ± 1,59 <sup>a,c</sup>

#### *Experimentos in vivo*

No fígado de *P. scrofa* a atividade da HK diminuiu em 20% (*P* < 0,05) nos animais mantidos em água com pH 4,5 a 20 °C enquanto que a 30 °C a atividade desta enzima diminuiu (*P* < 0,05) em aproximadamente 50% nos controles. Na presença de cobre a atividade aumentou em 30% (*P* < 0,05) em pH 4,5 a 20 °C e em 50% em pH 8,0 a 30 °C (Fig.1). Na SE, a atividade da HK, dos grupos controle, não mostrou alteração. Na presença de cobre, a atividade da HK aumentou em 30% (*P* < 0,05) em pH 8,0 a 20 °C e diminuiu 20% (*P* < 0,05) em pH 4,5 a 30 °C. Em relação a temperatura os valores da atividade da HK a 30 °C foram menores do que os encontrado a 20 °C exceto para o controle pH 4,5 (Fig.2).

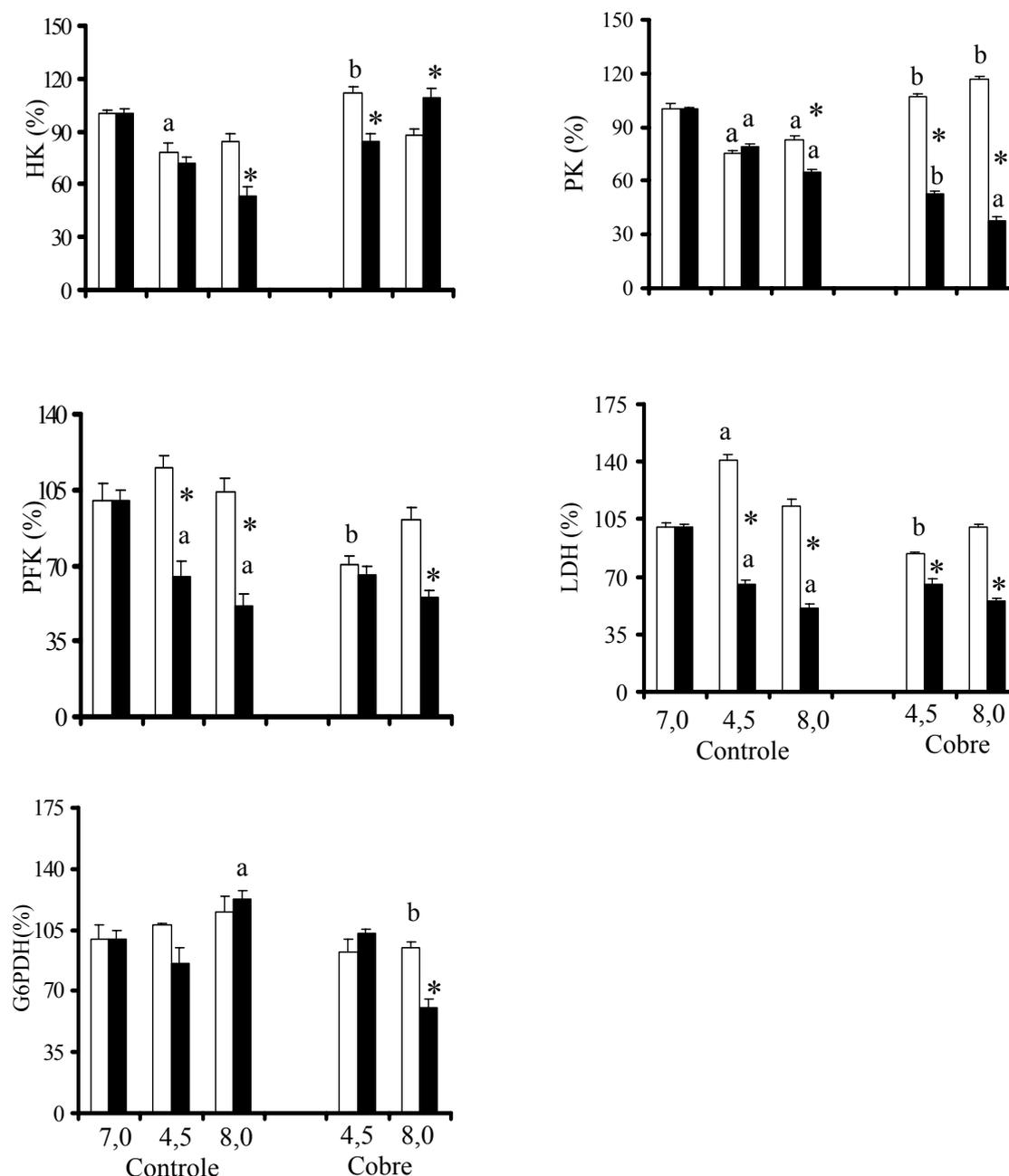
A atividade da PFK, no fígado, diminuiu 40 % ( $P < 0,05$ ) em pH 4,5 e 8,0 a 30 °C nos grupos controle e manteve-se baixa nos animais expostos ao cobre. A 20 °C a redução na atividade da PFK só ocorreu nos animais expostos ao cobre em pH 4,5 (Fig.1). Na SE, a atividade da PFK, do grupo controle pH 4,5 a 20 °C diminuiu 30% ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle pH 7,0. Na presença de cobre houve um aumento da atividade em 60% ( $P < 0,05$ ) em pH 4,5 a 20 °C e diminuição de 40% ( $P < 0,05$ ) em pH 8,0 a 30 °C. Em relação ao efeito da temperatura, a atividade da PFK foi mais alta a 30 °C do que a 20 °C nos controles pH 4,5. Na presença de cobre a atividade diminuiu 50% ( $P < 0,05$ ) em pH 4,5 e 30 % em pH 8,0 em relação a 20 °C (Fig.2).

No fígado, a atividade da PK diminuiu em 30-40% ( $P < 0,05$ ) nos grupos controle em ambas temperaturas. Na presença de cobre houve um aumento da atividade em 30% ( $P < 0,05$ ) em pH 4,5 e 8,0 a 20 °C e uma diminuição em 20% e 70%, respectivamente em pH 4,5 e 8,0 a 30 °C. O efeito da temperatura foi observado na atividade desta enzima, os valores da atividade da PK a 30 °C foram menores do que os encontrados a 20 °C (Fig.1). Na SE a atividade da PK, do grupo controle pH 8,0, aumentou em aproximadamente 20% ( $P < 0,05$ ) a 20 °C e diminuiu em 40% em ambos pHs a 30 °C. O cobre induziu aumento ( $P < 0,05$ ) de 50% na atividade desta enzima em pH 4,5 e diminuição de 50% ( $P < 0,05$ ) em pH 8,0 a 20 °C. A 30 °C a atividade da PK aumentou em 80% e 50% ( $P < 0,05$ ), respectivamente, em pH 4,5 e pH 8,0 (Fig.2).

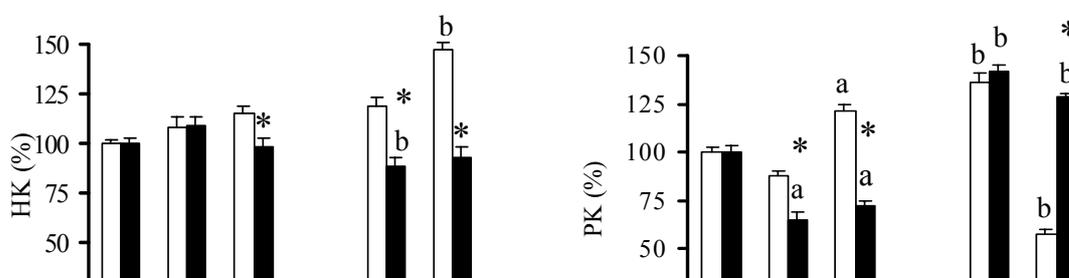
A atividade da LDH, no fígado, aumentou em 40% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 a 20 °C e diminuiu em 50% ( $P < 0,05$ ) em ambos pHs a 30 °C, nos grupos controle. A exposição ao cobre diminuiu a atividade desta enzima em 60% ( $P < 0,05$ ) em pH 4,5 a 20 °C. De forma geral, os valores da atividade da LDH foram menores a 30 °C (Fig.1). Na SE a atividade da LDH diminuiu em 25% ( $P < 0,05$ ) apenas em pH 8,0 a 20 e 30 °C, nos grupos controle, enquanto que na presença de cobre a atividade aumentou em 70% ( $P < 0,05$ ) no pH 8,0 a 20 °C e cerca de 20-70% em pH 4,5 e pH 8,0 a 30 °C. Em relação a temperatura os valores da atividade desta enzima foram maiores a 30 °C, porém um aumento significativo foi observado somente em cobre pH 4,5 (Fig.2).

A atividade da G6PDH, no fígado, aumentou em 20 % no grupo controle pH 8,0 a 30 °C e, nos grupos expostos ao cobre diminuiu em 20 e 60 % ( $P < 0,05$ ) no pH 8,0 a 20 e a 30 °C, respectivamente. O efeito da temperatura foi observado somente no grupo exposto ao cobre em pH 8,0 a 30 °C com diminuição na atividade em aproximadamente 30% ( $P < 0,05$ ) (Fig.1). A atividade da G6PDH da SE não apresentou variação nos

grupos controle a 20 e a 30 °C. Nos grupos expostos ao cobre, a atividade diminuiu em 30% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 e aumentou em 60 % ( $P < 0,05$ ) em pH 8,0 a 30 °C. O efeito da temperatura foi observado no grupo controle pH 4,5 e exposto ao cobre pH 8,0, com aumento de 30% e 60 % na atividade a 30 °C, respectivamente (Fig.2).



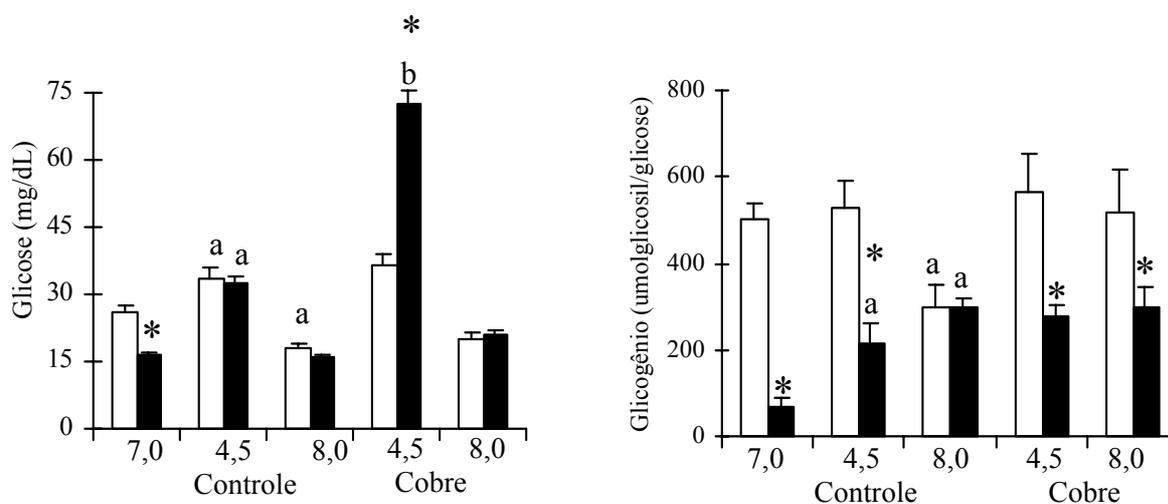
**Figura 1.** Atividade enzimática do fígado de *P. scrofa* após exposição ao cobre (CL<sub>50</sub>-96h) *in vivo*. As barras representam a média dos valores ( $\pm$  SEM); Fígado a 20 °C (colunas claras) e a 30 °C (colunas escuras); (n = 8 em cada grupo). <sup>a</sup> $P < 0,05$  em relação aos controles a 20 e a 30 °C; <sup>b</sup> $P < 0,05$  em relação aos controles e expostos ao cobre a 20 e a 30 °C; \*  $P < 0,05$  em relação a 20 e a 30 °C.



**Figura 2.** Atividade enzimática da SE de *P. scrofa* após exposição ao cobre (CL<sub>50</sub>-96 h) *in vivo*. As barras representam a média dos valores ( $\pm$  SEM); Fígado a 20 °C (colunas claras) e a 30 °C (colunas escuras); (n = 8 em cada grupo). <sup>a</sup> $P < 0,05$  em relação aos controles a 20 e a 30 °C; <sup>b</sup> $P < 0,05$  em relação aos controles e expostos ao cobre a 20 e a 30 °C; <sup>\*</sup> $P < 0,05$  em relação a 20 e a 30 °C.

Nos grupos controle, a concentração de glicose aumentou ( $P < 0,05$ ) em pH 4,5 a 20 e a 30 °C e diminuiu ( $P < 0,05$ ) em pH 8,0 a 20 °C. Na presença de cobre houve aumento significativo na concentração de glicose no pH 4,5 a 30 °C. O efeito da temperatura foi observado na concentração de glicose plasmática com diminuição em controle pH 7,0 e aumento no grupo exposto ao cobre em pH 4,5 a 30 °C (Fig.3).

O conteúdo de glicogênio diminuiu ( $P < 0,05$ ) em controle pH 8,0 a 20 °C e manteve-se estável nos grupos expostos ao cobre. A 30 °C houve aumento na concentração de glicogênio ( $P < 0,05$ ) em todos os tratamentos e em relação a temperatura os valores de glicogênio foram menores a 30 °C (Fig.3).



**Figura 3.** Concentração de glicose do plasma e de glicogênio do fígado de *P. scrofa* após exposição ao cobre (CL<sub>50</sub>-96 h). As barras representam a média dos valores ( $\pm$  SEM); Animais aclimatados a 20 °C (colunas claras) e animais aclimatados a 30 °C (colunas escuras); (n = 8 em cada grupo). <sup>a</sup> $P < 0,05$  em relação aos grupos controle a 20 e a 30 °C; <sup>b</sup> $P < 0,05$  em relação aos grupos expostos ao cobre a 20 e a 30 °C e \* $P < 0,05$  em relação a 20 e a 30 °C.

#### *Experimentos in vitro*

No fígado, a atividade da HK dos grupos controle aumentou em 30% e 80% ( $P < 0,05$ ), respectivamente, no pH 4,5 e 8,0; a atividade da PK diminuiu em 20% ( $P < 0,05$ ) em ambos pHs e a atividade da G6PDH aumentou em 60% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 e 30% no pH 8,0 a 20 °C. A 30 °C, nos grupos controle, houve diminuição ( $P < 0,05$ ) da atividade da HK em 40% e em 60%, respectivamente em pH 4,5 e 8,0; e da PFK em 40% em ambos pHs. A atividade da PK diminuiu em 60 e 40% em pH 4,5 e 8,0, respectivamente; a atividade da LDH em 40% em ambos pHs e da G6PDH no pH 4,5 em 40% e no pH 8,0 em 30%. Na presença do cobre, a atividade da HK diminuiu em 40% ( $P < 0,05$ ) no pH 8,0, da PK aumentou 60% ( $P < 0,05$ ) em pH 4,5 e 50% em pH 8,0;

a LDH aumentou em 20% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 e a G6PDH diminuiu em 60 % ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 a 20 °C. A 30 °C, na presença de cobre a atividade da HK aumentou em 80% ( $P < 0,05$ ) em ambos os pHs; a PFK aumentou em 20% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 e 30% no pH 8,0; a PK aumentou em 120% ( $P < 0,05$ ) em pH 4,5 e 30% no pH 8,0; a LDH aumentou em 80% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 e 70% no pH 8,0 e a G6PDH em 60% no pH 4,5 e 40% no pH 8,0. Em relação a temperatura a atividade da HK diminuiu em 70% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 e 150% no pH 8,0, nos grupos controle e nos grupos expostos ao cobre em pH 8,0 em 30% ( $P < 0,05$ ) a 30 °C. A PFK teve atividade menor nos controles, cerca de 30% e nos grupos expostos ao cobre em pH 4,5 diminuiu 20% a 30 °C. A atividade das enzimas, PK e LDH, após exposição ao cobre, aumentaram em 40% ( $P < 0,05$ ) e a G6PDH diminuiu em pH 8,0 cerca de 25% ( $P < 0,05$ ) a 30 °C (Fig.4).

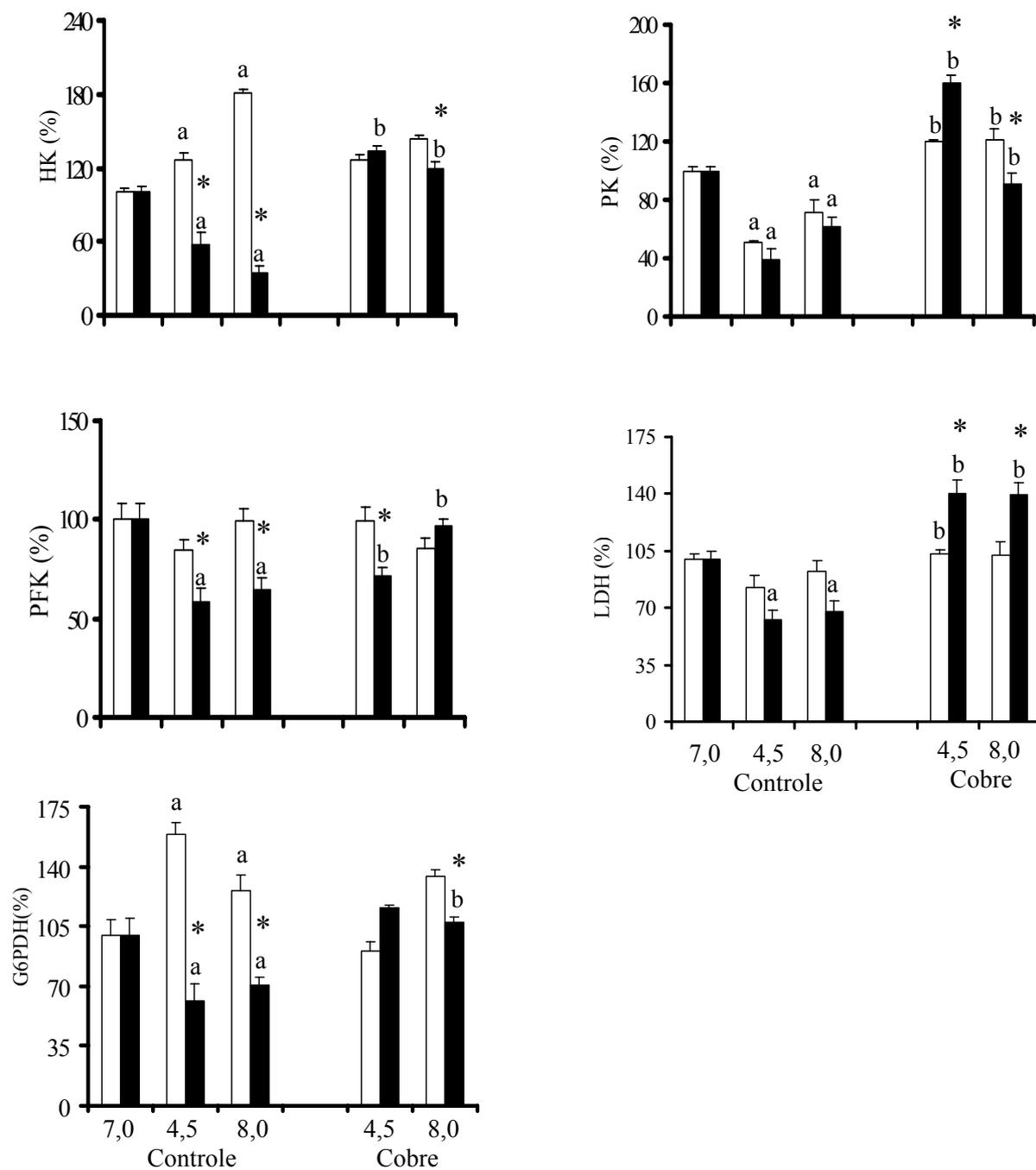
Na SE, nos grupos controle a atividade da HK aumentou em 50% ( $P < 0,05$ ) no pH 8,0; a atividade das enzimas PFK, PK, LDH e G6PDH diminuíram em 30-50% ( $P < 0,05$ ) em pH 4,5 e, no pH 8,0 as enzimas LDH e G6PDH diminuíram em aproximadamente 50% ( $P < 0,05$ ) a atividade a 20 °C. Na presença de cobre, a atividade das enzimas HK, PFK, PK, LDH e G6PDH aumentaram cerca de 50-70% em ambos pHs exceto as enzimas HK e PFK que diminuíram em pH 8,0 a 20 °C. A atividade da HK aumentou em 50 e 200% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 e pH 8,0, respectivamente; a atividade da LDH diminuiu em 30% ( $P < 0,05$ ) no pH 8,0 e a G6PDH aumentou em 30% ( $P < 0,05$ ) no pH 8,0 a 30 °C. Em relação a temperatura, nos grupos controle, a atividade da HK diminuiu em 70% no pH 8,0, a PFK aumentou em 35% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5; a PK diminuiu em 40% ( $P < 0,05$ ) no pH 8,0 e a LDH aumentou ( $P < 0,05$ ) cerca de 50% em pH 4,5 e pH 8,0; a atividade da G6PDH diminuiu em 20% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 a 30 °C. Nos grupos expostos ao cobre, a 30 °C, a atividade da HK diminuiu em 30% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 e aumentou em 150% ( $P < 0,05$ ) no pH 8,0; a atividade da PFK diminuiu em 50% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 e aumentou em 45% ( $P < 0,05$ ) no pH 8,0; a atividade da PK diminuiu em 60% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5; a atividade da LDH diminuiu em 20% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5 e 50% no pH 8,0 e a G6PDH diminuiu em 20% ( $P < 0,05$ ) no pH 4,5.

