

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

**EXPOSIÇÕES AO ALUMÍNIO EM MEIO ÁCIDO AFETAM AS BRÂNQUIAS E A
OSMORREGULAÇÃO DO PEIXE NEOTROPICAL *Prochilodus lineatus***

MARINA MORI PIRES DE CAMARGO

SÃO CARLOS – SP

2009

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

**EXPOSIÇÕES AO ALUMÍNIO EM MEIO ÁCIDO AFETAM AS BRÂNQUIAS E A
OSMORREGULAÇÃO DO PEIXE NEOTROPICAL *Prochilodus lineatus***

MARINA MORI PIRES DE CAMARGO

ORIENTADORA: Dra. MARISA NARCISO FERNANDES

CO-ORIENTADORA: Dra. CLÁUDIA BUENO DOS REIS MARTINEZ

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

2009

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

C172ea

Camargo, Marina Mori Pires de.

Exposições ao alumínio em meio ácido afetam as brânquias e a osmorregulação do peixe neotropical *Prochilodus lineatus* / Marina Mori Pires de Camargo. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
89 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Peixe. 2. Alumínio. 3. Marcadores biológicos. 4. Brânquias. 5. pH. I. Título.

CDD: 597 (20^a)

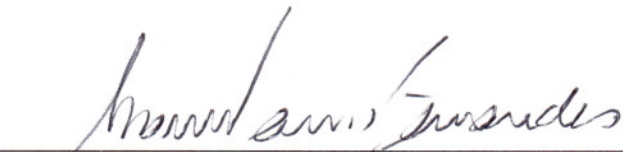
EXPOSIÇÕES AO ALUMÍNIO EM MEIO ÁCIDO AFETAM AS BRÂNQUIAS E A OSMORREGULAÇÃO DO PEIXE NEOTROPICAL *Prochilodus lineatus*

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 05 de junho de 2009

BANCA EXAMINADORA

Presidente



Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
(Orientadora)

1º Examinador



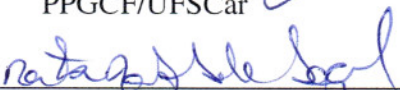
Prof. Dr. Gilberto Moraes
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin
PPGCF/UFSCar

3º Examinador



Prof. Dr. Marta Marques de Souza
UEL/Londrina-RR

4º Examinador



Prof. Dr. John Campbell McNamara
FFCLRP/USP/Rib. Preto-SP

DEDICATÓRIA

Ao João, por seu apoio incondicional.

A minha família, por estar sempre presente.

À Luana, por ter chegado para complementar.

Eu estou entre os que pensam que a ciência é linda.

Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: é uma criança frente a um fenômeno natural que a impressiona tanto quanto um conto de fadas.

(Marie Curie, 1867-1934)

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Cláudia B. R. Martinez, por ter me dado todos os subsídios para que eu me desenvolvesse e crescesse como pesquisadora e profissional, por sempre ser um modelo a ser seguido e principalmente, pela orientação, compreensão e amizade de sempre.

À Dr^a Marisa N. Fernandes, por sempre estar disposta a me orientar, mesmo que a distância, por toda colaboração com idéias, sugestões e correções, e pela confiança e compreensão.

À Dr^a Marta M. Souza, pela amizade e apoio de todas as horas e pelas ótimas conversas sobre tudo.

À Lindalva Pereira Maduenho, por ser minha grande amiga e meu porto seguro, quem me socorria nos momentos difíceis, mas também alguém com quem eu sempre gostei de compartilhar os momentos alegres.

À Juliana D. Simonato e Kathya M. Assmann pela companhia, amizade e apoio em todos os momentos e por dividirem tantas experiências comigo.

Ao Prof. Bruno Galindo, pelo apoio com os experimentos e pela companhia durante os incansáveis monitoramentos de pH e cuidados com os curimbas.

Ao Gabriel Troilo pelo apoio com os experimentos e a boa vontade de sempre em ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela ajuda tão importante durante os experimentos, cuidados com os peixes e alegria das festas.

Ao Fábio Castro e à Fernanda Sampaio, pelo apoio, companhia e amizade durante minha estadia em São Carlos e à Lenise Flores, por todo seu apoio durante as técnicas de imunohistoquímica e microscopia eletrônica..

Ao Marcelo Paulino e à Helen Sadauskas pela ajuda e dicas com a imunohistoquímica.

Aos Drs. John McNamara e Gilberto Moraes e às Dras. Marta Souza e Ana Kalinin, por terem disponibilizado tempo ao participarem da banca e atenção na leitura da tese.