**TABELA III. Atividade enzimática da suspensão eritrocitária de *P. scrofa* a 20 e a 30 °C (n=8 em cada grupo) - estudos *in vitro*.** <sup>a</sup>*P* < 0,05 em relação ao controle - pH 7,0; <sup>b</sup>*P* < 0,05 em relação ao controle - pH 4,5; <sup>c</sup>*P* < 0,05 em relação ao controle - pH 8,0; <sup>d</sup>*P* < 0,05 em relação ao Cu<sup>2+</sup> - pH 4,5; <sup>e</sup>*P* < 0,05 em relação ao Cu<sup>2+</sup> - pH 8,0. Os valores da tabela representam a média ± SEM.

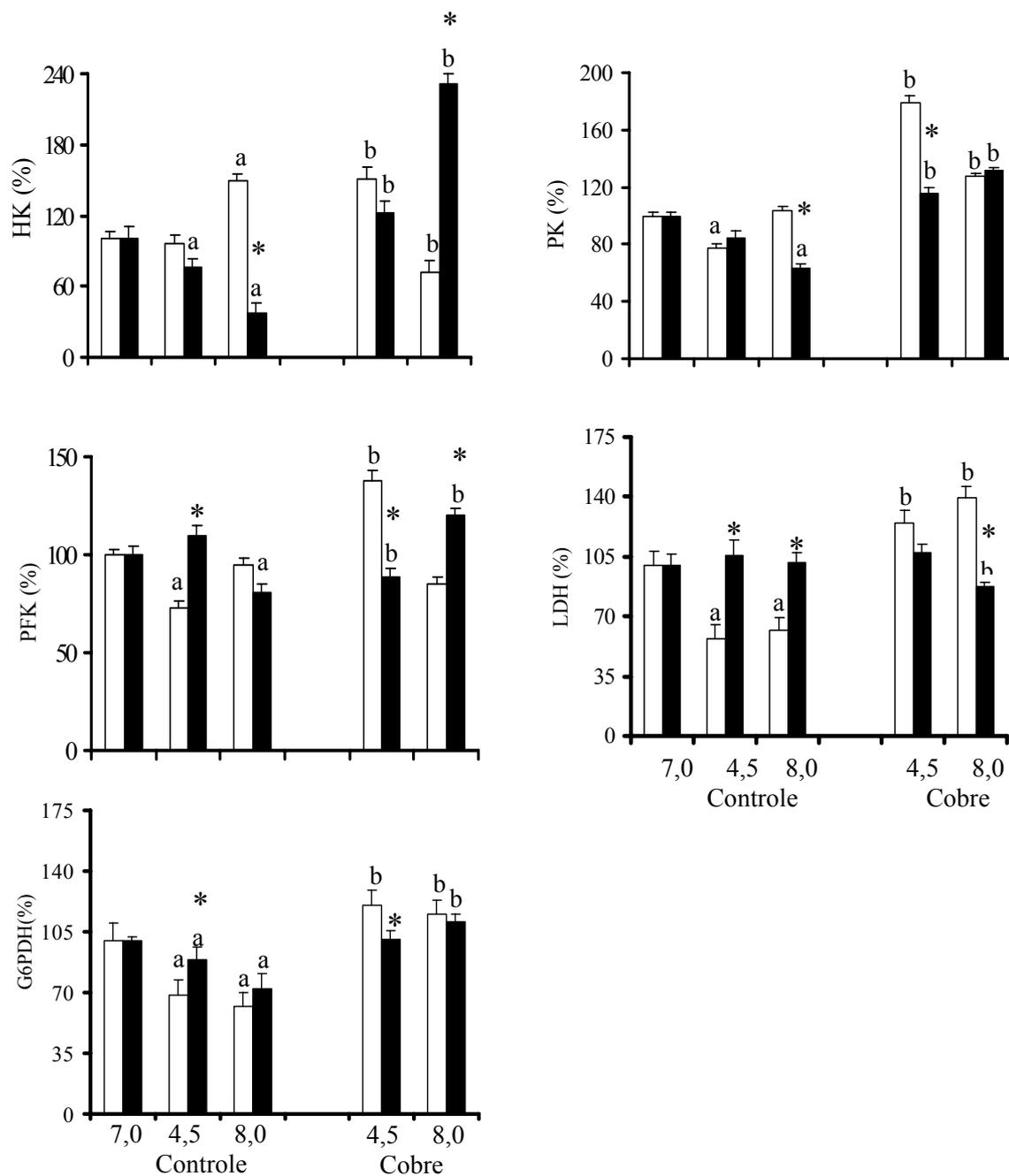
Enzimas	Controle			Exposição ao cobre (CL <sub>50</sub> -96 h)		
	20 °C	pH 7,0	pH 4,5	pH 8,0	pH 4,5	pH 8,0
HK		8,43 ± 0,33	8,15 ± 0,51	13,06 ± 0,76 <sup>a,b</sup>	12,29 ± 0,42 <sup>a,b</sup>	9,45 ± 0,56 <sup>c,d</sup>
PFK		7,23 ± 0,37	5,28 ± 0,27 <sup>a</sup>	6,88 ± 0,29 <sup>b</sup>	7,29 ± 0,43 <sup>b</sup>	5,83 ± 0,30 <sup>a,d</sup>
PK		37,79 ± 2,49	29,40 ± 1,63	38,99 ± 1,96	52,52 ± 2,44 <sup>a,b,c</sup>	49,61 ± 3,35 <sup>a,b,c</sup>
LDH		33,28 ± 1,85	18,83 ± 1,04 <sup>a</sup>	20,50 ± 0,79 <sup>a</sup>	23,42 ± 1,40 <sup>a</sup>	28,54 ± 1,28 <sup>b,c</sup>
G6PDH		15,59 ± 0,86	10,68 ± 0,55 <sup>a</sup>	9,65 ± 0,55 <sup>a</sup>	12,86 ± 0,46 <sup>a,c</sup>	11,15 ± 0,49 <sup>a</sup>
30 °C						
HK		16,98 ± 0,72	12,86 ± 0,87 <sup>a</sup>	8,44 ± 0,48 <sup>a,b</sup>	15,68 ± 1,01 <sup>c</sup>	19,49 ± 0,56 <sup>b,c,d</sup>
PFK		8,17 ± 0,53	8,94 ± 0,38	6,58 ± 0,23 <sup>a,b</sup>	7,94 ± 0,35	7,89 ± 0,33
PK		57,34 ± 4,02	48,69 ± 2,16	36,29 ± 1,16 <sup>a,b</sup>	56,27 ± 2,43 <sup>c</sup>	47,43 ± 2,17 <sup>c</sup>
LDH		29,90 ± 1,87	31,55 ± 1,46	30,28 ± 2,17	33,76 ± 1,76	26,41 ± 1,40
G6PDH		15,96 ± 0,62	14,17 ± 0,52	11,52 ± 0,65 <sup>a</sup>	14,24 ± 0,72	12,76 ± 0,47 <sup>a</sup>

**TABELA IV. Atividade enzimática do fígado de *P. scrofa* a 20 e a 30 °C (n=8 em cada grupo) - estudos *in vitro*.** <sup>a</sup>*P* < 0,05 em relação ao controle - pH 7,0; <sup>b</sup>*P* < 0,05 em relação ao controle – pH 4,5; <sup>c</sup>*P* < 0,05 em relação ao controle – pH 8,0; <sup>d</sup>*P* < 0,05 em relação ao Cu<sup>2+</sup> - pH 4,5; <sup>e</sup>*P* < 0,05 em relação ao Cu<sup>2+</sup> - pH 8,0. Os valores da tabela representam a média ± SEM.

Enzimas	Controle			Exposição ao cobre (CL <sub>50</sub> -96 h)	
	20 °C pH 7,0	pH 4,5	pH 8,0	pH 4,5	pH 8,0
HK	7,75 ± 0,32	9,85 ± 0,36	11,02 ± 0,42 <sup>a</sup>	12,46 ± 0,95 <sup>a,b</sup>	15,76±1,15 <sup>a,b,c,d</sup>
PFK	13,06 ± 0,42	11,05 ± 0,45	12,96 ± 0,47	10,99 ± 0,65	11,02 ± 0,70
PK	34,57 ± 1,01	17,68 ± 0,99 <sup>a</sup>	24,76 ± 0,96 <sup>a,b</sup>	21,13 ± 1,08 <sup>a</sup>	30,01± 1,98 <sup>b,d</sup>
LDH	26,33 ± 0,60	21,82 ± 1,05 <sup>a</sup>	24,39 ± 1,52	22,59 ± 1,23	24,92±1,23
G6PDH	15,47 ± 0,54	24,57 ± 1,48 <sup>a</sup>	19,52 ± 1,19	22,28 ± 1,08 <sup>a</sup>	26,26 ± 1,98 <sup>a,c</sup>
30 °C					
HK	15,68 ± 0,71	9,07 ± 0,29 <sup>a</sup>	9,53 ± 0,37 <sup>a</sup>	12,06 ± 0,76 <sup>a,b,c</sup>	11,39±0,32 <sup>a</sup>
PFK	19,59 ± 0,57	11,52 ± 0,68 <sup>a</sup>	12,63 ± 0,67 <sup>a</sup>	8,27 ± 0,34 <sup>a,b,c</sup>	12,28 ± 0,49 <sup>a,d</sup>
PK	40,19 ± 1,18	15,68 ± 0,85 <sup>a</sup>	24,80 ± 0,92 <sup>a,b</sup>	25,03 ± 0,85 <sup>a,b</sup>	22,51± 1,45 <sup>a,b</sup>
LDH	32,76 ± 1,01	20,44 ± 0,68 <sup>a</sup>	22,28 ± 1,19 <sup>a</sup>	28,71 ± 1,47 <sup>b,c</sup>	31,06±1,92 <sup>c,d</sup>
G6PDH	33,56 ± 0,93	20,67 ± 0,82 <sup>a</sup>	23,66 ± 0,97 <sup>a</sup>	23,89 ± 1,02 <sup>a</sup>	25,49 ± 0,65 <sup>a,b</sup>



**Figura 4.** Atividade enzimática do Fígado de *P. scrofa* após exposição ao cobre *in vitro* ( $CL_{50}$ –96 h). As barras representam a média dos valores ( $\pm$  SEM); Fígado a 20 °C (colunas claras) e a 30 °C (colunas cinza escuras); (n = 8 em cada grupo). <sup>a</sup> $P < 0,05$  em relação aos controles a 20 e 30 °C; <sup>b</sup> $P < 0,05$  em relação aos controles e expostos ao cobre a 20 e 30 °C; \* $P < 0,05$  em relação a 20 e 30 °C.



**Figura 5.** Atividade enzimática da SE de *P. scrofa* após exposição ao cobre *in vitro* (CL<sub>50</sub>–96 h). As barras representam a média dos valores ( $\pm$  SEM); Fígado a 20 °C (colunas claras) e a 30 °C (colunas cinza escuras); (n = 8 em cada grupo). <sup>a</sup> $P < 0,05$  em relação aos controles a 20 e 30 °C; <sup>b</sup> $P < 0,05$  em relação aos controles e expostos ao cobre a 20 e 30 °C; \* $P < 0,05$  em relação a 20 e 30 °C.

## Discussão

A variação do pH juntamente com a mudança da temperatura da água aumenta o efeito do cobre influenciando na sua biodisponibilidade e especiação (ver Capítulo 2 desta tese). A temperatura e o pH são dois fatores comuns que influenciam a velocidade das reações enzimáticas. A diminuição da atividade da HK e da PK no fígado, nos

experimentos *in vivo*, e o aumento da PFK e da LDH a 20 °C refletiram uma resposta à temperatura baixa e ao pH da água que provavelmente levou a um desequilíbrio iônico. O peixe deve dispor de mecanismos para o reparo com gasto de energia (ver Capítulo 2 desta tese) sendo reforçados ainda com níveis aumentados de glicose plasmática (pH 4,5 a 20 °C). Provavelmente, a glicose está sendo utilizada pela LDH com a formação de ácido láctico e, pode estar sendo utilizada também pela via da lançadeira das pentoses fosfatos, como mostra a atividade aumentada da G6PDH em controle pH 8,0. A redução na concentração de glicogênio corrobora com essa hipótese. Embora altas temperaturas aumentem a atividade de algumas enzimas observamos diminuição na atividade da PFK, PK e LDH demonstrando que o pH da água pode ter influenciado no desempenho destas enzimas e que, provavelmente a capacidade glicolítica diminuiu neste tecido. A 30 °C o conteúdo de glicogênio aumentou nos grupos controle pH 4,5 e 8,0, e permaneceu constante nos grupos expostos ao cobre o que, provavelmente manteve constante a concentração de glicose. A concentração de glicogênio manteve-se estável a 20 e a 30 °C em todos os tratamentos exceto no grupo controle pH 8,0 a 20 °C que diminuiu. Esse mecanismo de conservação de reserva energética parece ser importante uma vez que o glicogênio é uma fonte de energia de rápida mobilização.

O fígado que é um órgão vital ao metabolismo e desintoxicação, e onde ocorre as maiores alterações das rotas metabólicas, utiliza mecanismos para garantir a adaptação e sobrevivência às alterações do meio. O cobre *in vivo*, induziu mudanças na atividade de algumas enzimas do fígado de curimatá. O aumento na atividade da HK e da PK, enzima responsável diretamente pela produção de ATP, em pH 4,5 a 20 °C, indica que está havendo mobilização da glicose pela HK, no entanto, houve diminuição dos níveis da PFK, enzima regulatória da via glicolítica e dependente de ATP, e da LDH sugerindo que a capacidade glicolítica diminuiu neste tecido, provavelmente, devido a função primária do fígado em exportar glicose no sentido de providenciar fonte energética para outros tecidos. No grupo exposto ao cobre em pH 8,0 observamos o mesmo quadro exceto para a atividade da HK que também diminuiu. É interessante observar que em pH 4,5 a 30 °C a atividade da PK diminuiu enquanto que nas demais enzimas não houve alteração na atividade provavelmente, o metabolismo dos peixes não foi alterado ou o animal pode ter desenvolvido resistência ao metal (síntese de metalotionina) ou uma adaptação.

Além disso, os níveis aumentados da G6PDH, no fígado, nos grupos controle e grupos expostos ao cobre a 20 e 30 °C, exceto para o pH 8,0 a 30 °C que foram menores, sugerindo diminuição da formação de NADPH, pode ter um efeito maior no desvio das pentoses-fosfato, sob condições de estresse e no consumo da glicose-6-fosfato. A atividade da G6PDH, enzima que participa direta ou indiretamente na decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tem alta capacidade de gerar NADPH, um importante cofator necessário para reoxidar a glutatona através da glutatona redutase contrabalanceando a condição de estresse oxidativo. A G6PDH catalisa a primeira reação do desvio da via pentose-fosfato, isto é, a oxidação da D-glicose-6-fosfato para 6-fosfoglicona- $\alpha$ -lactona através da redução simultânea da coenzima NADP<sup>+</sup>. Esta enzima controla a via que tem por principal função produzir NADPH, utilizado na biossíntese e na proteção da célula ao estresse oxidativo, e também na via da síntese de ribonucleotídeos 5-fosforibosil pirofosfato, utilizado na síntese de RNA. Esta via é responsável por aproximadamente 10% do consumo de glicose nos tecidos onde a biossíntese de lipídeos e esteróides tem papel fundamental. BAINY *et al.* (1996) verificaram o efeito de efluentes na represa Billings (São Paulo, SP) em *O. niloticus* (25 °C; pH 7,0) e determinaram níveis diminuídos na atividade da G6PDH, no fígado, rim e brânquias, sendo atribuído ao estresse.

Na SE dos experimentos *in vivo* houve pouca variação na atividade das enzimas nos grupos controle, porém, na presença de cobre em pH 4,5, o aumento da atividade das enzimas regulatórias a 20 °C indica preferência pelo metabolismo oxidativo e, provavelmente, a glicose está sendo utilizada por esta via sendo reforçado com níveis diminuídos de LDH enquanto que em pH 8,0 a 20 °C o aumento na atividade das enzimas HK e LDH sugere preferência pelo metabolismo anaeróbio com a formação de ácido láctico, possivelmente a capacidade de captação de oxigênio está diminuída. O aumento da atividade da LDH pode indicar também aumento da produção de ATP pela via glicolítica. A 30 °C o aumento na atividade da PK e LDH em pH 4,5 e pH 8,0, na presença de cobre, acompanhado de diminuição na atividade das enzimas regulatórias (HK e PFK) indica mobilização da glicose pela via anaeróbia sendo que os níveis de glicose plasmática, aumentaram em pH 4,5. Estes resultados mostram uma correlação entre a temperatura, pH da água e concentração de cobre, sugerindo aumento do fluxo glicolítico suportado pelas enzimas PK e LDH. Além disso, a diminuição na concentração de glicogênio hepático indica que está havendo glicogenólise e o fígado

pode estar exportando glicose para manter os níveis normais de glicose no sangue e em outros órgãos.

Nos experimentos *in vitro* observamos desempenho similar das enzimas determinadas no fígado nos experimentos *in vivo*. O aumento da atividade da HK e da G6PDH e níveis diminuídos de PK e LDH a 20 °C juntamente com níveis diminuídos da HK, PFK, PK, LDH e G6PDH a 30 °C nos grupos controle sugere que o fígado, devido a função primária em regular a concentração de muitos metabólitos, apresentou maior sensibilidade em relação a temperatura e pH e mesmo com aumento da temperatura a atividade das enzimas não aumentou. O cobre, a 20 °C, induziu aumento na atividade da HK e da PK e manteve constante a atividade da PFK enquanto que a 30 °C a atividade das enzimas foi aumentada, sugerindo que a capacidade glicolítica do tecido pode aumentar na presença do metal levando provavelmente a um estresse no metabolismo.

A diminuição na atividade da PFK, PK, LDH e G6PDH da SE, em controle pH 4,5 a 20 °C é acentuado nos experimentos *in vitro* em *P. scrofa* e somente a atividade da HK manteve-se estável sugerindo depressão metabólica o que pode diminuir a taxa glicolítica. A atividade diminuída da LDH e da G6PDH em pH 8,0 e aumento da atividade da HK juntamente com níveis estáveis da PFK e PK indicam que o metabolismo do animal pode ser mantido pela via aeróbia, nestes grupos. A 30 °C as enzimas PFK e LDH mantiveram-se estáveis, aparentemente sem influência do pH e as enzimas HK, PK e G6PDH apresentaram níveis diminuídos demonstrando não haver preferência no metabolismo. Nossos resultados mostram que a atividade destas enzimas foi dependente da temperatura e do pH. O cobre induziu aumento na atividade das enzimas regulatórias e associadas da SE, em pH 4,5 a 20 °C, mostrando uma resposta contrária ao observado em controle enquanto que em pH 8,0, a PFK manteve-se sem alteração com aumento na atividade das demais enzimas, exceto para a HK, sugerindo estímulo do metabolismo anaeróbio e em relação ao experimento *in vivo* observamos a mesma resposta. O cobre estimulou a atividade da HK e da PK, em pH 4,5 a 30 °C, inibiu a atividade da PFK e a atividade da LDH foi mantida estável sustentando a utilização da glicose por anaerobiose enquanto que em pH 8,0, provavelmente, prevaleceu o uso da glicose por aerobiose sustentada pelo aumento da atividade das enzimas regulatórias com diminuição da LDH. Estes resultados sugerem que estas enzimas podem ser estimuladas *in vivo* entretanto, nos experimentos *in vivo* exceto para

a atividade da PK e da LDH que tiveram níveis altos a 30 °C, as demais enzimas não aumentaram a atividade na SE. Este comportamento pode ser um possível caminho na qual a glicólise anaeróbia pode ser favorecida em ambientes que apresentam condições desfavoráveis e tanto a via aeróbia como a anaeróbia foram estimuladas garantindo ao animal suporte de energia para manutenção dos processos fisiológicos. HILMY *et al.* (1985) em sangue de *Mugil cephalus* expostos ao cádmio (28 mg.L<sup>-1</sup>) *in vitro*, verificaram inibição na atividade da LDH.

Em relação à concentração de glicose no plasma de peixes nossos resultados corroboram com os de LAURÉN & McDONALD (1985) que verificaram em *Oncorhynchus mykiss* aumento na concentração de glicose e amônia no plasma após exposição ao cobre sendo que os níveis de glicose e amônia apresentaram correlação com a concentração de cobre após 24 h de exposição. BROWN *et al.* (1990) que verificaram o efeito do pH (4,7-5,6) em *Salmo salar* observaram aumento na concentração de K<sup>+</sup> e glicose no plasma, atribuindo este aumento na tentativa do animal em manter a concentração do líquido extracelular e também na manutenção do metabolismo de carboidratos. TÓTH *et al.* (1996) observaram aumento na concentração de glicose em *Cyprinus carpio* expostas ao cobre (10 mg/dm<sup>3</sup>; 18-20 °C, pH 7,8) e BEAUMONT *et al.* (2000) verificaram o efeito do cobre (0,08 µMol.L<sup>-1</sup> – 96h) associado ao pH ácido (5,0) em *Salmo trutta* observaram hiperglicemia destes animais atribuída à demanda de energia causada pelo pH ácido e pelo cobre. ALMEIDA *et al.* (2001) verificaram o efeito do cádmio (320-2560 µg.L<sup>-1</sup>, 25°C; pH 7,8) em *Oreochromis niloticus* e observaram que a concentração de glicose aumentou com o aumento da concentração de cádmio no músculo branco. VARANKA *et al.* (2001) verificaram o efeito do cobre (10mg.kg<sup>-1</sup> de peso seco, 13 °C; pH 7,0) em *C. carpio* e também observaram aumento na concentração de glicose no plasma.