À Dr^a Célia Guadalupe, Oswaldo Capello e Juca San Martin, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEN da UEL, pelo apoio nas técnicas de microscopia eletrônica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da UFSCar, principalmente à Roseli Gonçalves pelo apoio e esclarecimentos, principalmente no final do curso.

Ao CT-HIDRO/CNPq pela concessão da bolsa de estudos e pela prorrogação da mesma.

Aos meus pais por sempre me apoiarem e me estimularem em minhas jornadas e por serem meus maiores exemplos.

Ao João, por me fazer querer ser sempre alguém melhor e por me amar tanto.

À Deus, pela serenidade e paciência tão requisitadas e necessárias em todas as fases desse projeto, e principalmente no final.

SUMÁRIO

PARTE I	Página
APRESENTAÇÃO	1
Introdução Geral	2
Objetivo	8
Metas	8
Referências Bibliográficas	9
PARTE II	Página
ANÁLISE FUNCIONAL	17
Resumo	19
Introdução	20
Material e Métodos	21
Resultados	25
Discussão	31
Referências	36
PARTE III	Página
ANÁLISE MORFOLÓGICA	42
Resumo	44
Introdução	45
Material e Métodos	47
Resultados	51
Discussão	66
Referências Bibliográficas	71

PARTE IV	Página
CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
PARTE V	Página
CONCLUSÕES	80
ANEXO	Página
Artigo <i>in press</i>	82

LISTA DE FIGURAS

Parte I - Apresentação	Pág.
Fig. 1. Modelo para a tomada de sal através das células-cloreto de peixes dulcícolas (extraído de Lingwood et al., 2006).	5
Parte II – Análise funcional	Pág.
Fig. 1. Hemoglobina (A), hematócrito (B) e número de células vermelhas (C) de <i>P. lineatus</i> expostos por 6, 24 e 96h aos grupos CTR, pH ou Al. As barras indicam média e as linhas verticais o DP. * indica diferença significativa em relação ao grupo CTR e # indica diferença estatística em relação ao grupo pH para cada tempo experimental ($P < 0,05$).	26
Fig. 2. Osmolaridade plasmática (A) e concentrações plasmáticas de sódio (B), cloreto (C) e potássio (D) de <i>P. lineatus</i> expostos por 6, 24 e 96h aos grupos CTR, pH ou Al. As barras indicam média e as linhas verticais o DP. * indica diferença significativa em relação ao grupo CTR e # indica diferença estatística em relação ao grupo pH para cada tempo experimental ($P < 0,05$).	27
Fig. 3. Concentração plasmática de proteínas (A), glicose (B) e cortisol (C) de <i>P. lineatus</i> expostos por 6, 24 e 96h aos grupos CTR, pH ou Al. As barras indicam média e as linhas verticais o DP. * indica diferença significativa em relação ao grupo CTR e # indica diferença estatística em relação ao grupo pH para cada tempo experimental ($P < 0,05$).	28
Fig. 4. Localização imunohistoquímica da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas células-cloreto de <i>P. lineatus</i> usados no experimento de 96h. As setas indicam forte imunoreatividade da Na^+/K^+ -ATPase nos peixes do grupo CTR (A). Nas brânquias dos peixes expostos ao pH (B) nota-se um aumento no número de CC nas lamelas e nos filamentos. Já nos animais expostos ao Al (C) as setas brancas indicam CC fracamente coradas e um número menor de células no epitélio como um todo. Barra de aumento 30 μm .	29
Fig. 5. Densidade de células-cloreto nas lamelas e nos filamentos das brânquias de <i>P. lineatus</i> expostos por 6, 24 e 96h aos grupos CTR, pH ou Al. * indica diferença significativa no número total de CC em relação aos respectivos grupos CTR; letras minúsculas são relacionadas às CC das lamelas e letras maiúsculas referem-se às CC do filamento. Letras diferentes indicam diferença estatística para cada parâmetro em cada período experimental ($P < 0,05$).	30

Fig. 6. Porcentagem da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias de *P. lineatus* 31
 expostos por 6, 24 e 96h aos grupos CTR, pH ou Al. * indica diferença estatística em relação
 aos grupos CTR e # indica diferença estatística em relação aos grupos pH para cada tempo
 experimental ($P < 0,05$).

Parte III – Análise morfológica

Pág.