Nos animais, o glicogênio é armazenado principalmente no fígado e no músculo esquelético servindo como fonte de energia para a contração. No fígado, o papel primário do glicogênio é a manutenção da concentração de glicose sanguínea. Segundo MOON & FOSTER (1995) o conteúdo de glicogênio hepático varia grandemente nos peixes. *O mykiss* apresentou valores de 35 a 2000 µmol unidades glicosil.g de tecido; *Carassius carassius* foi acima de 20.000 µmol.100g<sup>-1</sup> do peso do corpo (4% do peso). Enquanto que outros teleósteos apresentaram até 1500 µmol.g<sup>-1</sup> do peso do corpo (0,3%). No presente estudo o conteúdo de glicogênio foi de 400 a 600 µmol unidades

glicosil-glicose.g<sup>-1</sup> e de 100 a 300 μmol unidades glicosil-glicose.g<sup>-1</sup>a 20 e a 30 °C, respectivamente. O conteúdo de glicogênio hepático aumentado a 20 °C pode ser devido ao metabolismo diminuído e as diferenças encontradas entre as espécies pode ser atribuída ao procedimento da amostra (metodologia utilizada) e as características das espécies estudadas.

A PFK representa a enzima chave para coordenar mudanças no metabolismo de carboidratos em resposta à mudanças no estado fisiológico dos animais. Os mecanismos desta mudança incluem a fosforilação reversa da enzima como também modificação dos níveis de ativadores alostéricos da PFK (BROOKS & STOREY, 1988). A PFK é uma enzima regulatória da via glicolítica e dependente de ATP. A atividade da PFK pode limitar o fluxo metabólico através da glicólise. Sabe-se que algumas espécies de peixes compensam a atividade metabólica em temperaturas baixas aumentando a atividade de algumas enzimas (HOCHACHKA & SOMERO, 1968) no entanto, a 20 °C a atividade das enzimas estudadas no presente trabalho está diminuído sugerindo que o cobre pode ter inibido a atividade destas enzimas (PFK e LDH). Estes resultados permitem inferir sobre o estado fisiológico deste órgão, tanto a via aeróbia com a anaeróbia estão diminuídas e a glicose pode estar sendo utilizada como fonte de energia para processos de desintoxicação (síntese de MT) para manutenção da integridade metabólica. *S. trutta*, expostas ao cobre em pH 5,0 (0,08 μMol.L<sup>-1</sup>; 10 °C) não mostrou alteração na atividade da PFK no músculo branco e vermelho (BEAUMONT, 2000). Em *O. niloticus* expostos ao cádmio (320 a 2560 μg.L<sup>-1</sup>; 25 °C; pH 7,8) a atividade da PFK diminuiu no fígado e músculo branco e aumentou no músculo vermelho (ALMEIDA *et al.*, 2001). Segundo HEATH (1995) o cobre causa diminuição nos níveis de ATP no fígado de peixes, atribuindo talvez à demanda de energia neste tecido presumivelmente devido a processos de desintoxicação.

Em nossos resultados a atividade da LDH foi mais alta a 20 °C no fígado em todos os tratamentos *in vivo* exceto na presença de cobre em pH 4,5 enquanto que, nos experimentos *in vitro* a atividade manteve-se estável. A 30 °C esta enzima teve a atividade diminuída nos estudos *in vivo* enquanto que na presença de cobre, nos estudos *in vitro*, foi mais alta demonstrando preferência pelo metabolismo anaeróbio neste órgão. A mudança na atividade da LDH, envolvida na produção de energia, pode estar relacionada com a ativação de mecanismos celulares, devido a ação do cobre, e deste modo prevenir a quebra do metabolismo oxidativo.

O aumento na atividade da LDH foi observado também por HILMY *et al.* (1985) em fígado, coração e brânquias de *Mugil cephalus* expostos ao cádmio ( $28 \text{ mg.L}^{-1}$ ), TÓTH, *et al.* (1996) em *C. carpio* expostas ao íon cobre ( $10 \text{ mg/dm}^3$ ;  $18\text{-}20 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,8), *O. niloticus* expostos ao cádmio ( $320 \text{ a } 2560 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pH 7,8) durante 7 dias, no músculo vermelho e nenhuma alteração no fígado e no músculo branco (ALMEIDA *et al.*, 2001).

Resultados diferentes foram observados por ANTOGNELLI *et al.* (2003) em *Sparus auratus* expostos ao cobre ( $0,1\text{-}0,5 \text{ ppm}$ ;  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) que verificaram diminuição na atividade da LDH no fígado destes animais. Relatos sobre o efeito de outros metais na atividade da LDH são os de GILL *et al.* (1990) em *Puntius conchoniis*, expostos ao mercúrio ( $181 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ;  $17 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pH 7,1) que mostraram aumento da atividade da LDH nos músculos cardíaco e esquelético e diminuição no fígado e brânquias, apesar de não ter sido significativa enquanto que em *Carassius auratus* e *Perca flavescens*, expostos ao mercúrio ( $0,25 \text{ e } 30 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ;  $17 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pH 5,7) mostraram diminuição na atividade da LDH no músculo e no fígado, não sendo observado alteração na atividade da PK (NICHOLLS *et al.*, 1989).

A LDH é fundamental em processos envolvendo o metabolismo glicídico. Essa enzima catalisa a interconversão do lactato a piruvato, com suporte coenzimático do sistema  $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$  sendo essencial para o suprimento de  $\text{NAD}^+$  para a reação acoplada da gliceraldeído fosfato desidrogenase, e desta forma, direcionar a finalização aeróbia ou anaeróbia da via glicolítica, frente às necessidades metabólicas do tecido.

O cobre, nos experimentos *in vitro*, estimulou a atividade de todas as enzimas analisadas no fígado, com exceção da PFK, sendo este efeito independente da temperatura demonstrando que a glicólise anaeróbia pode prevalecer como estratégia do animal para manutenção de energia no fígado.

Alguns trabalhos relataram o efeito de metais *in vitro* porém em relação aos peixes poucos descrevem a ação dos metais na atividade de enzimas. HILMY *et al.* (1985) verificaram inibição na atividade da LDH em fígado, coração e brânquias de *Mugil cephalus* expostos ao cádmio ( $28 \text{ mg.L}^{-1}$ ), *in vitro*. ISANI *et al.* (1994) verificaram inibição da atividade da PK no fígado e no músculo de *Dicentrarchus labrax* L. após adição *in vitro* de cobre e zinco ( $0,2 - 5,0 \text{ mM}$ ), estes autores verificaram também que o fígado foi mais sensível ao cobre. Estes resultados demonstram a complexidade das respostas enzimáticas. Segundo VOGIATZIS & LOUMBOURDIS (1999) os metais

como cádmio, cobre e mercúrio podem interferir no metabolismo celular imitando a ação de cátions divalentes, especialmente o cálcio, que são utilizados na ativação ou inibição de várias enzimas.

A elevação da temperatura resulta no aumento da taxa metabólica, em peixes, de acordo com a temperatura do corpo, entretanto, no presente estudo, a exposição de *P. scrofa* ao pH baixo e alto em concentrações de cobre correspondentes a CL<sub>50</sub>-96h pode explicar em parte a diminuição da atividade de algumas enzimas (PFK, PK e LDH) a 30 °C uma vez que a velocidade das reações químicas, especialmente as reações enzimáticas, são altamente dependentes da temperatura.

Em relação as enzimas determinadas no fígado, existe tendência a uma maior sensibilidade aos efeitos do cobre e do pH a 30 °C levando a ajustes bioquímicos e fisiológicos. As respostas são imediatas e incluem ativação da glicólise anaeróbia e provavelmente a quebra de creatina fosfato com aumento da produção de ATP, no músculo, ao mesmo tempo em que a fosforilação oxidativa pode estar limitada devido a indisponibilidade de oxigênio.

A depressão metabólica é um fator chave na anaerobiose facultativa, este caminho pode ser feito pelos animais para economizar energia ou reservas energéticas diante de um estresse ambiental. A variação na atividade máxima das enzimas glicolíticas e associadas no fígado e sangue pode estar correlacionado com os diferentes tratamentos e com a função dos tecidos. Estas alterações na atividade podem contribuir para a diminuição no crescimento e também para o acúmulo do metal nos animais. No caso do fígado, a exposição ao cobre levando à mudanças na atividade de algumas enzimas pode sugerir a indução de metalotioninas e/ou outras proteínas que se liguem ao metal.

A falta de correlação, na atividade de algumas enzimas, entre inibição *in vivo* e *in vitro* pode ser explicada por barreiras celular ou de tecido que podem excluir cátions específicos de sítios ativos. A ativação *in vivo* pode ser indiretamente por mecanismo endócrino como em mamíferos, outros mecanismos podem ser postulados como interação entre reguladores e cofatores.

Estudos mais aprofundados são necessários para elucidar o mecanismo de ação dos metais dentro da célula, incluindo a rota de entrada e sua interação com receptores na membrana plasmática. O estudo de atividades enzimáticas e metabólicas dos organismos aquáticos é essencial porque permite compreender os efeitos fisiológicos e

bioquímicos e conseqüentemente inferir as alterações na autoecologia da espécie estudada frente a adição de novos químicos no ambiente aquático ou marinho.

### Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, J.A.; NOVELLI, E.L.B.; DAL PAI SILVA, M.; ALVES JÚNIOR, R. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environ. Pollution.**, v. 114, p. 169-175, 2001.
- ANTOGNELLI, C.; ROMANI, R.; BALDRACCHINI, F.; De SANTIS, A.; ANDREANI, G.; TALESA, V. Different activity of glyoxalase system enzymes in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, v. 142, p. 297-305. 2003.
- 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. **Aquat. Toxicol.**, v. 34. P. 151-162, 1996.
- BEAUMONT, M.W.; BUTLER, P.J.; TAYLOR, E.W. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon muscle metabolism and membrane potential. **Aquat. Toxicol.**, v. 51, p. 259-272, 2000.
- BERGMEYER, H.U. Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weinheim, FRG. 1974.
- BERLIM, M. Mercury. Pp. 503-529. *In*: L. Friberg, G.F. Nordberg & V.B. Voik (ed.) Handbook on the Toxicology of Metals, Chapter 30, Elsevier/North Holland, Amsterdam. 1979.
- BIDINOTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R.H.S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. Boletim Técnico do CEPTA, v.10, p. 53-60, 1997.
- BROOKS, S. P.J.; STOREY, K.B. Subcellular enzyme binding in glycolytic control: *in vivo* studies with fish muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 255, n. 2, p. 289-294, 1988.
- BROWN, S.B.; EVANS, R.E.; MAJEWSKI, H.S.; SANGALANG, G.B. Responses of plasma electrolytes, thyroid hormones, and gill histology in Atlantic salmon (*Salmo salar*) to acid and limed river waters. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 47, p. 2431-2440, 1990.
- BUCHER, T.; PFLEIDERER, G. Pyruvatekinase from muscle. **Meth. Enzym.**, v. 1, p. 435-440. 1955.
- CETESB (1994-2000). Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. CETESB, São Paulo.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J.K.; ROBERTS, P.A.; SMITH, F. Calorimetric methods for determinations of sugars and related substances. **Analytical Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- GILL, T.S.; TEWARI, H.; PANDE, J. Use of fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 97C, n. 2, p. 287-292, 1990.
- HEATH, A.G. Water pollution and fish physiology. **CRC Press**, Lewis Publishers, 2<sup>a</sup> ed. 1995.
- HILMY, A. M.; SHABANA, M.B.; DAABEES, A.Y. Effects of cadmium toxicity upon the *in vivo* and *in vitro* activity of proteins and five enzymes in blood serum and tissue homogenates of *Mugil cephalus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 81C, n. 1, p. 145-153. 1985.
- HOCHACHKA, P.W.; SOMERO, G.N. The adaptation of enzymes to temperature. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 27, p. 659-668, 1968.

- HOCHACHKA, P.W.; SOMERO, G.N. Strategies of Biochemical Adaptations. W.B. Saunders, Philadelphia, PA. 1985.
- ISANI, G.; CATTANI, O.; CARPENÈ, E.; CORTESI, P. Kinetic properties of liver and muscle pyruvate kinase of a marine teleost, sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 107B, n. 4, p. 617-624, 1994.
- LAURÉN, D.J.; McDONALD, D.G. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* RICHARDSON. **J. Comp. Biochem. Physiol.**, v. 155B, p. 635-644, 1985.
- LAYZER, R.B.; ROWLAND, L.P.; BANK, W.J. Physical and kinetic properties of human phosphofructokinase from skeletal muscle and erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 3823-3831, 1969.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-276, 1951.
- MANAHAM, S.E. Water pollution. **Environ. Chem.**, 5<sup>a</sup> ed. Lewis Publishers, Inc. 1991.
- MOON, T.W.; FOSTER, G.D. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: P.W. Hochachka & T.P. Mommsen (eds.), *Metabolic Biochemistry*, v.4. Elsevier Science B.V., 1995.
- NICHOLLS, D.M.; TEICHERT-KULISZEWSKA, K.; GIRGIS, G.R. Effect of chronic mercuric chloride exposure on liver and muscle enzymes in fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 94 C, n.1, p. 265-270, 1989.
- NIKKILA, A.; HYVARIWEN, H. Specific determination of blood glucose with o-toluidina. **Clin. Chim. ACTA**, v. 7: p. 140-143. 1962.
- OZERNYUK, N.D.; KLYACHKO, O.S.; POLOSUKHINA, E.S. Acclimation temperature affects the functional and structural properties of lactate dehydrogenase from fish (*Mysgurnus fossilis*) skeletal muscles. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 107B, n.1, p. 141-145, 1994.
- ROSA, R.; ROSA, C.D.; OCAMPOS, D.; BACILA, M. The profile of the glycolytic system and the metabolic activity of chicken erythrocytes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 75B, n. 1, p. 141-145, 1983.
- RYU, S.K.; PARK, J.S.; LEE, I.S. Purification and characterization of a copper-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 134C, p. 101-107, 2003.
- SIMKISS, K.; TAYLOR, M.; 1981. Cellular mechanisms of metal ion detoxification and some new indices of pollution. **Aquatic. Toxicol.**, v. 1, p. 279-290, 1981.
- SOMERO, G.N. pH-Temperature interactions on proteins: principles of optimal pH and buffer system design. **Mar. Biol. Letters**, v. 2, p. 163-178, 1981.
- TÓTH, L.; JUHÁSZ, M.; VARGA, T.; CSIKKEL-SZOOLNOKI, A.; NEMCSÓK, J. Some effect of CuSO<sub>4</sub> on carp. **J. Environ. Sci. Health., (B)**, v. 31, n. 3, p. 627-635, 1996.
- UYEDA, K.; RACKER, E. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism - VII. Hexokinase and phosphofructokinase. **J. Biol. Chem.**, v. 24, p. 4682-4688, 1965.
- VARANKA, Z.; ROJIK, I.; VARANKA, I.; NEMCSÓK, J.; ÁBRAHÁM, M. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 128C, p. 467-478, 2001.
- VOGIATZIS, A.K.; LOUMBOURDIS, N.S. A study of glycogen, lactate, total fats, protein, and glucose concentration in the liver of the frog *Rana ridibunda*, after exposure to cadmium for 30 days. **Environ. Pollution.**, v. 104, p. 335-340, 1999.

YANCEY, P.H.; SOMERO, G.N. Temperature dependence of intracellular pH: Its role in the conservation of pyruvate apparent  $K_M$  values of vertebrate lactate dehydrogenases. **J. Comp. Physiol.**, v. 125, p. 129-134, 1978.

## CAPÍTULO 5

INDUÇÃO DE METALOTIONINA NO FÍGADO DE *PROCHILODUS SCROFA* APÓS EXPOSIÇÃO AO COBRE: INFLUÊNCIA DO PH E DA TEMPERATURA

## RESUMO

As metalotioninas (MTs) são proteínas de baixo peso molecular que se ligam aos metais e, portanto, têm sido utilizadas como biomarcadores de contaminação ambiental por metais. A metalotionina (MT) foi induzida no fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa* após exposição ao cobre em água com pH 4,5 e pH 8,0 nas temperaturas de 20 e 30 °C. *P. scrofa* jovens foram expostos a concentrações de cobre (CL<sub>50-96</sub> h) em água com pH 4,5 ( $98 \pm 0,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e água com pH 8,0 ( $16 \pm 0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) a 20 °C e em água com pH 4,5 ( $88 \pm 0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e água com pH 8,0 ( $14 \pm 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) a 30 °C. O acúmulo de cobre no fígado foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nos animais expostos ao cobre em relação aos controles e significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nos animais expostos ao cobre em água com pH 8,0 em relação ao pH 4,5 a 30 °C. Em relação as duas temperaturas o acúmulo de cobre foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior na temperatura de 20 °C. Uma proteína de baixo peso molecular ( $< 15$  kDa) ligada ao cobre (MT) foi isolada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose e identificada em SDS-PAGE do fígado de peixes expostos ao cobre em ambos pHs mas não nos grupos controle. A indução da MT foi mais evidente nos animais expostos a baixa concentração de cobre na água (CL<sub>50-96</sub> h em pH 8,0) mostrando uma relação inversa entre concentração de cobre na água e acúmulo de cobre no fígado. A concentração de MT, no fígado, foi significativamente maior em pH 4,5 e pH 8,0 a 30 °C. Nossos resultados indicam que a tomada de cobre pelo animal e as características da água na toxicidade do cobre são os fatores principais na indução de MT no curimatá, e não somente a concentração de metal na água.

## Introdução

O aumento de metais na água induz à síntese de metalotionina (MT), uma proteína citossólica de baixo peso molecular. A MT contém aproximadamente 25-30 % de cisteína na molécula, ausência de aminoácidos aromáticos e histidina. Esta proteína apresenta similaridade na massa molecular, espectro de absorção, ponto isoelétrico e composição de aminoácidos, em diferentes espécies (KITO *et al.*, 1982a; LEY *et al.*, 1983; DUTTON *et al.*, 1993; CANLI *et al.*, 1997; LEUNG & FURNESS, 1999). A MT é o primeiro sistema de defesa da célula contra metais e um marcador bioquímico em potencial na contaminação de metais (OLSVIK *et al.*, 2000; BRAGIGAND & BERTHET, 2003). Os grupos de cisteínas-SH da MT ligam-se aos íons metais dos grupos I-B e II-B da tabela periódica, como  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  prevenindo sua ação tóxica e danos celulares. Dessa forma, a MT contribui para a desintoxicação de metais e, conseqüentemente, aumenta a tolerância dos peixes aos metais (NOEL-LAMBOT *et al.*, 1978; HAMILTON & MEHRLE, 1986; HAO *et al.*, 1993; DUTTON *et al.*, 1993; SCHLENK *et al.*, 1999; AHMAD *et al.*, 2000; CAJARAVILLE *et al.*,

2000; LINDE *et al.*, 2001). Esta proteína (MT) tem sido identificada em vários órgãos de peixes expostos a metais (DANG *et al.*, 1999; AHMAD *et al.*, 2000; OLSVIK *et al.*, 2000; BRAGIGAND & BERTHET, 2003; MAYER *et al.*, 2003) sendo o fígado o órgão no qual tem sido encontrada em concentrações mais altas (KITO *et al.*, 1982 b; AHMAD *et al.*, 2000; OLSVIK *et al.*, 2000).

A contaminação dos ambientes naturais por despejos industriais e a utilização de sulfato de cobre no controle de proliferação de algas e ictioparasitas em piscicultura pode levar a sérios danos nos peixes. Além disso, acidentes ecológicos ocasionais podem agravar este cenário se ocorrerem mudanças drásticas no pH da água, principalmente em ambientes caracterizados por serem pobres em íons e água leve os quais tem baixa capacidade de tamponamento. A temperatura também é um importante fator na toxicidade do metal pois oscilações na temperatura alteram a taxa metabólica de muitos organismos e influenciam na demanda de energia. O efeito da variação da temperatura na toxicidade do metal é complexo, ela pode modificar o grau de letalidade e a biodisponibilidade do metal em determinadas espécies (LEMUS & CHUNG, 1999).

O presente estudo investigou a indução da MT no fígado de *Prochilodus scrofa*, após exposição ao cobre (CL<sub>50</sub>-96 h) em águas com pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C. Esta espécie vive em água leve e pobre de íons e estudos anteriores relataram a baixa tolerância ao cobre (MAZON & FERNANDES, 1999) a qual é afetada pelo pH da água (TAKASUSUKI, 2000; CARVALHO & FERNANDES, 2001) mas alta tolerância a variações de temperatura (BARRIONUEVO & FERNANDES, 1995, 1998; FERNANDES *et al.*, 1995) e variações de pH na água (TAKASUSUKI, 2000).

## Material e Métodos

### *Animais*

Exemplares jovens de *P. scrofa* (W= 15-25g; 10-15 cm) fornecidos da Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da Hidroelétrica de Furnas, Furnas, MG, Brasil, foram mantidos em tanques de 1.000 L a 25 ± 1 °C com fluxo contínuo de água (pH = 7,3 ± 0,2; condutividade = 8,3 ± 0,3 µS e dureza = 24,5 ± 0,2 mg L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>) e aeração constante (100 % de saturação de O<sub>2</sub>) durante 30 dias. Após aclimação ao laboratório dois tanques com 500 animais cada foram utilizados para a aclimação a 20 °C e a 30 °C. A temperatura da água foi diminuída ou aumentada em 1 °C a cada dois dias até chegar a 20 °C ou 30 °C com auxílio de um resfriador de líquidos (RT 20.00)

ligado a um controlador de temperatura (termostato FULL GAUGE) ou um aquecedor (2000 W) conectado a um termostato e então os peixes foram mantidos nesta temperatura por 30 dias até o início dos experimentos. As características físicas e químicas da água foram as mesmas descritas acima exceto para a temperatura. O fotoperíodo do laboratório foi de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para esta espécie. O pH, dureza e alcalinidade da água foram similares aos encontrados para *P. scrofa* em seu habitat natural e a temperatura representa a média mínima e máxima dos valores durante o inverno e verão (CETESB 1994-2000).

### *Procedimento Experimental*

Foram utilizados aquários de vidro com capacidade de 200 L de água e 8 exemplares de *P. scrofa* distribuídos aleatoriamente em cada aquário de forma a não ultrapassar o máximo de 1 g de peixe L<sup>-1</sup>. A água dos aquários dos grupos controle (sem cobre) foi ajustada para pH 4,5 (n = 8) e pH 8,0 (n = 8). Na água dos aquários dos grupos expostos ao cobre foi adicionado cobre e o pH ajustado para 4,5 (três aquários, n = 8 em cada aquário) e 8,0 (três aquários, n = 8 em cada aquário) em ambas as temperaturas. A concentração de cobre (CL<sub>50</sub>-96 h) adicionada em cada aquário em água com pH 4,5 foi  $98 \pm 0,9 \mu\text{g.L}^{-1}$  e em água com pH 8,0 de  $16 \pm 0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  a 20 °C e em água com pH 4,5 foi de  $88 \pm 0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$  e em água com pH 8,0 de  $14 \pm 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  a 30 °C para *P. scrofa* (CARVALHO & FERNANDES, 2001). A temperatura da água dos aquários foi mantida a 20 e 30 °C.

As características físicas e químicas da água dos aquários de todos os grupos foram mantidas constante durante o experimento e foram as mesmas durante o período de aclimação (exceto o pH e a concentração de cobre nos grupos expostos ao cobre). O cobre (agente químico – íon Cu) foi adicionado à água na forma de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) e a concentração de cobre na água foi medida por espectrofotômetro de absorção atômica. Não foi detectado cobre na água dos aquários dos grupos controle. O pH foi ajustado para 4,5 com a adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado e para 8,0 com a adição de hidróxido de sódio (NaOH) 2,0 M. Após a mudança do pH, as temperaturas foram estabilizadas em 20 e 30 °C antes da transferência dos animais para os aquários.

Após 96 h nos aquários experimentais os animais sobreviventes dos grupos controle e grupos expostos ao cobre em água com pH 4,5 e 8,0 foram sacrificados por secção da

medula, o fígado foi dissecado e lavado em tampão Tris- HCl 10 mM (pH 7,4) a 4 °C. Amostras de fígado foram utilizadas para determinação de acúmulo de cobre e determinação da MT. Para a determinação da MT o fígado foi homogeneizado em tampão Tris- HCl 10 mM (pH 7,4) na proporção de 3 volumes de tampão para 1g de fígado em homogenizador do tipo Potter-Elvehjem. O homogenado foi centrifugado a 13,500 Xg (HERMLE Z 323 K) durante 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da MT e proteína total.

#### *Acúmulo do cobre no fígado*

O fígado dos animais dos grupos controle e grupos expostos ao cobre em água com pH 4,5 e 8,0 foram pesados e secados a 60 °C até o peso manter-se constante. Os tecidos foram digeridos em mistura de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1) a 60 °C e a análise do acúmulo de cobre foi efetuada utilizando-se o espectrofotômetro de absorção atômica (AA 12/1475 GEMINI).

#### *Determinação da metalotionina na fração citossólica em Sephadex G-75*

A MT foi determinada de acordo com o método descrito por AHMAD *et al.* (2000), com algumas modificações. Alíquota de 1 a 1,4 mL do sobrenadante do homogeneizado de fígado dos grupos controle e expostos ao cobre em pH 4,5 e 8,0 foi adicionada individualmente à uma coluna (2,5 x 40 cm) de Sephadex G-75 (Sigma) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,44. A coluna de Sephadex G-75 foi eluída com o mesmo tampão e o fluxo ajustado para 1 mL/1 minuto a 25 °C com auxílio de um coletor de frações. As frações coletadas foram de 2 mL e a absorbância de cada fração foi lida em 280 nm em espectrofotômetro (GENESYS 5). As frações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 5 e 15 %, a 120 V, 23 mA, durante 2 horas como descrito por LAEMMLI (1970), corado com Comassie Blue R-250 0,15 % e descorado em solução de metanol e ácido acético glacial. A concentração de proteína foi determinada pelo método de LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se como padrão protéico a albumina sérica bovina. A concentração de cobre de cada fração foi determinada diretamente em espectrofotômetro de absorção atômica AA 12/1475 GEMINI.

#### *Isolamento da metalotionina*

As frações proteicas de baixo peso molecular (Sephadex G-75) do extrato de fígado dos grupos controles e expostos ao cobre em água com pH 4,5 e pH 8,0 foram aplicadas em coluna (0,7 x 2,5 cm) de DEAE-Sepharose (Sigma) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,44 em fluxo 1 mL/1 minuto a 25 °C com auxílio de um coletor de frações. A absorbância das frações foram lidas a 280 nm até que a leitura não mais indicasse a presença de proteína. A MT foi eluída em um gradiente linear de NaCl 0,5 M e o espectro de absorbância da proteína eluída foi determinado a 210-350 nm em cubetas de quartzo.

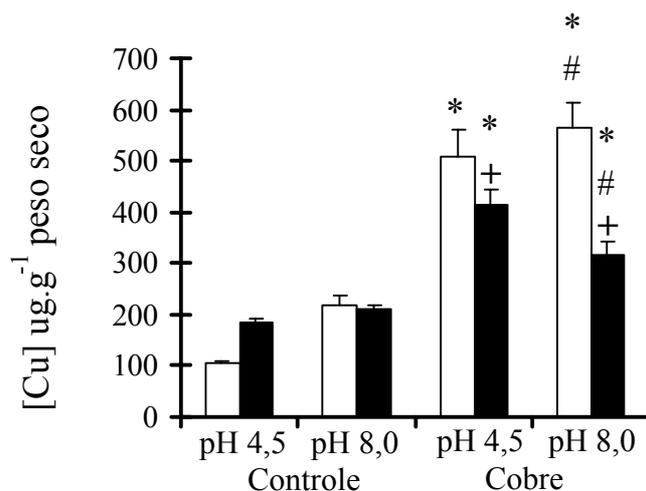
As frações coletadas foram aplicadas em eletroforese de gel de poliacrilamida sódico dodecyl sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) 5 e 15 %. A concentração de cobre das frações foi determinada diretamente em espectrofotômetro de absorção atômica AA 12/1475 GEMINI.

#### *Análise Estatística*

Os dados de acúmulo de cobre no fígado e concentração de metalotionina estão apresentados como média  $\pm$  SEM. Os dados foram analisados aplicando-se ANOVA para verificar se havia diferença entre os tratamentos e teste de Tukey com 95 % de limite de confiança quando as médias dos dados foram significativas. Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa software InStat for Windows (GraphPads software, San Diego, CA).

### **Resultados**

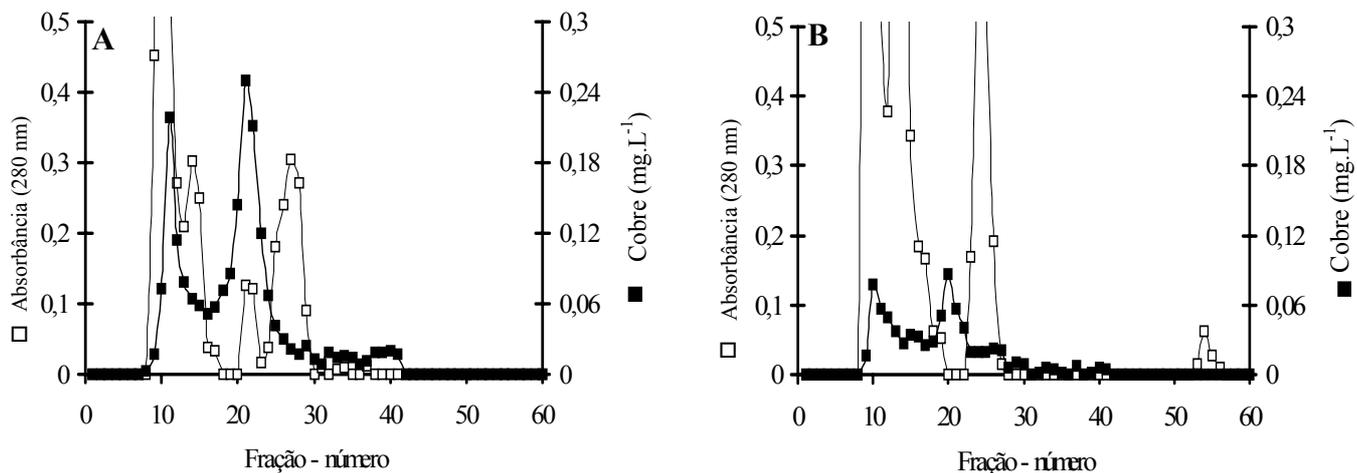
Nenhum peixe dos grupos controle morreu. A porcentagem de peixes sobreviventes dos grupos expostos ao cobre (CL<sub>50</sub>-96h) em água com pH 4,5 e pH 8,0 a 20 °C foi de 48 e 52 %, respectivamente e a 30 °C de 50 e 46 %, respectivamente. Na temperatura de 20 °C não houve diferença significativa no acúmulo deste metal em relação a variação de pH, no entanto, entre as temperaturas, houve maior acúmulo de cobre nos animais a 20 °C. Nos animais expostos ao pH 8,0, o acúmulo de cobre, foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que os animais expostos ao pH 4,5 a 30 °C (Fig. 1).



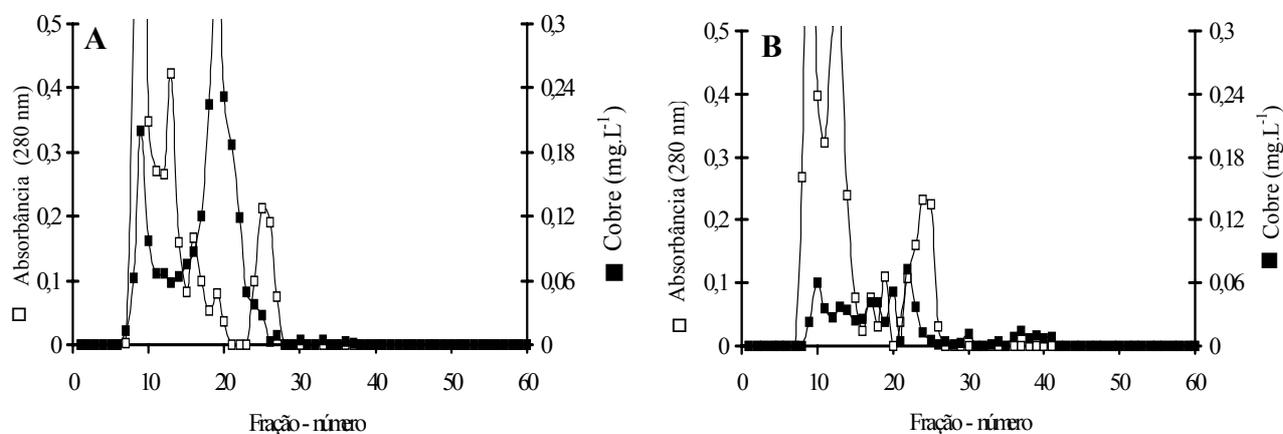
**Figura 1.** Acúmulo de cobre no fígado ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  peso seco) de *P. scrofa* dos grupos controles e dos grupos expostos ao cobre a 20 (colunas claras) e 30 °C (colunas escuras) ( $n=6$  em cada grupo). \* $P < 0,05$  em relação aos seus controles - pH 4,5 e pH 8,0; # $P < 0,05$  em relação ao cobre - pH 4,5 e pH 8,0; +  $P < 0,05$  em relação a temperatura.

#### *Metalotionina na fração solúvel de fígado*

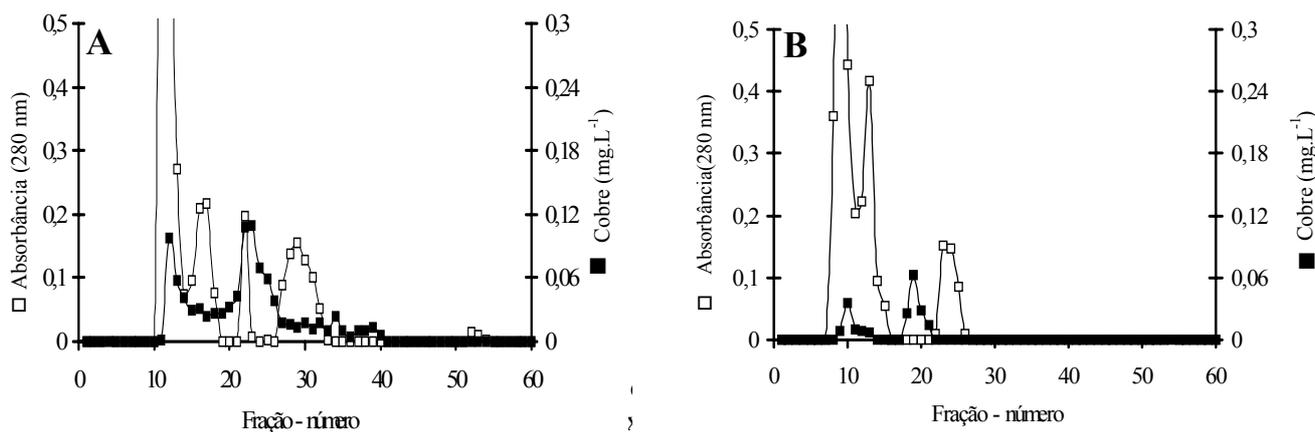
Amostras de fígado de *P. scrofa* dos grupos expostos ao cobre (CL<sub>50</sub>–96h) em água com pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e 30 °C foram aplicadas em coluna de Sephadex G-75 e a concentração de cobre determinada em cada fração é mostrada nas Figuras 2, 3, 4 e 5. Vários picos de proteína foram observados nestas frações mas somente os picos das frações 21 e 22 das amostras de fígado dos animais expostos ao cobre em água com pH 4,5 a 20 °C (Fig. 2A), frações 18, 19 e 20 das amostras de fígado dos animais expostos ao cobre em água com pH 8,0 a 20 °C (Fig. 3A), fração 22 da amostra de fígado dos animais expostos ao cobre em água com pH 4,5 a 30 °C (Fig. 4A) e frações 18, 19 e 20 das amostras de fígado dos animais expostos ao cobre em água com pH 8,0 a 30 °C (Fig. 5A) corresponderam a proteína de baixo peso molecular (MT) e na leitura de cobre exibiram alta concentração deste metal. As frações de proteína reveladas em SDS-PAGE das frações descritas acima confirmaram a presença da proteína de baixo peso molecular (MT) cuja massa molecular foi menor do que 15 kDa (Figs. 6A e C e 7A e C). O padrão proteico do fígado foi o mesmo independente do pH da água na qual os animais foram submetidos. Entretanto, houve uma maior intensidade na proteína de baixo peso molecular em peixes expostos ao cobre em água com pH 4,5 e 8,0 a 20 °C e pH 8,0 a 30 °C (Fig. 6A e C; 7C).



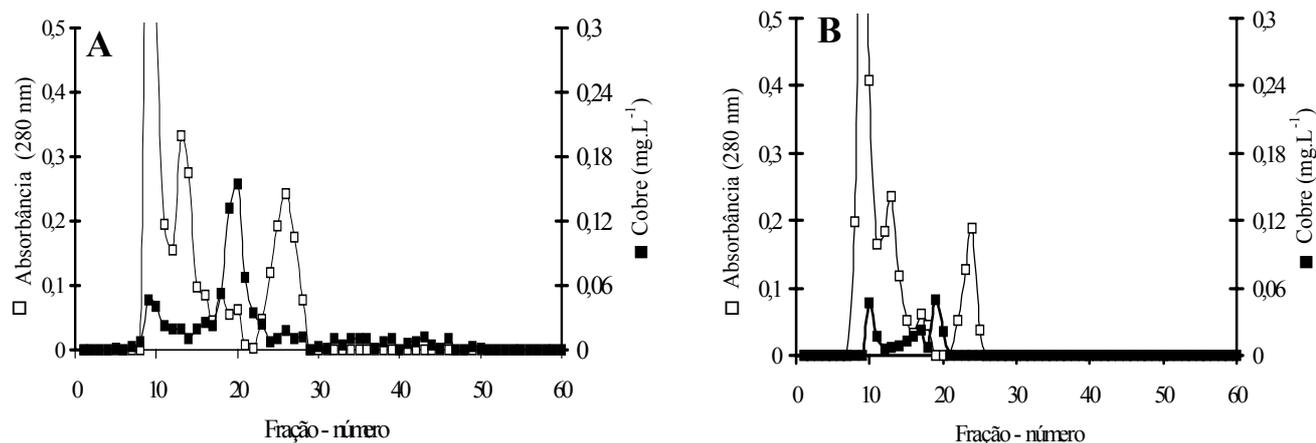
animais controle. A tração de proteína foi eluída com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,44.



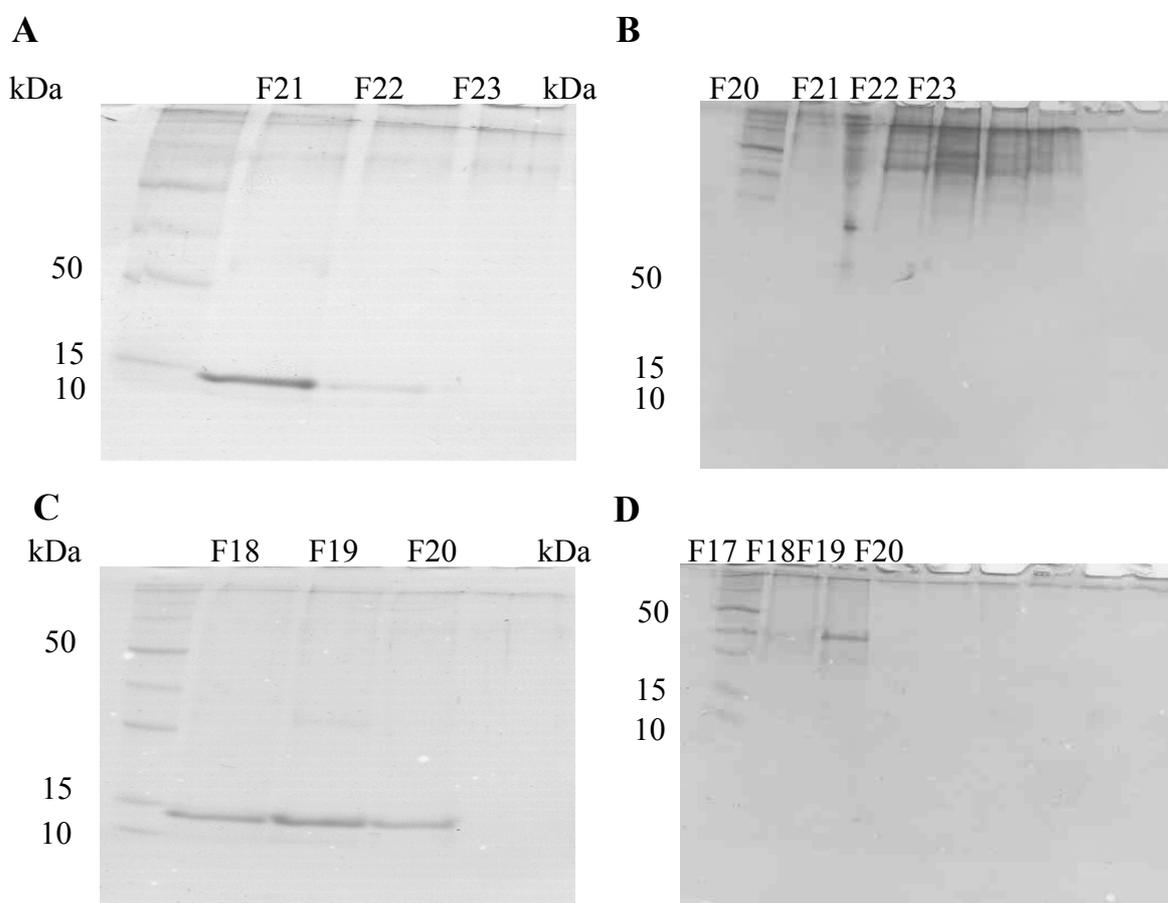
animais controle. A tração de proteína foi eluída com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,44.