Fig. 1. Fotomicrografias de brânquias de *P. lineatus* submetidos aos tratamentos 54
 experimentais. Em A um exemplar do grupo CTR mostrando o aspecto normal das células
 das lamelas (L) e dos filamentos (Fi), além do espaço interlamelar preservado (seta). Em B
 e C as setas indicam hipertrofia das células-cloreto nos filamentos e nas lamelas de animais
 do grupo pH. De D até H as imagens referem-se a animais expostos ao Al, sendo que em D
 e E as setas claras indicam hiperplasia de células epiteliais e a estrela indica um grande
 aneurisma (D). As setas listradas (F) mostram hipertrofia de células mucosas nas lamelas, o
 * indica fusão parcial de algumas lamelas (G) e em H nota-se a fusão total de várias lamelas
 além do aumento do volume dos canais sanguíneos (seta dupla). Barra de aumento: 30 μm .

Fig. 2. Valores Médios de Alteração (A) e Índices de Alteração Histológica (B) calculados 56
 para as brânquias de *P. lineatus* expostos aos grupos CTR, pH ou Al por 6, 24, 96h ou 10
 dias. As barras indicam médias e as linhas verticais o DP (n varia de 3 a 7 animais). * indica
 diferença significativa em relação ao respectivo grupo CTR e # indica diferença
 significativa em relação ao respectivo grupo pH ($P < 0,05$).

Fig. 3. MEV. Micrografias representativas de filamentos branquiais de *P. lineatus*, no ponto 58
 de inserção da lamela (L) no filamento (f). Em um exemplar do grupo CTR (A) notar o
 padrão das microcriptas das células pavimentosas no filamento (pvf) e nas lamelas (pvL) e
 uma célula-cloreto normal (seta). Nos animais expostos ao pH (B) ou nos animais expostos
 ao Al (D) é possível notar hipertrofia das pvL e alteração das microcriptas das células
 pavimentosas (pvf e em detalhe, no círculo) e superfícies apicais de células-cloreto com
 aspecto de “esponja” (setas). Os animais expostos ao Al (C) mostraram ainda grande
 desarranjo nas lamelas, descamação do epitélio e fusão lamelar (estrela), células mucosas
 hipertrofiadas (cabeça de seta) além de hiperplasia na base das lamelas (setas largas). Para
 maior clareza das imagens somente algumas células foram rotuladas. Barra em
 micrômetros.

Fig. 4. MEV. Micrografias representativas de filamentos branquiais de *P. lineatus* 59 mostrando as principais alterações encontradas nos animais expostos ao pH (A e C) ou ao Al (B, D e E). A seta larga (A) indica hiperplasia na base da lamela, o que levou muitas vezes à fusão lamelar (estrelas em A e E). Nota-se ainda o padrão alterado das microcriptas das pvL nas mesmas figuras. Em B tem-se uma visão geral das lamelas (L) e do filamento (f) de um animal exposto do Al, mostrando presença de resíduos e descamação do epitélio (no detalhe). Em C nota-se a hipertrofia de células-cloreto (setas), deslocadas para as lamelas. Em A vê-se o aspecto “esponjoso” da superfície apical de uma CC (seta). Em D notam-se 2 grandes aneurismas vasculares (a) entre as lamelas. Para maior clareza das imagens somente algumas células foram rotuladas. Barra em micrômetros.

Fig. 5. Micrografia eletrônica de varredura de filamentos branquiais de *P. lineatus* 61 ilustrando as 4 regiões (a-d) analisadas por microanálise por raios-x (A). Como não houve diferença aparente nos elementos observados nessas 4 regiões, de B-D são mostrados típicos espectros obtidos por microanálise por raios-x das brânquias de *P. lineatus* expostos por 96h aos grupos CTR (B), pH (C) e Al (D), sem considerar uma região específica da brânquia. Picos característicos de C, O, P, S, Cl, Ca, Na, Si e N são vistos em praticamente todos os grupos, oriundos do fixador utilizado, do HCl adicionado à água ou mesmo da própria constituição da brânquia. Picos de Al não foram observados no CTR nem no pH, apenas um pico significativo deste metal foi observado no grupo Al (seta branca). Voltagem de operação: 20 kV; distância de trabalho 10mm.

Fig. 6. Área fracional das células-cloreto medida nas brânquias de curimbas dos grupos 62 CTR, pH ou Al de todos os tempos experimentais. As barras indicam médias e as linhas verticais o DP (n varia de 6 a 57 células medidas). * indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo CTR e # indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo pH ($P < 0,05$).