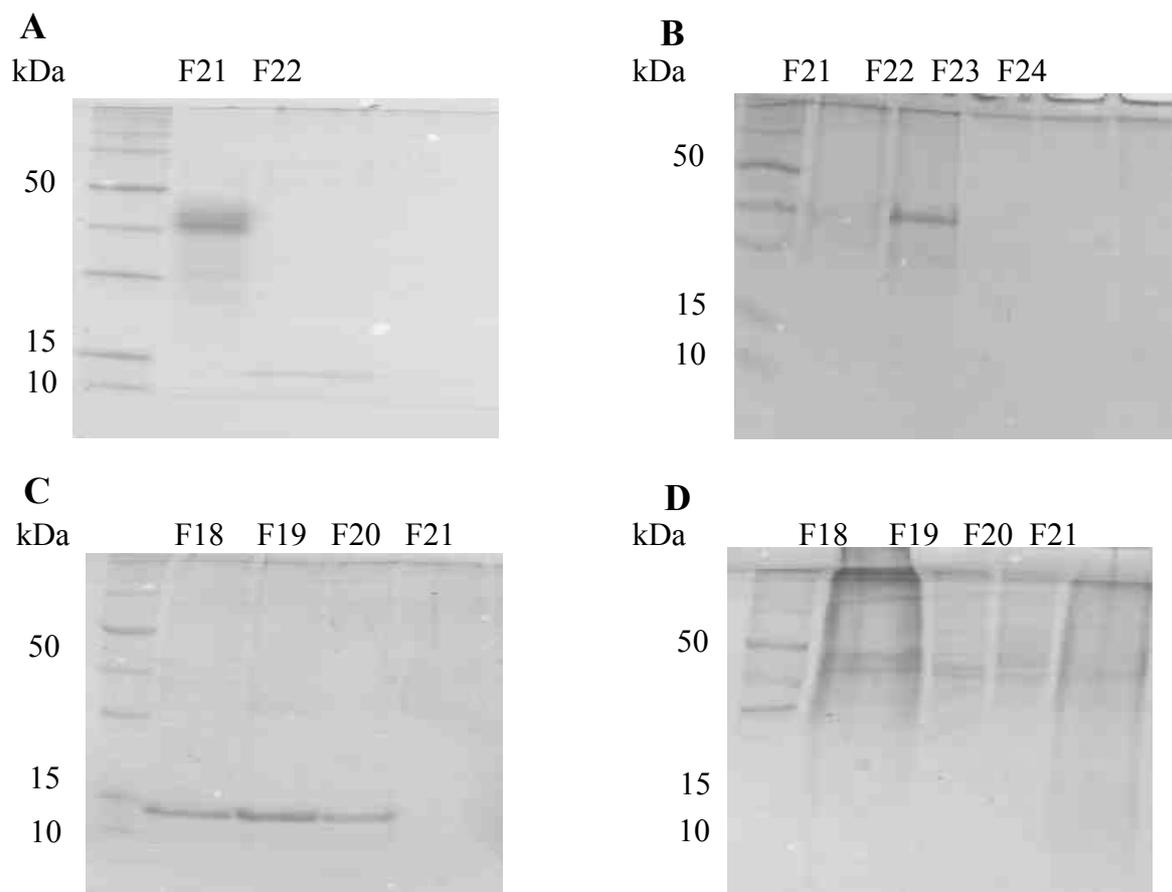
animais controle. A tração de proteína foi eluída com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,44.



**Figura 5.** Perfil cromatográfico da fração citosólica do fígado de peixes expostos ao cobre em pH 8,0 – 30 °C (CL<sub>50</sub>-96h) purificada da coluna de Sephadex G-75; (A) animais expostos ao cobre; (B) animais controle. A fração de proteína foi eluída com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,44.



**Figura 6.** Purificação da MT do fígado de curimatá, expostos ao cobre em pH 4,5 (A) e controle pH 4,5 (B); exposto ao cobre em pH 8,0 (C) e controle pH 8,0 (D) a 20 °C, parcialmente purificada em gel de filtração Sephadex G-75. O marcador de massa molecular – PMM (225, 50,100,75,50,35,25,15 e 10 KDa) foi aplicado na primeira coluna.



**Figura 7.** Purificação da MT do fígado de curimatá, expostos ao cobre em pH 4,5 (A) e controle pH 4,5 (B); exposto ao cobre em pH 8,0 (C) e controle pH 8,0 (D) a 30 °C, parcialmente purificada em gel de filtração Sephadex G-75. O marcador de massa molecular – PMM (225, 50,100,75,50,35,25,15 e 10 KDa) foi aplicado na primeira coluna.

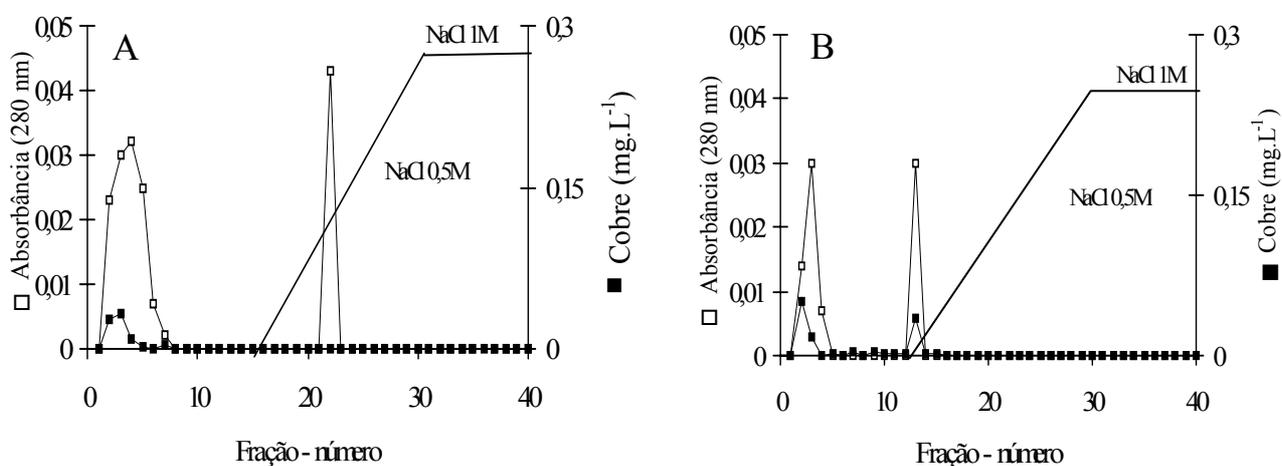
#### *Isolamento da Metalotionina*

Frações da coluna de Sephadex G-75 com alta concentração de cobre foram aplicadas em cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose resultando em dois picos de proteína nos peixes expostos ao cobre em ambos os pH e temperaturas (Figs. 8 e 9). O cobre esteve presente nestas frações como mostrado nas Figs. 8 e 9. A eletroforese em SDS-PAGE mostrou que as frações 4-7 e 2-5 (Figs. 10 A e B) dos animais expostos ao cobre em água com pH 4,5 e 8,0 a 20 °C, respectivamente, e frações 2, 3 e 20 (Fig. 10 C) e 2, 3 e 13 (Fig. 10 C) dos animais expostos ao cobre em água com pH 4,5 e 8,0 a 30 °C, respectivamente, correspondem a MT (massa molecular menor que 15 kDa). A intensidade destas bandas de proteínas de baixo peso molecular foi maior nas frações de peixes expostos ao cobre em água com pH 8,0 nas duas temperaturas estudadas. A fração 20 de proteína (Fig.10 A) dos grupos de peixes expostos ao cobre em água com pH 4,5 a 20 °C não apresentou uma banda correspondente a MT e a fração 22 de

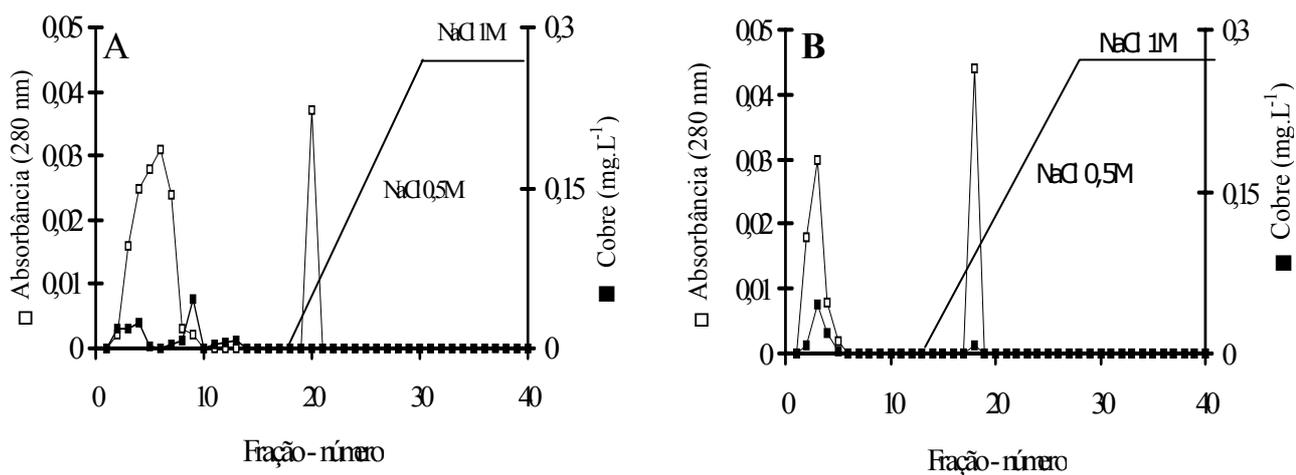
proteína (Fig.10 B) dos grupos de peixes expostos ao cobre em água com pH 8,0 a 20 °C apresentou vários contaminantes proteicos e uma banda correspondente a MT. A fração 20 de proteína (Fig.10 C) dos grupos de peixes expostos ao cobre em água com pH 4,5 a 30 °C não apresentou uma banda correspondente a MT além de apresentar contaminantes proteicos.

Amostras de fígado de *P. scrofa* dos grupos controles em água com pH 4,5 e pH 8,0 fracionados em Sephadex G-75 (Figs. 2B, 3B, 4B e 5B) também apresentaram vários picos de proteína e exibiram perfil proteico similar aos peixes expostos ao cobre porém na análise em SDS-PAGE não foi evidenciado a presença de MT. A concentração de cobre nestas frações foi baixo.

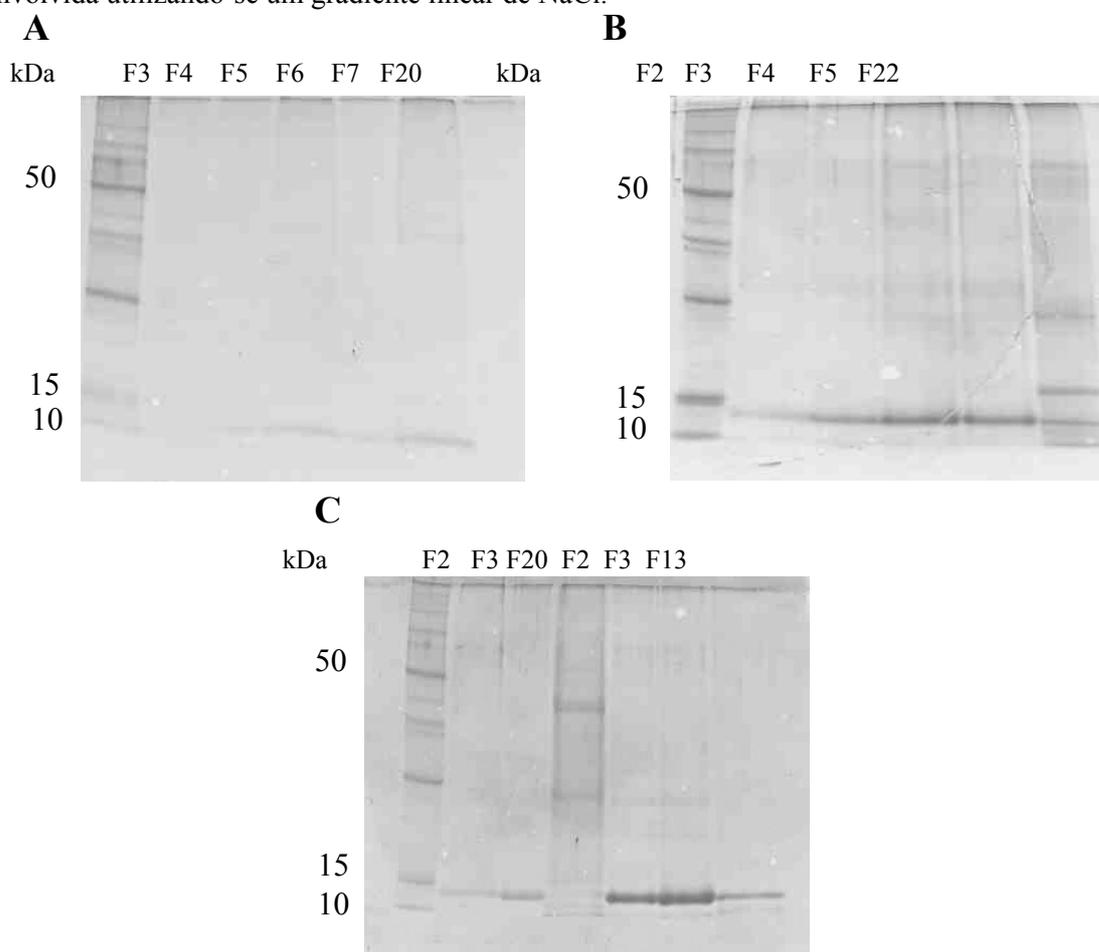
A concentração de proteína purificada da cromatografia de troca iônica – DEAE Sepharose no fígado de *P. scrofa* foi  $126,8 \pm 21,54$  e  $167,4 \pm 25,61$   $\mu\text{g}$  MT/g tecido nos animais expostos ao cobre em pH 4,5 e pH 8,0 a 20 °C, respectivamente, e em pH 4,5 e pH 8,0 a 30 °C foi  $710 \pm 7,9$  e  $1006 \pm 61,20$   $\mu\text{g}$  MT/g tecido, respectivamente não apresentando diferença significativa entre os pHs e temperatura. Entretanto, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na concentração de proteína em relação a temperatura com maior concentração nos animais aclimatados a 30 °C.



**Figura 8.** Perfil cromatográfico da fração citosólica da MT do fígado de curimatá expostos ao cobre em pH 4,5 – 20 °C (A) e 30 °C (B) (CL<sub>50</sub>-96h) purificada da coluna de DEAE-Sepharose. A eluição foi desenvolvida utilizando-se um gradiente linear de NaCl.



**Figura 9.** Perfil cromatográfico da fração citosólica da MT do fígado de curimatá expostos ao cobre em pH 8,0-20 °C (A) e 30 °C (B) (CL<sub>50</sub>-96h) purificada da coluna de DEAE-Sepharose. A eluição foi desenvolvida utilizando-se um gradiente linear de NaCl.



**Figura 10.** Purificação da MT do fígado de curimatá em DEAE-Sepharose, expostos ao cobre em pH 4,5 (A) e 8,0 (B) – 20 °C e expostos ao cobre em pH 4,5 e 8,0 – 30 °C (C). O marcador de massa molecular – PMM (225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15 e 10 KDa) foi aplicado na primeira coluna.

## Discussão

Nossos resultados evidenciam um aspecto importante relacionado ao efeito do pH na toxicidade do cobre e indução da MT. O efeito do pH na toxicidade do cobre ( $CL_{50-96h}$ ) em peixes depende da biodisponibilidade do íon metal na água (STUMM, & MORGAN, 1981). Entre as espécies dominantes de cobre ( $Cu^{2+}$ ,  $CuHCO_3^+$ ,  $CuCO_3$ ,  $Cu(OH)_2$ ), detectadas na água inspirada em peixes, a concentração de íon cobre livre ( $Cu^{2+}$ ), a espécie química mais tóxica, é a forma dominante (acima de 80%) em pH 6,0 ou abaixo deste valor enquanto que em água com pH 8,0 a forma  $Cu(OH)_2$  é a espécie química dominante (90%) (TAO *et al.*, 2001). Alguns trabalhos relatam que a toxicidade do cobre é mais alta em pH baixo entretanto, a toxicidade do cobre para *P. scrofa* foi menor em pH baixo como evidenciado pela  $CL_{50-96h}$  em pH 4,5 ( $98 \pm 0,9 \mu gCu L^{-1}$  a 20 °C e  $88 \pm 0,8 \mu gCu L^{-1}$  a 30 °C) e cerca de 6 vezes mais alta do que em água com pH 8,0 ( $16 \pm 0,2 \mu gCu L^{-1}$  a 20 °C e  $14 \pm 0,5 \mu gCu L^{-1}$  a 30 °C) (CARVALHO & FERNANDES, 2001) sugerindo um acentuado efeito do  $Cu(OH)_2$  nestas espécies. Isto pode estar relacionado com a tomada de cobre pelas brânquias que envolve a ligação do cobre na superfície branquial. A competição do  $H^+$  e do  $Cu^{2+}$  por sítios de ligação do  $Ca^{2+}$  na membrana branquial tem sido proposto como a principal razão para diminuir a toxicidade do cobre em pH baixo (MEADOR, 1991). A concentração reduzida de  $H^+$  e os baixos níveis de  $Ca^{2+}$  em água pobre de íons e água mole favorecem a ligação do  $Cu^{2+}$  na superfície da membrana branquial facilitando a tomada de cobre e, conseqüentemente, aumentando a toxicidade deste metal em água com pH alto.

O maior acúmulo de cobre no fígado de *P. scrofa* expostos ao cobre ( $CL_{50-96h}$ ) em água com pH 8,0 a 20 °C, no presente estudo, juntamente com os resultados de acúmulo de cobre no fígado de *P. scrofa* expostos a  $29 \mu gCu.L^{-1}$  ( $CL_{50-96h}$ , pH 7,3 a 25 °C) (MAZON & FERNANDES, 1999; MONTEIRO, 2001) e expostos a 200 e  $14 \mu gCu.L^{-1}$  ( $CL_{50-96h}$ , pH 4,5 e pH 8,0, respectivamente, a 25 °C) (ARAÚJO *et al.*, dados não publicados) suportam esta hipótese.

Após a exposição ao cobre o maior acúmulo de cobre no fígado foi a 20 °C. Sabe-se que com aumento da temperatura a taxa metabólica também aumenta facilitando a excreção do metal. O acúmulo de metais nos animais depende da concentração, do tempo de exposição, da tomada de metal e da velocidade de excreção sendo estes dois

últimos fatores importantes no acúmulo do metal e evidenciado no presente trabalho a 30 °C, aonde estes efeitos estão acentuados. Entretanto, LEMUS & CHUNG (1999) verificaram maior acúmulo de cobre em *Petenia kraussii* a 30 °C do que a 22 °C. Além disso, nossos resultados mostram que a concentração de MT no fígado dos animais expostos ao cobre a 20 °C foi cerca de 7 vezes menor do que nos animais expostos ao cobre a 30 °C. O efeito observado do cobre neste estudo sugere que este metal interfere diferentemente nos processos fisiológicos, como por exemplo, na regulação de íons, respiração, excreção e processos enzimáticos e que o fígado tem papel fundamental no metabolismo. Neste caso podemos sugerir que a 30 °C o metabolismo do animal está sendo desviado para a síntese de MT na tentativa de diminuir os efeitos do cobre enquanto que em 20 °C, o metabolismo, provavelmente, está baixo diminuindo a excreção do metal. Nossos resultados mostram que a temperatura e a variação do pH influenciaram na tomada de cobre e na indução da MT no fígado de curimatá.

A variação do pH associado a mudanças na temperatura pode levar a mudanças compensatórias na atividade e/ou na concentração de enzimas em peixes. HOCHACHKA & SOMERO (1973) relataram que organismos ectotérmicos, particularmente, peixes, utilizam de estratégias bioquímicas como síntese de MT e alteração na atividade e/ou concentração de enzimas, para manter a homeostase durante oscilações na temperatura, pH, oxigênio dissolvido ou outros fatores fisico-químicos da água.

Os resultados do presente estudo sugerem um acentuado efeito do pH da água na toxicidade do cobre em água com pH 8,0 ( $CL_{50-96h} = 16$  e  $14 \mu\text{gCu.L}^{-1}$  a 20 e 30 °C, respectivamente) e influência da temperatura no acúmulo de cobre no fígado que pode estar relacionado com a tomada de cobre pelas brânquias e velocidade de excreção. Estudos anteriores com esta espécie relatam altos níveis deste metal no fígado quando expostos a  $29 \mu\text{gCu.L}^{-1}$  ( $CL_{50-96h}$  para o cobre, água com pH 7,3; 25 °C) (MAZON & FERNANDES, 1999; MONTEIRO, 2001). A temperatura da água tem efeito menor na  $CL_{50-96h}$  para o cobre como evidenciado por valores na  $CL_{50}$  para o cobre em água com pH 4,5 ( $CL_{50-96h} = 200 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) e pH 8,0 ( $CL_{50-96h} = 0,14 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) a 25 °C (TAKASUSUKI, 2000).

O acúmulo de cobre no fígado de *P. scrofa* coincidiu com a expressão da MT neste órgão em todos os tratamentos. A indução da MT hepática em *P. scrofa* exposto a este metal foi evidenciado pela ligação do cobre a proteínas de baixo peso molecular (ver

Figs. 2-5 e 6-7) e, a ausência desta proteína em peixes de grupos não expostos ao cobre (grupos controles – Figs. 6B e D e 7B e D). O peso molecular da MT hepática do fígado de *P. scrofa* foi menor do que 15 kDa (eletroforese em SDS-PAGE) e similar à massa molecular encontrada em *Channa punctatus* (14.4 kDa) (AHMAD *et al.*, 2000). Em geral, a MT varia de 9-15 kDa nos animais, incluindo os peixes (OLAFSON & THOMPSON, 1974; NOEL-LAMBOT *et al.*, 1978; YAMAMOTO *et al.*, 1978; KITO *et al.*, 1982a; McCARTER *et al.*, 1982; CANLI *et al.*, 1997) entretanto, massa molecular menor para a MT tem sido encontrada em algumas espécies de peixes (HAO *et al.*, 1993; OLSVIK *et al.*, 2000).

Nos animais do grupo controle, a ausência da MT na fração citossólica do fígado não significa que a MT não estava presente em peixes destes grupos mas que o seu nível basal provavelmente estava baixo não sendo possível detectar em gel de filtração Sephadex G-75 e eletroforese em gel de poli(acrilamida) SDS-PAGE.

A indução da MT por exposição ao metal tem sido encontrada mais alta no fígado do que em outros órgãos (OLSVIK *et al.*, 2000); isto pode estar relacionado com a rota de contaminação pelo cobre e desintoxicação. Com exceção dos órgãos que têm contato direto com o cobre, cobre é transportado pela circulação sanguínea para o fígado aonde é metabolizado. O cobre no fígado induz a síntese de MT a qual sequestra o metal prevenindo a sua ação tóxica (McCARTER *et al.*, 1982; KININGHAM & KASARKI, 1998). Conseqüentemente o cobre se acumula no fígado e a sua presença em outros órgãos ocorre somente quando a capacidade de estoque do metal no fígado torna-se saturada. Além disso, a MT parece estar envolvida no transporte intracelular de cobre e zinco participando no metabolismo de metais essenciais (NOEL-LAMBOT *et al.*, 1978; KITO *et al.*, 1982a,b; RÓMEO *et al.*, 1997; CAJARAVILLE *et al.*, 2000; LINDE *et al.*, 2001). A indução da MT simultaneamente com aumento de glicocorticóides, lipopolissacarídeos, interleucina-1 e  $\alpha$ -interferon durante a maturação sexual e condições de estresse fortalece o papel desta proteína na regulação da homeostase de metais (SIMKISS & TAYLOR, 1981; DUTTON *et al.*, 1993; SCHLENK *et al.*, 1999; OLSVIK *et al.*, 2000).

Vários estudos sugerem que a concentração de MT no fígado depende da concentração do metal na água ou no alimento (McCARTER & ROCH, 1983, 1984; OLSVIK *et al.*, 2000). McCARTER & ROCH (1983, 1984) relataram aumento da MT com aumento da concentração de cobre na água. Recentemente, OLSVIK *et al.* (2000)

relataram aumento na indução da MT em *Salmo trutta* de rios contaminados por metais acompanhado de aumento na concentração de metal na água. Entretanto, não foi observado correlação entre a concentração de zinco na água e indução de MT em *Platichthys flesus* de diferentes locais contaminados por metais (OVERNELL & ABDULLAH, 1988).

No presente estudo a indução da MT foi mais evidente em peixes expostos a baixa concentração de cobre na água (CL<sub>50</sub>-96h em pH alto) sendo que a concentração da proteína foi maior a 30 °C. A relação inversa entre a concentração de cobre na água e acúmulo de cobre no fígado, juntamente com a indução de MT hepática a 30 °C confirma que a tomada de metal foi o principal fator para induzir a MT e não somente a concentração de metal na água, no entanto, a 20 °C o acúmulo de cobre foi maior e a concentração da MT foi menor em relação a 30 °C. HOGSTRAND & HAUX (1990), demonstraram que a MT hepática foi rapidamente induzida em duas espécies de peixes, *Haemulon aurolineatum* e *Holocentrus rufus* após injeção intraperitoneal tendo crescente concentração de cádmio e exibiram uma resposta dose-dependente. Estes resultados corroboram com o encontrado no presente estudo a 30 °C.

Em conclusão, nossos resultados mostram a importância da química da água na toxicidade do cobre e evidenciam a dependência da tomada de cobre no animal para a indução da MT e, que a síntese da MT pode conferir aos animais capacidade adicional de sobreviver em ambientes de condições desfavoráveis. Além disso, este estudo sugere que a concentração de cobre na água tem efeito menor no acúmulo do metal no fígado e a temperatura tem influência direta na disponibilidade do metal.

### Referências Bibliográficas

- 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* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1523, p. 37-48, 2000.
- BARRIONUEVO, W.R.; FERNANDES, M.N. Critical thermal maxima and minima for curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner) of two different sizes. **Aquacult. Res.**, v. 26, p. 447-450, 1995
- BARRIONUEVO, W.R.; FERNANDES, M.N. Time-course of respiratory metabolic adjustments of a South American fish, *Prochilodus scrofa*, exposed to low and high temperatures. **J. Applied Ichthyol.**, v. 14, p. 37-41, 1998.
- BRAGIGAND, V.; BERTHET, B. Some methodological aspects of metallothionein evaluation. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 134A, p. 55-61, 2003.

- CAJARAVILLE, M.P., BEBIANNO, M.J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C., VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci. Total Environ.**, v. 247, p. 295-311, 2000.
- CANLI, M., STAGG, R.M.; RODGER, G. The induction of metallothionein in tissue of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* following exposure to cadmium, copper and zinc: the relationships between metallothionein and the metals. **Environ. Pollution**, v. 96, p. 343-350, 1997.
- CARVALHO, C.S., FERNANDES, M.N. Influência do pH e da temperatura na toxicidade do cobre em *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). In. XIV Encontro Brasileiro de Ictiologia, v. 14, 2001.
- CETESB Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. São Paulo, 1992-2000.
- DANG, Z., LOCK, R.A.C., FLIK, G., WENDELAAR BONGA, S.E. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. *Am. J. Physiol.*, v. 77; **Regulatory Integrative Comparative and Physiology**, v. 46, p. 320-331, 1999.
- DUTTON, M.D., STEPHENSON, M., KLAVERKAMP, J.F. Metallothionein in fish. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 12, p. 1193-1202, 1993.
- FERNANDES, M.N.; BARRIONUEVO, W.R.; RANTIN, F.T. Effects of thermal stress on respiratory responses to hypoxia of a South of a American Prochilodontid fish, *Prochilodus scrofa*. **J. Fish Biol.**, v. 46, p. 123-133, 1995.
- HAMILTON, S.T., MEHRLE, P.M. Metallothionein in fish: Review of its importance in assessing stress from metal contaminants. *Transact. American Fish. Soc.*, 115: 596-609, 1986.
- HAO, R., PFEIFFER, R.F., EBADI, M. Purification and characterization of metallothionein and its activation of pyridoxal phosphokinase in trout (*Salmo gairdneri*) brain. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 104B, n. 2, p. 293-298, 1993.
- HOCHACHKA, P.W.; SOMERO, G.N. Strategies of Biochemical Adaptations. W.B. Saunders, Philadelphia, PA. 1973
- HOGSTRAND, C., HAUX, C. Metallothionein as a indicator of heavy-metal exposure in two subtropical fish species. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 138, p. 69-84, 1990.
- KINIGHAM, K.; KASARSKI, E. Antioxidant function of metallothioneins. **J. Trace Elem. Exp. Med.**, v. 11, p. 219-226, 1998.
- KITO, H., OSE, Y., MIZUHIRA, V., SATO, T., ISHIKAWA, T., TAZAWA, T. Separation and purification of (Cd, Cu, Zn) metallothionein in carp hepato-pancreas. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 73C, n. 1, p. 121-127, 1982a.
- KITO, H., TAZAWA, T., OSE, Y., SATO, T., ISHIKAWA, T. Formation of metallothionein in fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.73C, n.1, p. 129-134, 1982b.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEMUS, M.J.; CHUNG, K.S. Effect of temperature on copper toxicity, accumulation and purification in tropical fish juveniles *Petenia kraussi* (Pisces, Cichlidae). **Caribbean Journal of Sciences**, v. 35, n.1,2, p. 64-69, 1999.
- LEUNG, K.M.Y., FURNESS, R.W. Induction of metallothionein in dogwhelk *Nucella lapillus* during and after exposure to cadmium. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 43, p. 156-164, 1999.

- LEY, H.L., FAILLA, M.L., CHERRY, D.S. Isolation and characterization of hepatic metallothionein from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comp. Biochem. Physiol.**, (B), v. 74, n.3, p. 507-513, 1983.
- LINDE, A.R., SÁNCHEZ-GALÁN, S., VALLÉS-MOTA, P., GARCIA-VÁZQUEZ, E. Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 49, p. 60-63, 2001.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-276, 1951.
- MAYER, G.D.; LEACH, A.; KLING, P.; OLSSON, P.; HOGSTRAND, C. Activation of the rainbow trout metallothionein-A promoter by silver and zinc. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 134B, p.181-188, 2003.
- MAZON, A.L., FERNANDES, M.N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 63, p. 797-804, 1999.
- McCARTER, J.A., MATHESON, A. T., ROCH, M., OLAFSON, R.W., BUCKLEY, J.T. Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper - II. Distribution of copper between high and low-molecular-weight proteins in liver cytosol and the possible role of metallothionein in detoxification. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 72C, n.1, p. 21-26, 1982.
- McCARTER, J.A., ROCH, M. Hepatic metallothionein and resistance to copper in juvenile coho salmon. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 74C, n. 1, p. 133-137. 1983.
- McCARTER, J.A., ROCH, M. Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper - III. Kinetics of metabolism of metallothionein. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 77C, n.1, p. 83-87, 1984.
- MEADOR, J.P. The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. **Aquat. Toxicol.**, v. 19, p. 13-32, 1991.
- MONTEIRO, E. Ap. S. Restauração do tecido hepático e metabólitos secundários do fígado e sangue de curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), após exposição aguda ao cobre. Dissertação de Mestrado – UFSCar – São Carlos – S.P., 2001. 94 pg.
- NOEL-LAMBOT, F., GERDAY, C., DISTECHE, A. Distribution of Cd, Zn and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 61C, p. 177-187, 1978.
- OLAFSON, R. W., THOMPSON, J.A.J. Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. **Marine Biology**, v. 28, p. 83-86, 1974.
- OLSVIK, P.A., GUNDERSEN, P., ANDERSEN, R.A., ZACHARIASSEN, K.E. Metal accumulation and metallothionein in two populations of trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments a run-off episode. **Aquat. Toxicol.**, v. 50, p. 301-316, 2000.
- OVERNELL, J., ABDULLAH, M.I. Metallothionein and metal levels in flounder *Platichthys flesus* from four field sites and in flounder dosed with waterborne copper. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 46, p. 71-74, 1998.
- ROMÉO, M., COSSON, R.P., GNASSIA-BARELLI, M., RISSO, C., STIEN, X., LAFAURIE, M. Metallothionein determination in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* treated with copper and B(a)P. **Mar. Environ. Res.**, v. 44, n. 3, p. 275-284, 1997.
- SCHLENK, D., DAVIS, K.B., GRIFFIN, B.R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. **Aquacult.**, v. 177, p. 367-379, 1999.
- SIMKISS, K., TAYLOR, M. Cellular mechanisms of metal ion detoxification and some new indices of pollution. **Aquat. Toxicol.**, v. 1, p. 279-290, 1981.

STUMM, W.; MORGAN, J.J. Aquatic Chemistry. Wiley, New York, N.Y., 780 p., 1981.

TAKASUSUKI, J. 2000. Toxicidade dos íons cobre em curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), em pH 8,0 e 4,5. Tese de Doutorado – UFSCar – São Carlos – S.P., 103 pg.

TAO, S.; WEN, Y. ; LONG, A.; DAWSON, R.; CAO, J.; XU, F. Simulation of acid-base condition and copper especiation in the fish microenvironment. **Comp. Chem.**, v. 25, p. 215-222, 2001.

YAMAMOTO, Y., ISHU, T., IKEDA, S. Studies on copper metabolism in fishes. III. Existence of metallothionein-like protein in carp hepato-pancreas. **Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.**, v. 44, p. 149-153, 1978.

## CAPÍTULO 6

**EFEITOS SOBRE O TECIDO HEPÁTICO EM CURIMBATÁ, *PROCHILODUS SCROFA* APÓS EXPOSIÇÃO AO COBRE: INFLUÊNCIA DO PH E DA TEMPERATURA****RESUMO**

O fígado é o órgão alvo de substâncias tóxicas e tem um papel importante na desintoxicação e excreção de xenobióticos. Dentre os poluentes do meio aquático o cobre, dependendo das características física e química da água, pode ser altamente tóxico para os peixes. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito do cobre no fígado de curimatá *Prochilodus scrofa* em meio aquático com pH 4,5 e 8,0 a 20 e 30 °C. *P. scrofa* jovens foram expostos ao cobre (CL<sub>50</sub>-96 h) em água com pH 4,5 ( $98 \pm 0,9 \mu\text{Cu.L}^{-1}$ ) e água com pH 8,0 ( $16 \pm 0,2 \mu\text{Cu.L}^{-1}$ ) a 20 °C e em água com pH 4,5 ( $88 \pm 0,8 \mu\text{Cu.L}^{-1}$ ) e pH 8,0 ( $14 \pm 0,5 \mu\text{Cu.L}^{-1}$ ) a 30 °C. Houve aumento no número de vasos sanguíneos, desorganização do núcleo, além de necrose nos hepatócitos nos grupos controle a 20 e 30 °C. Em cobre pH 4,5, a 20 e a 30 °C, o citoplasma apresentou desarranjo dos cordões hepáticos, degeneração citoplasmática e nuclear e vacuolização, além do aumento na vascularização do tecido e proliferação de melanomacrófagos. O tecido hepático dos animais expostos ao cobre em pH 8,0 a 20 °C, mostrou vascularização, aumento do volume e frequência dos vasos sanguíneos. De forma geral, em pH 4,5 e 8,0 a 20 °C a degeneração celular e nuclear dos hepatócitos se acentuou, principalmente nos animais expostos ao cobre. Com a determinação do volume dos hepatócitos e seus respectivos núcleos pode-se observar nos animais do grupo controle a 20 e a 30 °C que tanto os hepatócitos quanto os seus núcleos apresentaram-se menores nos grupos controle pH 4,5 e 8,0. Nos animais expostos ao cobre houve um aumento no volume dos hepatócitos e dos núcleos em pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e a 30 °C. Os hepatócitos dos animais expostos ao cobre em pH 4,5 manteve-se com maior volume que os expostos ao cobre em pH 8,0. Quando observou-se a proporção de hepatócitos com relação a outras estruturas como vasos, capilares, ductos biliares, pâncreas e outras estruturas obteve-se resultado semelhante ao encontrado no volume celular, ou seja, a área ocupada pelos hepatócitos em relação à área total diminuiu com a adição do cobre na água e foi mais evidente no pH 8,0. A proporção de capilares nos grupos expostos ao cobre aumentou principalmente nos grupos expostos ao cobre em pH 8,0.

**Introdução**

O fígado é o órgão alvo de substâncias tóxicas e tem um papel importante no metabolismo, armazenamento e excreção de xenobióticos (HINTON & LAUREN, 1990) e portanto, possui alta capacidade de desintoxicação e excreção de metabólitos através da bile (ZABA & HARRIS, 1978; HEATH, 1987). Além disso, o fígado é o local de maior acúmulo de metais pesados em organismos aquáticos devido a produção de metalotionina, proteína que se liga ao metal diminuindo a sua concentração livre no organismo (TORT *et al.*, 1996) (Capítulo 4) e regula a homeostase do cobre (CARPENÈ & VASÀK, 1989; FABBRI *et al.*, 2003). O acúmulo de metais em órgãos como brânquias e rins também são observadas em peixes contaminados, porém em menor

intensidade (PILGAARD *et al.*, 1994; PELGROM *et al.*, 1995; ARELLANO, 1999, MAZON & FERNANDES, 1999; RASHED, 2001, MONTEIRO, 2001; MAZON *et al.*, 2002; CERQUEIRA & FERNANDES, 2002).

As características físicas e químicas da água, como o pH e a temperatura, alteram a toxicidade do metal porque altera a sua espécie química e, portanto a sua biodisponibilidade (TAO *et al.*, 2000, 2001). TAKASUSUKI (2000) estudando o efeito do pH na toxicidade do cobre em *Prochilodus scrofa* a 25°C, verificou que o cobre é mais tóxico em pH alto corroborando com os resultados de CRIST *et al.* (1990). A maior toxicidade do cobre em pH alto, em *P. scrofa*, foi confirmado neste estudo e mostrou ser independente da temperatura ambiente (Capítulo 1).

Considerando que as alterações histopatológicas são um reflexo de alterações bioquímicas e fisiológicas cuja magnitude pode ser suficiente para causar danos celulares, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do pH (4,5 e 8,0) e da temperatura (20 e 30 °C) na histologia no fígado de *P. scrofa* após exposição aguda ao cobre (Cl<sub>50</sub>-96h).

## Material e Métodos

### *Animais*

*P. scrofa*, curimatá (W= 15-25g; L= 10-15 cm) foram obtidos da estação de Hidrobiologia e Aquacultura de Furnas-MG, Brasil e mantidos a em tanques de 1.000 L a 25 ± 1 °C com fluxo contínuo de água (pH = 7,3 ± 0,2; condutividade = 8,3 ± 0,3 µS e dureza = 24,5 ± 0,2 mg L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub>) e aeração constante (100 % de saturação de O<sub>2</sub>) durante 30 dias. Após aclimação ao laboratório dois tanques com 500 animais cada foram utilizados para a aclimação a 20 e a 30 °C. A temperatura da água foi diminuída ou aumentada em 1 °C a cada dois dias até chegar a 20 °C ou 30 °C com auxílio de um resfriador de líquidos (RT 20.00) ligado a um controlador de temperatura (termostato FULL GAUGE) ou um aquecedor (2000 W) conectado a um termostato e então os peixes foram mantidos nestas temperaturas por 30 dias até o início dos experimentos. As características físicas e químicas da água foram as mesmas descritas acima exceto para a temperatura. O fotoperíodo do laboratório foi de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para esta espécie. O pH, dureza e alcalinidade da água foram similares aos encontrados para *P. scrofa* em seu habitat

natural e a temperatura representa a média mínima e máxima dos valores durante o inverno e verão (CETESB 1994-2000).

#### *Procedimento Experimental*

Foram utilizados aquários de vidro com capacidade para 200 L de água e 8 exemplares de *P. scrofa* distribuídos aleatoriamente em cada aquário de forma a não ultrapassar o máximo de 1 g de peixe L<sup>-1</sup>. As condições físico-químicas da água utilizada nos testes como temperatura, fotoperíodo (12 horas) e oxigênio dissolvido (aeração constante) dureza ( $24 \pm 1$  como CaCO<sub>3</sub>) e pH (4,5 ou 8,0, de acordo com o pH teste) foram mantidas constantes durante os experimentos. Foram utilizados aquários nas mesmas condições descrita acima com exceção do pH que foi mantido em pH 7,3 a 20 e a 30 °C, os animais deste grupo serviram como controle dos grupos controle em água com pH 4,5 e água com pH 8,0. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início dos testes e durante os mesmos. O pH foi diminuído com adição de 1,0 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado e aumentada para pH 8,0 com adição de, aproximadamente 1,0 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2,0 M. Após a mudança do pH, as temperaturas foram estabilizadas em 20 e 30 °C e o cobre (agente químico – íon Cu) foi adicionado a água na forma de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) antes da transferência dos animais para os aquários. *P. scrofa* foram submetidos ao cobre em concentrações de CL<sub>50</sub>-96h determinadas previamente para o cobre a 20 °C em pH 4,5 =  $98 \pm 0,9 \mu\text{L}^{-1}$  e em pH 8,0 =  $16 \pm 0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  e a 30 °C em pH 4,5 =  $88 \pm 0,8 \mu\text{L}^{-1}$  e em pH 8,0 =  $14 \pm 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Capítulo 1).

#### *Coleta do fígado*

Após 96h de exposição ao cobre os animais sobreviventes dos grupos controle e grupos expostos ao cobre foram anestesiados e sacrificados por secção da medula, o fígado foi dissecado para análise da estrutura morfológica e alterações induzidas pelo cobre em microscopia óptica.

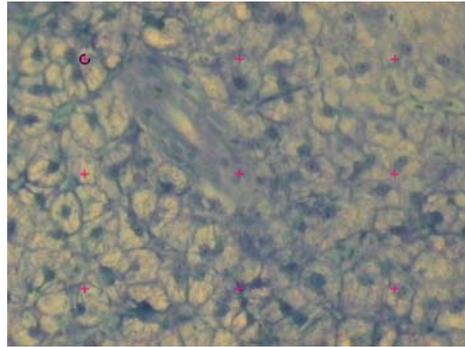
As amostras de fígado foram lavadas em solução salina 0,9%, fixadas em solução de Bouin de Helly e Mac Dowel (1% glutaraldeído e 4% paraformaldeído em 0,1 M tampão fosfato, pH 7,3, por 24h e, após este período o material foi transferido para álcool 70% e desidratadas em série crescente de álcool, 70, 90, 95% e álcool absoluto. Após a desidratação, as amostras foram incluídas em historesina (Leica) até a polimerização. Os blocos de resina contendo as amostras do tecido foram colados com

araldite em suportes de madeira para microtomia. Os cortes (2 $\mu$ m) foram efetuados em micrótomo MICROM - HM 360 adaptado para navalha de vidro e então corados com azul de toluidina ou PAS para identificação do glicogênio. As amostras foram analisadas em microscópio Olympus BX51 com câmara de vídeo e acoplado a um computador que possui o software C.A.S.T. System (Olympus, Denmark) desenvolvido especialmente para análise em estereologia.