Fig. 7. MET. Micrografias representativas de microscopia eletrônica de transmissão de 64 filamentos branquiais de *P. lineatus*, no ponto de inserção da lamela secundária (L) no filamento (F). Em um exemplar do grupo CTR (em A, aumento de 970x) nota-se o espaço interlamelar preservado (seta), os canais vasculares com eritrócitos (Er) separados pelas células pilares (pi) e as células pavimentosas (pv) fazendo o recobrimento da lamela. O detalhe destacado em C (aumento de 3900x), mostra 2 células cloreto (CC) localizadas nas base da lamela, com núcleo (N) bem definido e citoplasma com sistema tubular bem

definido e várias mitocôndrias. Em B (aumento de 9700x) um animal do grupo pH onde nota-se as mitocôndrias de uma CC (seta dupla), um pv recobrindo parcialmente a abertura da CC e uma maior quantidade de vacúolos (seta vazada) na região apical.

Fig. 8. MET. Micrografias representativas de microscopia eletrônica de transmissão de 65 filamentos branquiais de *P. lineatus*. Em A (aumento de 5800x) tem-se um animal do grupo Al mostrando CC degenerada com núcleo (N) reduzido e com forma alterada além de vacúolos na abertura e número reduzido de mitocôndrias, percebe-se ainda alterações no canal vascular onde estão os eritrócitos (Er); em B (aumento de 3900x) novamente um animal do grupo Al mostrando CC com grande vacúolo (seta) e mitocôndrias também vacuolizadas (no círculo). Em C (aumento de 970x) um exemplar do grupo Al mostra o espaço interlamelar bastante reduzido (seta) em decorrência da hipertrofia das pv. Vê-se muitas CC deslocadas para a ponta da lamela; no detalhe em D (aumento de 5800x) notam-se os prolongamentos da CC para o exterior (*), dando aparência de “esponja” vista na MEV.

LISTA DE TABELAS

Parte II – Análise funcional	Pág.
Tabela 1. Parâmetros físicos e químicos das amostras de água coletadas nos diferentes grupos durante os testes (6, 24 e 96h).	25
Parte III – Análise morfológica	Pág.
Tabela 1. Parâmetros físicos e químicos da água nos diferentes grupos experimentais.	52
Tabela 2. Principais alterações histológicas encontradas nas brânquias dos <i>P. lineatus</i> utilizados nos testes de toxicidade de 6, 24, 96h e 10 dias de exposição, e seus respectivos estágios de severidade.	53

ABREVIATURAS

Al	alumínio
AFCC	área fracional das células-cloreto
CC	célula-cloreto
CCF	célula-cloreto no filamento
CCL	célula-cloreto na lamela
CTR	grupo controle
EDS	espectrometria de energia dispersiva
Er	eritrócito
IAH	índice de alteração histológica
MO	microscopia de luz (óptica)
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MET	microscopia eletrônica de transmissão
pi	célula pilar
pv	célula pavimentosa
pvf	célula pavimentosa do filamento
pvl	célula pavimentosa da lamela
REL	retículo endoplasmático liso
VMA	valor médio de alteração

RESUMO

O alumínio é muito tóxico para os peixes. Biomarcadores tem sido usados para indicar essa contaminação, entretanto são poucos os trabalhos com espécies tropicais. Assim, juvenis do peixe neotropical *Prochilodus lineatus* foram expostos a aproximadamente 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Al dissolvido em pH ácido (grupo Al), somente pH ácido (grupo pH) ou à água com pH 7,0 (grupo CTR) por 6, 24, 96h e 10 dias para avaliar seus efeitos em parâmetros hematológicos, osmo-iônicos, metabólicos e endócrino, além dos parâmetros morfológicos, por meio de MO, MEV, MET, AFCC e EDS das brânquias. Os peixes expostos ao Al tiveram os parâmetros hematológicos e metabólicos aumentados em relação ao grupo CTR. Os parâmetros osmo-iônicos foram significativamente menores nesses peixes assim como a enzima Na^+/K^+ -ATPase e o número de CC nos mesmos animais. A MO revelou que os peixes expostos ao Al mostraram lesões mais amplamente distribuídas nas brânquias e consideradas mais severas, quando comparados aos demais grupos, sendo que as principais alterações foram hiperplasia do epitélio branquial, fusão lamelar e hipertrofia das células mucosas. Nos animais expostos ao pH a principal alteração foi a hipertrofia celular, principalmente das CC. A MEV permitiu destacar o extenso desarranjo nas lamelas dos peixes dos grupos Al, descamação do epitélio além da redução do espaço interlamelar e fusão lamelar. CC com aspecto “esponjoso” foram notadas nos grupos pH e Al além da alteração no padrão das microcriptas das célula pv em ambos os grupos. Animais expostos ao Al mostraram ainda AFCC menores em relação aos CTR e o EDS indicou picos de Al maiores nesses grupos. A MET mostrou que os animais expostos ao Al têm mais CC deslocadas para as pontas das lamelas e que essas células apresentam o citoplasma menos denso, com uma menor quantidade de túbulos e mitocôndrias e núcleos formas alteradas, além de mais vacúolos. A espessura das lamelas é maior devido ao inchaço das pv, reduzindo o espaço interlamelar. Os resultados permitiram concluir que exposições ao Al em meio ácido prejudicam principalmente a capacidade de hiperregulação dos peixes afetando a tomada ativa de íons nas brânquias além de sérias alterações estruturais nas brânquias, comprometendo a sobrevivência dos animais nessas situações.