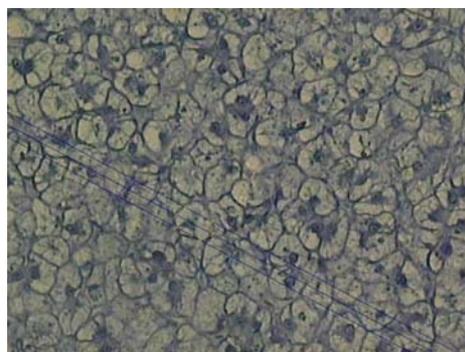
Para determinação do volume de referência e densidade de volume dos diferentes elementos estruturais do fígado foi efetuada a contagem dessas estruturas (hepatócitos, capilares, vasos, ducto biliar e pâncreas (quando presente) utilizando a técnica de contagem de pontos (método estereológico) (FREERE & WEIBEL, 1967). Foi utilizado um sistema teste de pontos e a contagem feita em pontos (1:1 ponto) para estruturas menos freqüentes e em unidades (1:4 pontos) para contagem de estruturas mais freqüentes (hepatócitos) (Figura 1). A densidade de volume de cada estrutura foi determinada como  $V_v$  (estrutura, referência) =  $[\sum P(s) \times 100] / P(r)$  na qual  $P(s)$  é o número de pontos sobre cada elemento estrutural e  $P(r)$  é o número total de pontos-teste sobre o espaço de referências (corte histológico). O volume absoluto dos diferentes elementos estruturais do fígado [ $V(s)$ ], suas densidades de volume foram multiplicadas pelo volume absoluto dos respectivos volumes de referência [ $V(r)$ ] de acordo com a fórmula:  $V(s) = V_v(s,r) \times V(r)$ .

Para determinação do volume celular e nuclear foi utilizada uma contagem aleatória de 20 campos de cada corte histológico e dentro desta área foi determinada aleatoriamente uma célula para determinação de seu volume com base no ROTATOR IUR (Figura 2). Tanto para a determinação do volume celular e nuclear quanto para contagem das estruturas do fígado foi utilizado uma objetiva de 40X.

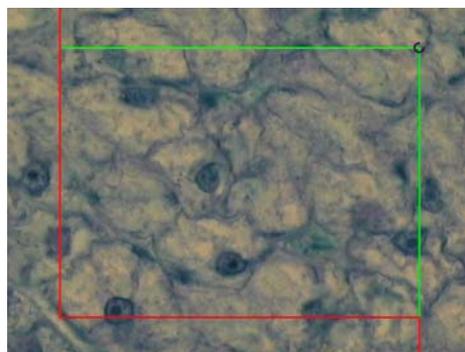
A avaliação histopatológica no fígado foi efetuada em termos de densidade numérica ( $N_v$ ) das alterações histológicas por volume (Figura 3). As lesões foram classificadas em três grupos de acordo com o tipo e localização das lesões: Alterações nos hepatócitos, alterações nos vasos sangüíneos e necrose segundo a descrição de RIGOLIN-SÁ (1998) modificado de POLEKSIC & MITROVIC-TUTUNDZI (1994) (Tabela IV).



**Figura 1.** Sistema teste de pontos. A contagem feita em pontos (1:1 ponto) para estruturas menos frequentes e em unidades (1:4 pontos) para contagem de estruturas mais frequentes (hepatócitos).



**Figura 2.** Sistema de contagem aleatória de 20 campos de cada corte histológico.



**Figura 3.** Sistema de contagem aleatória das histopatologias de cada corte histológico.

#### *Análise estatística*

A análise estatística foi efetuada utilizando o programa “Sigma Stat”, comparando-se os resultados obtidos nos grupos controle com os resultados dos grupos expostos ao cobre a 20 e 30 °C e pH 4,5 e pH 8,0. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  SEM. Neste estudo foi feita a análise de variância com três fatores "Three-way" (ANOVA) para estabelecer se as médias dos tratamentos foram ou não estatisticamente iguais. O

teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% foi utilizado para determinar quais as médias que eram estatisticamente diferentes sempre que as diferenças foram detectadas na análise da variância.

### **Resultados**

Nenhum animal dos grupos controles morreu durante o experimento. Mortalidade de aproximadamente 50% ocorreu nos grupos expostos ao cobre. A Tabela I mostra os volumes dos hepatócitos e seus núcleos.

#### *Morfologia e Morfometria do fígado*

O principal tipo celular do fígado de peixes é o hepatócito (Figura 4 A-D). As células hepáticas, têm uma compartimentalização regular e grânulos de glicogênio estão dispersos no citoplasma da célula. O citoplasma pode apresentar um aspecto vacuolizado. Além dos hepatócitos, o fígado é constituído de células epiteliais dos ductos biliares, macrófagos, células sanguíneas e endoteliais dos vasos sanguíneos e células que acumulam gordura (células Ito). No tecido hepático pode ser observado a presença de sítios amadurecedores de macrófagos, os melanomacrófagos (Figura 4 C-D). A veia porta traz o sangue venoso do intestino e do estômago, e junto com a artéria hepática entram no fígado ramificando-se de forma gradual em sinusóides. As células de Kupffer (macrófagos modificados) ajustam-se internamente à camada endotelial dos sinusóides. O ducto biliar é formado por uma única camada de células cubóides (ou colunares) sobre uma camada basal de tecido conectivo (Figura 4 A-D). O tecido pancreático envolve gradualmente o fígado ao longo dos ramos da veia porta e está distribuído pelo parênquima hepático (pâncreas-intra-hepático) em apenas algumas espécies. Esta combinação dos tecidos hepático e pancreático é denominada de hepatopâncreas.

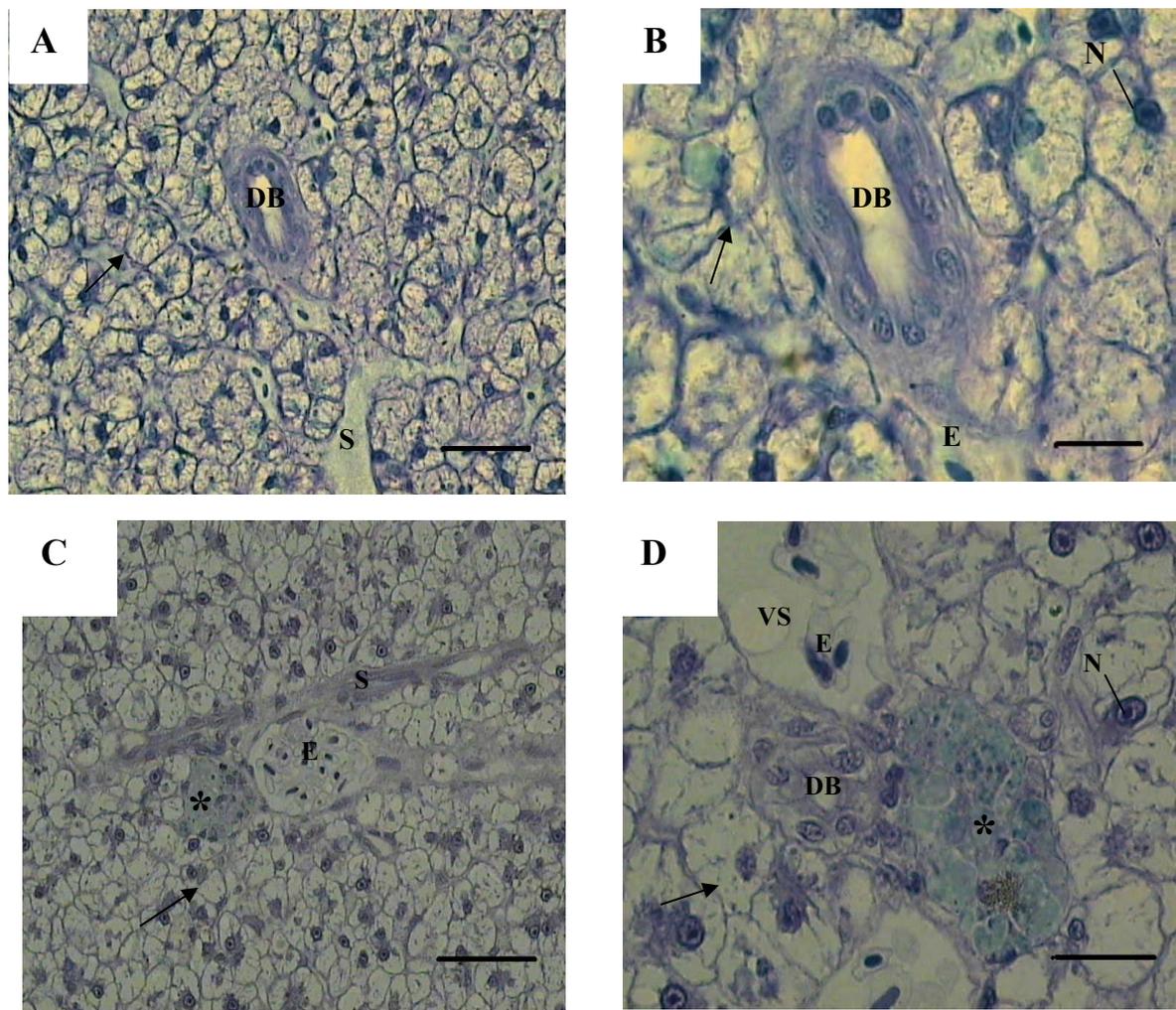
Nos animais mantidos em água com pH 7,0 a 20°C o volume médio dos hepatócitos foi 2,4 vezes maior do que a 30°C ( $p < 0,05$ ) entretanto não houve diferença significativa no tamanho médio dos núcleos dessas células (Tabela I). Os hepatócitos ocupam 76% do volume hepático a 20 °C e 91% a 30 °C (Tabela II).

A exposição de *P. scrofa* em água com pH 4,5 e 8,0 independentemente da temperatura causou desarranjo dos cordões hepáticos, perda do contorno celular e nuclear, desorganização do núcleo e necrose focal (Tabela III, Figura 5 C-F). Vacuolização no citoplasma dos hepatócitos embora tenha sido observada a 20°C foi

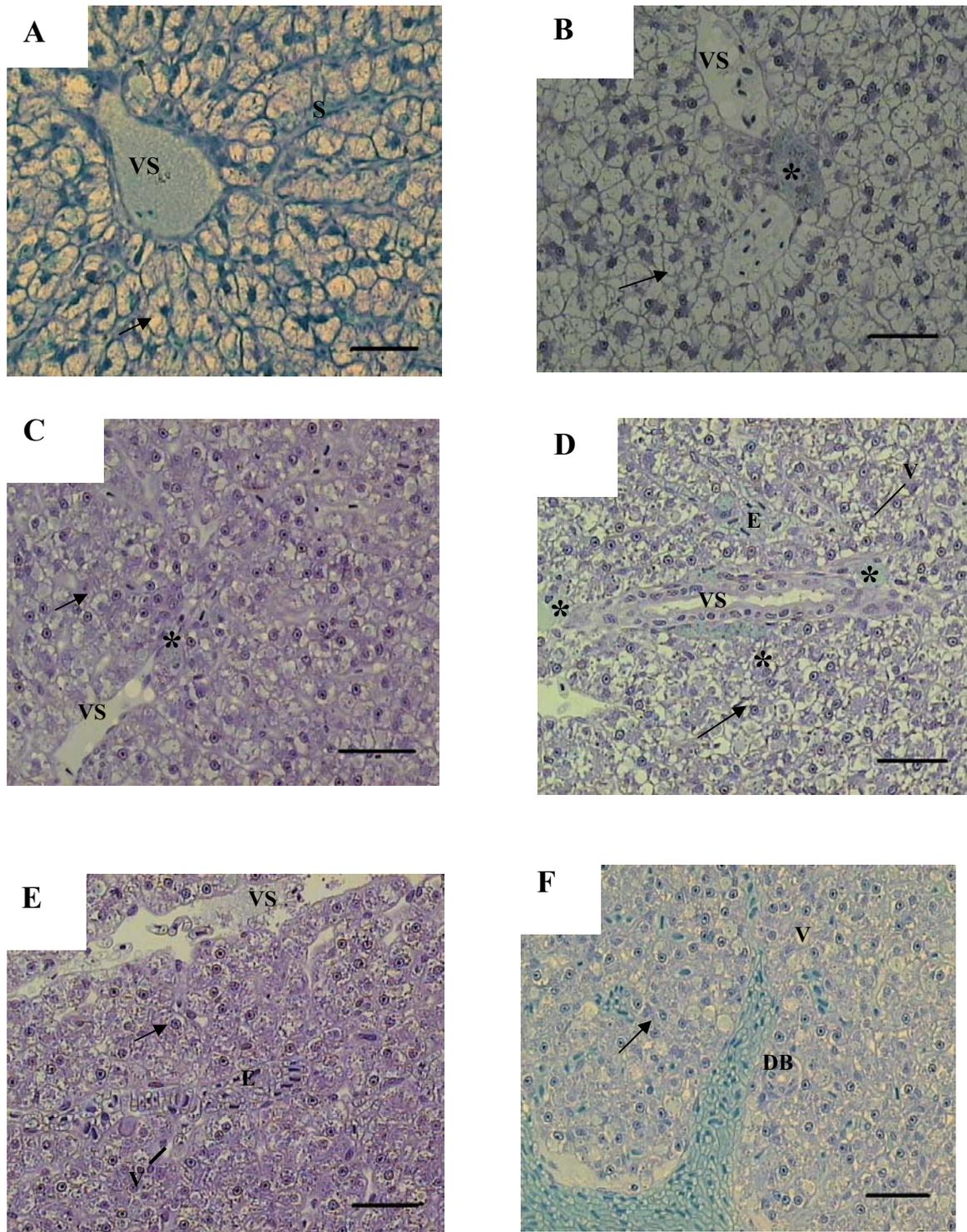
mais evidente a 30°C (Tabela III, Figura 5 D e F). Nestas células foi observada concentração periférica da cromatina. O volume dos hepatócitos diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) nesses pHs e nenhuma alteração foi observada no volume nuclear dessas células (Tabela I).

A densidade de volume das principais estruturas do fígados não foram alterados nos grupos controles (pHs 7,0; 4,5 e 8,0) mas a densidade de volume dos capilares (sinusóides) e vasos sanguíneos foram menores nos animais aclimatados a 30°C (Tabela II).

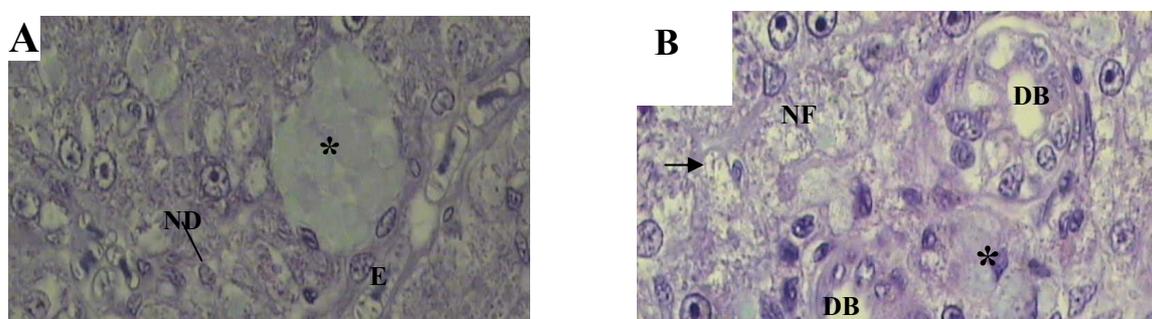
Após exposição ao cobre em água com pH 4,5 e 8,0 a 20 e 30 °C as alterações citadas anteriormente aumentaram (Tabela III, Figuras 4 e 5) e o deslocamento dos núcleos para a periferia foi observado em vários hepatócitos. A vacuolização dos hepatócitos e a presença de melanomacrófagos foi mais acentuada nos animais mantidos em pH 4,5 a 30°C (Tabela III, Figura 6 A-D). As células necróticas apareceram isoladamente embora necrose focal também tenha sido observado. Células necróticas foram caracterizadas por perda do conteúdo celular e de coloração uniforme. O volume médio dos hepatócitos aumentou apenas nos animais expostos ao cobre em pH 4,5 a 20°C e não se modificou nos animais expostos ao cobre em pH 8,0 em ambas as temperaturas (Tabela I, Figura 6 A-D). No entretanto, a densidade de volume dos hepatócitos dos animais expostos ao cobre em pH 8,0 a 20°C diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) provavelmente devido ao aumento da densidade de volume dos sinusóides,  $5,81 \pm 3,41$ , no grupo controle pH 8,0 e  $23,45 \pm 0,65$  no grupo exposto ao cobre pH 8,0 a 20°C. A 30°C também ocorreu um aumento na densidade de volume dos sinusóides nos animais expostos ao cobre em pH 8,0 (Figura 6 D).



**Figura 4. Aspecto geral do fígado de *P. scrofa* do grupo controle em pH 7,0 a 20 e 30 °C. (A) 20 °C. Hepatócitos (seta), Sinusóides (S), ducto biliar (DB) (Barra: 50µm); (B) 20 °C. Detalhe de ducto biliar (DB), eritrócitos (E), hepatócitos (seta), núcleo (N) (Barra: 20µm). (C) 30 °C. Hepatócitos (seta), Sinusóides (S), núcleo (N) e melanomacrófago (\*) (Barra: 50µm); (D) 30 °C. Detalhe dos hepatócitos (seta), núcleo (N), vaso sanguíneo (VS), ducto biliar (DB), eritrócitos (E), melanomacrófago (\*) Barra: 20µm. Corante: Azul de Toluidina.**



**Figura 5.** Tecido hepático de *P. scrofa*, grupos controles pH 7,0, 4,5 e 8,0 a 20 e 30 °C mostrando os hepatócitos (seta), eritrócitos (E), ducto biliar (DB), vaso sanguíneo (VS), vacúolos (V) e melanomacrófono (\*). Observe as diferenças de tamanho dos hepatócitos (A) pH 7,0 a 20 °C; (B) pH 7,0 a 30 °C; (C) pH 4,5 a 20 °C; (D) pH 4,5 a 30 °C; (E) pH 8,0 a 20 °C; (F) pH 8,0 a 30 °C; (Barra: 50µm). (Coloração: Azul de Toluidina).



**Figura 6. Tecido hepático de *P. scrofa* expostos ao cobre em pH 4,5 e 8,0 a 20 e a 30 ° C.** Em (A) - pH 4,5 a 20 °C observar núcleo degenerado (ND), necrose focal (NF), eritrócito (E), melanomacrófago (\*) (Barra: 20µm); (B) -pH 4,5 a 30 °C vacuolização (seta); ducto biliar alterado (DB); necrose focal (NF); melanomacrófago (\*) (Barra: 20µm ); (C) - pH 8,0 a 20 °C observar maior vacuolização (V), necrose focal (NF); (Barra: 20µm). (D) - pH 8,0 a 30 °C observar ducto biliar alterado (DB); vaso sanguíneo repleto de eritrócitos (E); melanomacrófago (\*). (Barra: 20µm). Coloração: Azul de toluidina.

#### *Análise quantitativa*

Com a determinação do volume dos hepatócitos e seus respectivos núcleos pode-se observar nos animais dos grupos controle a 20 e a 30 °C que tanto os hepatócitos quanto os seus núcleos apresentaram-se menores em relação ao grupo controle em pH 7,0. No grupo controle pH 8,0 o volume dos hepatócitos e dos núcleos foram menores.

Nos animais expostos ao cobre houve um aumento no volume dos hepatócitos e dos núcleos em pH 4,5 e pH 8,0 a 20 e a 30 °C. Os hepatócitos dos animais expostos ao cobre em pH 4,5 mantiveram-se com volume maior do que os expostos ao cobre em pH 8,0 (Tabela I).

Quando observou-se a proporção de hepatócitos com relação a outras estruturas como vasos, capilares, ductos biliares, pâncreas e outras estruturas obteve-se resultado semelhante ao encontrado no volume celular, ou seja, a área ocupada pelos hepatócitos em relação à área total diminuiu com a adição do cobre na água e foi mais evidente no pH 8,0. A proporção de capilares nos grupos expostos ao cobre aumentou principalmente nos grupos expostos ao cobre em pH 8,0 (Tabela III).

**Tabela I.** Volumes de hepatócitos e seus núcleos de *P. scrofa* no grupo controle pH 7,0 e nos controles pH 4,5 e 8,0 e nos animais expostos cobre em pH 4,5 e 8,0 a 30 °C. <sup>a</sup> $P < 0,05$  em relação aos controles a 20 e a 30 °C; <sup>b</sup> $P < 0,05$  em relação ao  $\text{Cu}^{2+}$  a 20 e a 30 °C; \* $P < 0,05$  em relação a 20 e a 30°C.

Parâmetros	Controle			Exposição ao cobre (CL <sub>50</sub> -96 h)	
	pH 7,0	pH 4,5	pH8,0	pH 4,5	pH 8,0
<b>20 °C</b>					
Volume do Hepatócito ( $\mu\text{m}^3$ )	3149,86±253,85	806,72 ± 35,32 <sup>a</sup>	781,68± 165,02 <sup>a</sup>	1230,04±110,43	824,60±161,90
Volume do Núcleo ( $\mu\text{m}^3$ )	58,22 ± 7,45	41,44 ± 2,82	39,04 ± 3,57	54,60 ± 4,90	46,46 ± 2,94
<b>30 °C</b>					
Volume do Hepatócito ( $\mu\text{m}^3$ )	1298,43± 244,0 <sup>*</sup>	683,77 ± 53,63 <sup>a</sup>	413,43 ± 36,99 <sup>a</sup>	788,02 ± 201,37	478,63± 71,62
Volume do Núcleo ( $\mu\text{m}^3$ )	42,40 ± 6,58	43,73 ± 3,21	31,89 ± 0,51	38,71 ± 0,95	38,10 ± 2,91

**Tabela II.** Densidade de volume (Vv) das estruturas constituintes do fígado de *P. scrofa* nos grupos controle pH 7,0, 4,5 e 8,0, e grupos expostos ao cobre em pH 4,5 e pH 8,0. <sup>a</sup> $P < 0,05$  em relação aos controles a 20 e a 30 °C; <sup>b</sup> $P < 0,05$  em relação ao Cu<sup>2+</sup> a 20 e a 30 °C; \* $P < 0,05$  em relação a 20 e a 30°C.

Parâmetros	<i>Controle</i>			<i>Exposição ao cobre (CL<sub>50</sub>-96 h)</i>	
	<i>pH 7,0</i>	<i>pH 4,5</i>	<i>pH8,0</i>	<i>pH 4,5</i>	<i>pH 8,0</i>
<b>20 °C</b>					
Hepatócito (%)	76,00 ± 2,39	74,67 ± 0,916	77,92 ± 4,66	70,46 ± 1,96	61,19 ± 2,82 <sup>b</sup>
Capilares (%)	7,27 ± 1,88	10,95 ± 3,60	5,81 ± 3,41	10,62 ± 0,35	23,45 ± 0,65
Vasos (%)	14,84 ± 4,41	9,66 ± 3,69	10,03 ± 0,48	12,88 ± 2,72	13,56 ± 2,82
Outros (%)	1,89 ± 0,91	4,72 ± 1,69	6,24 ± 1,48	6,04 ± 2,12	1,80 ± 0,82
<b>30 °C</b>					
Hepatócito (%)	91,25 ± 0,70	87,03 ± 1,83	90,02 ± 0,42	90,84 ± 2,85	83,61 ± 0,83*
Capilares (%)	3,79 ± 0,393	2,89 ± 1,32	2,81 ± 0,292	3,43 ± 0,70	6,34 ± 2,65
Vasos (%)	3,81 ± 0,83	8,19 ± 0,38	5,80 ± 1,27	3,76 ± 1,23	7,69 ± 3,02
Outros (%)	1,15 ± 0,83	1,89 ± 0,38	1,37 ± 0,47	1,97 ± 0,33	2,36 ± 0,82

**Tabela III.** Alterações histopatológicas e grau de severidade das lesões (estágios) observadas no fígado de *P. scrofa* nos grupos controle pH 7,0, 4,5 e 8,0, e grupos expostos ao cobre em pH 4,5 e pH 8,0. <sup>a</sup> $P < 0,05$  em relação aos controles a 20 e a 30 °C; <sup>b</sup> $P < 0,05$  em relação ao Cu<sup>2+</sup> a 20 e a 30 °C; <sup>\*</sup> $P < 0,05$  em relação a 20 e a 30°C. (-) Ausente; (0) Raramente freqüente; (+) Pouco freqüente; (++) Freqüente; (+++) Muito freqüente.

Alterações Histotológicas	Temperatura (°C)									
	20					30				
	Controle		pH 8,0	Cobre		Controle		Cobre		
7,0	4,5	4,5		8,0	7,0	4,5	8,0	4,5	8,0	
<b>Alterações nos hepatócitos</b>										
Degeneração nuclear	+	+++	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
Vacuolização citoplasmática	0	+	0	0	0	0	+	0	+++	0
Depósitos	0	0	+++	0	0	0	0	0	0	0
Núcleo picnótico	0	0	+++	+	0	0	+	+++	0	0
Melanomacrófagos	-	-	-	++	+	-	+++	+++	+++	0
Célula de Kupffer	+	++	++	+++	++	+	+++	+++	+++	++
<b>Alterações nos vasos sangüíneos</b>										
Hemorragia	++	+++	+++	++	0	0	+	+	+	++
<b>Necrose</b>										
Necrose focal	0	+	0	+++	++	0	+	++	+	++
Necrose celular	+	+++	++	+++	+	+	++	+	+	+

## Discussão

As funções vitais das células hepáticas estão relacionadas ao metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos, estoque de alguns nutrientes, além de secretar a bile no entanto, a desintoxicação é uma das funções mais importantes (ROCHA & MONTEIRO, 1999; FABBRI *et al.*, 2003). A poluição na água induz mudanças patológicas nos peixes e as alterações histopatológicas nos hepatócitos e outros elementos do fígado podem ser utilizadas no monitoramento dos efeitos dos contaminantes e avaliação do grau de poluição, particularmente para efeitos sub-letais e crônicos nos animais. O estudo da histologia e citologia de fígado de peixes é importante para se estabelecer as bases morfológicas para a compreensão do funcionamento deste órgão e dos efeitos tóxicos dos poluentes.

O fígado de *P. scrofa* apresentou os mesmos tipos celulares já descritos para os demais teleósteos, sendo constituído principalmente por hepatócitos (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

A diminuição do volume dos hepatócitos em resposta a redução ou o aumento do pH da água pode ser devido a danos causados provavelmente por desequilíbrio iônico no epitélio branquial refletindo em disfunções nos hepatócitos o que pode prejudicar as funções desempenhadas por este órgão.

As análises morfológicas do fígado mostraram alterações semelhantes às descritas por MAZON (1997) e MONTEIRO (2001) após a exposição ao cobre. O desarranjo dos cordões hepáticos, degeneração citoplasmática e nuclear e vacuolização do citoplasma foram as principais alterações observadas no fígado de *P. scrofa* na presença de cobre em água com pH 4,5 e 8,0 a 20 e a 30 °C e aumento de melanomacrófagos, ocorreu em todas as temperaturas e pH com exceção do pH 8,0 a 30 °C.

O aumento da quantidade de macrófagos sugere uma resposta de defesa do organismo aos danos causados aos tecidos por este metal. Os centros de melanomacrófagos podem acumular células e tecidos mortos fagocitados e restos de membrana resultantes da peroxidação de lipídeos, entretanto, a função básica dos melanomacrófagos é remover, por fagocitose, material estranho e substâncias resultantes da degradação celular e hepatócitos necróticos. AHMAD *et al.* (2000) mostraram que os poluentes químicos constituem em alto potencial oxidativo e a presença de macrófagos está associada a liberação de espécies reativas ao oxigênio

(ROS). O aumento de centros de melanomacrófagos (BUNTON & FRAZIER, 1990), desintegração e necrose celular foram observadas em *Cyprinus carpio* e *Ctenopharingodon idellus* após exposição ao cobre (WONG *et al.*, 1997).

A diminuição do volume dos hepatócitos nos animais dos grupos controles mantidos em pH 4,5 e 8,0 não foi correlacionada com a massa e volume do fígado e com o índice gonadossomático. Um aspecto interessante é a densidade de volume relativamente baixa de hepatócitos e relativamente alta de vasos sanguíneos e capilares no fígado de *P. scrofa* aclimatados a 20°C. Animais aclimatados a 30°C apresentaram densidade de volume de hepatócitos semelhante as encontradas em outras espécies de peixes (HAMPTON *et al.*, 1989, HINTON *et al.*, 1984, ROCHA *et al.*, 1997).

As degenerações celular e nuclear dos hepatócitos observadas no presente estudo, indicam disfunções provocadas pelo metal, o que pode reduzir a área metabolicamente ativa do fígado e acarretar danos nas funções desempenhadas por este órgão.

O aumento do volume dos vasos sanguíneos após exposição ao cobre, com maior intensidade em pH 8,0, pode ser um processo adaptativo para aumentar o fluxo sanguíneo o que facilitaria o transporte dos macrófagos para as regiões danificadas do tecido e aumentando também a oxigenação destas áreas. CERQUEIRA (1999) e CERQUEIRA & FERNANDES (2002) demonstraram que ocorreu aumento na concentração de hemoglobina, hematócrito e número total de eritrócitos, em animais expostos ao cobre, o que sugere uma adaptação na manutenção da capacidade de carregar oxigênio que poderia ser necessária aos tecidos, inclusive aos tecidos hepáticos. CERQUEIRA & FERNANDES (2002) verificaram a recuperação de *P. scrofa* após exposição ao cobre (29 µg.L<sup>-1</sup>) e observaram danos no epitélio branquial como proliferação de células cloreto e mucosa, após 7 a 15 dias, em água sem o metal, a recuperação do tecido tornou-se evidente com total recuperação no 45º dia.

A vacuolização citoplasmática do fígado de *P. scrofa* foi mais evidente nos animais expostos ao cobre em ambas temperaturas. Os espaços em branco nas células provavelmente foram gerados pelas técnicas de preparação utilizadas que removem o material lipídico, estas regiões são descritas como ricas em lipídeos ou glicogênio. A coloração com PAS não mostrou reação, no entanto, o conteúdo de glicogênio permaneceu constante a 20 °C exceto para o controle pH 8,0 que diminuiu e a 30 °C houve aumento crescente no conteúdo nos grupos controle (pH 4,5 e 8,0) enquanto que, nos grupos expostos ao cobre manteve-se sem alteração. Em relação a temperatura os

valores observados a 20 °C foram maiores do que a 30 °C (ver Capítulo 4 desta tese). Estes dados sugerem que a intensa vacuolização observada nos grupos expostos ao cobre pode ser resultado da remoção do material lipídico por técnicas de preparação do material. Supõe-se que os lipídios têm uma função protetora no organismo semelhante à do muco branquial poder-se-ia inferir que seu acúmulo seria uma forma de defesa do organismo, visto que os agentes tóxicos poderiam se acumular nos lipídios (KITO *et al.*, 1982a,b; LEY *et al.*, 1983; RODRIGUES, 1994) além disso, o acúmulo de lipídeos associado as substâncias tóxicas pode prejudicar a atividade metabólica desempenhada pelos hepatócitos.

As mudanças ultraestruturais nos hepatócitos de *Cyprinus carpio* após exposição ao cobre, como desaparecimento dos grânulos de glicogênio, fragmentação do retículo endoplasmático e da heterocromatina, núcleo e mitocôndria inchados demonstram distúrbios no ácido nucleico e no metabolismo de proteína, além da diminuição do conteúdo de glicogênio reforçando que o catabolismo foi aumentado (VARANKA *et al.*, 2001).

A diminuição do tamanho dos hepatócitos de curimatá após exposição ao pH 8,0 possivelmente esteja ligada à diminuição do conteúdo de glicogênio estocado nestas células (ver Capítulo 4 desta tese), devido a utilização deste metabólito como fonte de energia. No entanto, após exposição ao cobre, neste mesmo pH o conteúdo de glicogênio aumentou embora não tenha sido significativo.

A diminuição do tamanho dos núcleos nos grupos controle a 20 e a 30 °C, embora não tenha sido significativa, indica diminuição na atividade metabólica destas células. Entretanto, nos grupos expostos ao cobre a 20 °C observamos aumento no tamanho dos núcleos mostrando que provavelmente, os animais recuperaram a atividade dos hepatócitos, devido a processos de desintoxicação. Entretanto, a 30 °C o aumento no tamanho dos núcleos foi observado apenas no grupo exposto ao cobre em pH 8,0.

Muitos trabalhos têm sido realizados para estudar as respostas fisiológicas dos peixes quando expostos ao cobre em águas ácidas, porém poucos estudos são realizados em ambientes alcalinos, embora existam peixes que sobrevivem em ambientes com pH de até 9,0 (DANULAT, 1995; WILKIE *et al.*, 1996). O ajuste do pH interno é muito importante para manutenção do funcionamento de todos os processos fisiológicos, a alteração no pH da água pode induzir alterações no pH sanguíneo e intracelular e, em consequência, resultar numa performance reduzida do metabolismo, uma vez que as

enzimas envolvidas na produção de energia possuem um pH ótimo para seu funcionamento (HEISLER, 1989).

O fígado de *P. scrofa* apresentou alterações graves possivelmente devido ao estresse oxidativo gerado pela mobilização de reservas (ver Capítulo 4 desta tese) e degradação do tecido. Tanto o pH 4,5 quanto o pH 8,0 alteraram a morfologia do fígado de *P. scrofa*. O pH 8,0 mostrou-se mais tóxico e a toxicidade foi mais evidente na presença de cobre. A mudança no pH da água apresentou efeito maior nos hepatócitos do que a combinação do pH com o cobre, porém esta associação potencializou os danos observados nos hepatócitos de *P. scrofa*. Entretanto, é possível que o efeito do cobre nos hepatócitos depende da concentração utilizada deste metal e o tempo de exposição, além das estratégias utilizadas por este órgão para minimizar o efeito do metal como a síntese de metalotionina (ver Capítulo 5 desta tese). Além disso, é importante considerar que os despejos de metais no ambiente aquático, incluindo o cobre, pode vir acompanhado de mudanças no pH da água.

### Referências bibliográficas

- 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* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1523, p. 37-48, 2000.
- ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 44, p. 62-72, 1999.
- BUNTON, T. E. ; FRAZIER, J. M. Extrahepatic tissue copper concentrations in white perch with hepatic copper storage. **J. Fish Biol.**, v. 45, p. 627-640, 1994.
- CARPENÈ, E. ; VASÁK, M. Hepatic metallothionein from goldfish (*Carassius auratus* L.). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 92C, p. 463-468, 1989.
- CERQUEIRA, C. C. C. Recuperação do tecido branquial, parâmetros hematológicos e iônicos de curimatá, *Prochilodus scrofa*, STEINDACHNER, 1881 (Characiformes, Prochilodontidae) após exposição ao cobre. Dissertação de mestrado Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos naturais/ UFSCar, São Carlos, SP, 87p, 1999.
- CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 52, p. 83-91, 2002.
- CETESB. (1994-2000). Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. São Paulo.
- CRIST, R. H.; MARTIN, J. R.; GUPTILL, P. W.; ESLINGER, J. M.; CRIST D. R. Interaction of metals and protons with algae. 2. Ion exchange in adsorption and metal displacement by protons. **Environ. Sci. Tech.**, v. 24, p.337-342, 1990.

- DANULAT, E. Biochemical – Physiological adaptations of teleosts to highly alkaline, saline lakes. **Biochemistry and molecular biology of fishes**, v.5, 12, p.229-249, 1995.
- FABBRI, E.; CASELLI, F.; PIANO, A.; SARTOR, G.; CAPUZZO, A. Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> affect glucose release and cAMP-dependent transduction pathway in isolated eel hepatocytes. **Aquat. Toxicol.**, v. 62. p. 55-65. 2003.
- FREERE, R.H.; WEIBEL, E.R. Stereologic techniques in microscopy. **J.R. Microsc, Soc.**, v. 87, p. 25-34, 1967.
- HAMPTON, J.A., LANTZ, R.C., HINTON, D.E. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) liver: III Morphometric analysis of parenchyma, stroma and component cell types. *Am. J. Anat.*, 185: 58-73, 1989.
- HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. CRC Press, Boca Ranton, 1987, 245p.
- HEISLER, N. Acid – base regulation in fishes In: **Acid Toxicity and Aquatic Animals**, Cambridge University Press, Cambridge, Ed. MORRIS, R.; TAYLOR, E. W.; BROWN, D. J. A. & BROWN, J. A., p. 85-97, 1989.
- HINTON, D.E., LANTZ, R.C. & HAMPTON, J.A. Effect of age and exposure to a carcinogen on the structure of the medaka liver: a morphometric study. *Natl. Cancer Inst Monogr.* 65: 239-249, 1984.
- HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes In: **Biological indicators of Stress in fish**. Edited by S. M. ADAMS. American Fisheries Society Symposium 8, Bethesda, p. 51-66, 1990.
- KITO, H.; OSE, Y.; MIZUHIRA, V.; SATO, T.; ISHIKAWA, T.; TAZAWA, T. Separation and purification of (Cd, Cu, Zn) metallothionein in carp hepato-pancreas. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 73C, n. 1. p. 121-127, 1982a.
- KITO, H.; TAZAWA, T.; OSE, Y.; SATO, T.; ISHIKAWA, T. Formation of metallothionein in fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, (C) v. 73, n. 1, p.129-134, 1982b.
- LEY, H.L.; FAILLA, M.L.; CHERRY, D.S. Isolation and characterization of hepatic metallothionein from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 74B, n. 3, p. 507-513, 1983.
- MAZON, A. F. **Efeitos do íon cobre sobre curimatá, *Prochilodus scrofa*, STEINDACHNER, 1881 (Characiformes, Prochilodontidae)**. São Carlos – UFSCar, 160 p. Dissertação (Mestrado), 1997.
- MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C. C.; MONTEIRO, E. A. S.; FERNANDES, M. N. Acute copper exposure in freshwater fish: Morphological and Physiological effects In: **Biology of tropical fishes**, INPA, Manaus, Ed. Val., Almeida-Val, V. M. F., Chapter 21, p. 263-275, 1999.
- MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environ. Res. Sec.**, p. 52-63, 2002.
- MAZON, A. F.; FERNANDES, M. N. Toxicity and differential accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae) **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 63, p. 797-804, 1999.
- MONTEIRO, E. A. S. Restauração do tecido hepático e metabólitos secundários do fígado e sangue de Curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), após exposição aguda ao cobre São Carlos - UFSCar, 94p. Dissertação (Mestrado), 2001.
- PELGROM, S. M. G. J.; LAMERS, L. P. M.; GARRISTEN, J. A. M.; PELS, B. M.; LOCK, R. A. C., BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tiplapia *Oreochromis mossambicus*:

Influence of feeding condition on role body metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content. **Aquat. Toxicol.**, v.30, p. 117-135, 1994.

PELGROM, S. M. G. J.; LAMERS, L. P. M.; LOCK, R. A. C.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Interactions between copper and cadmium modify metal organ distribution in mature tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Envir. Pollution**, v. 90, n. 3, p. 415-423, 1995b.

PILGAARD, L.; MALTE, H.; JENSEN, F. B. Physiological effects and tissue accumulation of copper in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under normoxic and hypoxic conditions. **Aquat. Toxicol.**, v. 29, p. 197-212, 1994.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Ed. By R. Müller; R. Lloyd. University Press, Cambridge: p. 339-352, 1994.

RASHED, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environ. Intern.**, v. 27, p. 27-33, 2001.

RIGOLIN-SÁ, A. Toxicidade do herbicida Roundup (glifosato) e o acaricida Omite (propargito) nas fases iniciais da ontogenia do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Pimelodidae, Siluriformes). Dissertação de doutorado Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais - UFSCar - São Carlos - SP, 307 pg., 1998.

ROCHA, E., MONTEIRO, R.A.F., PEREIRA, C.A. Liver of the brown trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): a stereological study at light and electron microscopic levels. *Anat. Rec.*, 247: 317-328, 1997

RODRIGUES, E. L. Alterações morfológicas em hepatócitos de *Bracydanio rerio* (Hamilton – Buchanan, 1822.1823) exposto a ação do organofosforado dimetoato 500 em dose subletal. Tese de mestrado – Universidade Federal do Paraná; 77p, 1994.

TAKASHIMA, F. & HIBIYA, T. An Atlas of Fish Histology. Normal and pathological features. 2<sup>nd</sup> ed., Gustav Fisher Verlag, New York, 195 p., 1995

TAKASUSUKI, J. Efeito do pH na toxicidade do cobre em *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881): avaliação morfológica, fisiológica e metabólica. Dissertação de doutorado Programa de Pós- Graduação- Ecologia e Recursos Naturais/UFSCar, São Carlos, SP, p. 103. 2000.

TAO, S.; LONG, A.; LIU, C.; DAWSON, R. The influence of mucus on copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 47, p. 59-64, 2000.

TAO, S.; WEN, Y. ; LONG, A.; DAWSON, R.; CAO, J., XU, F. Simulation of acid-base condition and copper especiation in the fish microenvironment. **Comp. Chem.**, v. 25, p. 215-222, 2001.

TORT, L.; KARGACIN, B.; TORRES, P.; GIRALT, M.; HIDALGO, J. The effect of cadmium exposure and stress on plasma cortisol, metallothionein levels and oxidative status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 114C, p. 29-34, 1996.

VARANKA, Z.; ROJIK, I.; VARANKA, I.; NEMCSÓK, J.; ABRAHÁM, M. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 128C, p. 467-478, 2001.

WILKIE, M. P.; WOOD, C. M. The adaptations of fish to extremely alkaline environments. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 113B, n. 4, p. 285-293, 1996.

WONG, M. H.; LUK, C.; CHOI, K. Y. Effects of zinc and copper salts on *Cyprinus carpio* and *Ctenopharingodon idellus*. **Acta Anat.**, v. 99, p. 450-454, 1997.

ZABA, B. N. & HARRIS, E. J. Accumulation and effects of trace metals ions in fish liver mitochondria. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 61C, p. 89-93, 1978.

## CAPÍTULO 7

## CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições em que este estudo foi feito, pode-se concluir que:

O curimatá foi mais sensível ao cobre em pH alcalino e a temperatura não influenciou na CL<sub>50</sub> para esta espécie.

O cobre promove alterações no hematócrito, número total de eritrócitos e concentração de hemoglobina em pH baixo e alto a 20 e a 30 °C.

O cobre, sendo um metal essencial e cofator de muitas enzimas acarretou alterações nas enzimas regulatórias e associadas da via glicolítica do fígado e da SE demonstrando que em concentrações elevadas pode se tornar tóxico.

O cobre, nos estudos *in vitro*, induziu aumento da atividade de todas as enzimas estudadas, com a elevação da temperatura, demonstrando que este metal pode levar o animal a um estresse no metabolismo.

No fígado, após a exposição ao pH baixo e alto a 20 e a 30 °C houve diminuição do volume dos hepatócitos, vacuolização, desarranjo dos cordões hepáticos e necrose focal.

Em curimatá, houve aumento do volume dos hepatócitos e dos núcleos nos diferentes tratamentos indicando que a atividade metabólica foi recuperada devido a processos de desintoxicação.

O cobre, nos hepatócitos acentuou os efeitos observados em pH baixo e alto a 20 e 30 °C.

Após exposição ao cobre em pH baixo e alto a 20 e a 30 °C houve indução da metalotionina no fígado de curimatá, sendo mais evidente em pH alcalino.