Palavras-chave: alumínio, acidez, *Prochilodus lineatus*, morfologia branquial, osmorregulação, biomarcadores.

ABSTRACT

Aluminium is very toxic to fish. Biomarkers have been using to indicate water contamination, however, there are few studies concerning tropical fish species. So, the neotropical fish *Prochilodus lineatus*, were exposed to approximately 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of dissolved Al em acid pH (Al group), only to acid water (pH group) or to water with pH 7.0 (CTR group) for 6, 24, 96h and 10 days to evaluate its effects on haematological, osmo-ionic, metabolic and endocrine parameters besides morphological analysis by light and electronic microscopy. Fishes exposed to Al have all haematological and metabolic parameters increased when compared to CTR group. Osmo-ionic parameters were significantly smaller in fishes exposed to Al as much as the Na^+/K^+ -ATPase enzyme and the CC number smaller. Light microscopy reveal that fish exposed to Al in all experimental periods showed lesions widely distributed in the tissue and considered more severe when compared to fish from other groups. In the Al group, the main alterations found were hyperplasia of the epithelial cells, lamellar fusion and hypertrophy of mucous cells. In the animals of pH group, the main alteration was hipertrophy of epithelial cells, especially of the CC. Scanning electron microscopy allowed to see great disorganization in the lamellae of the fishes exposed to Al, detachment of branchial epithelium and reduction of the interlamellar space. Chloride cells with “sponge” aspect were noted in the pH and Al groups, besides alteration in the microcrypt of the pv in both groups. Transmission electron microscopy showed that animals from Al group have more CC displaced to the tip of the lamellae and that these CC have a less dense cytoplasm, with a smaller quantity of tubules and mitochondrias and nuclei with altered shapes. The thickness of the lamellae is bigger because of the swollen pv and the interlamellar spaces are reduced. There are, also, more vacuoles in the cytoplasm of these CC. Results allowed to conclude that exposure to Al in acid medium impairs mostly the hyperegulation capacity of the fish, since it affects the active uptake of ions in the gills and also caused serious structural alterations in the organ, leading to functional problems, jeopardizing the survival of the fishes in such situation.

Keywords: alminium, acidity, *Prochilodus lineatus*, branchial morphology, osmoregulation, biomarkers.

ORGANIZAÇÃO GERAL DO TRABALHO

Este trabalho compila a pesquisa e os resultados do projeto de doutorado, sendo que estes serão apresentados em 5 partes para uma melhor organização.

A parte I inclui uma apresentação geral do assunto, com uma revisão de literatura que abrange todos os pontos abordados no trabalho, buscando trazer um pouco do que já foi publicado, desde trabalhos mais antigos como também os mais recentes disponíveis. Também conta com o objetivo e as metas que o trabalho procurou investigar, além das referências citadas nessa parte do texto.

O restante do trabalho foi organizado com duas abordagens distintas: a que consta na Parte II trata de parâmetros funcionais analisados no peixe *Prochilodus lineatus*, trazendo pra isso dados de diversos parâmetros analisados no sangue e no plasma além também das brânquias. Essa parte já está na forma final de um artigo aceito para publicação no periódico internacional “Aquatic Toxicology” (Elsevier), sendo que a versão em inglês está anexada ao final da tese.

A Parte III traz a segunda abordagem realizada, que buscou investigar a morfologia das brânquias do referido peixe, em nível estrutural (pela microscopia de luz) e ultra-estrutural (pela microscopia eletrônica) buscando, assim, complementar a análise realizada na primeira parte. Mais adiante esta parte do trabalho também será encaminhada para publicação em um periódico específico ainda a ser determinado.

A Parte IV traz considerações finais sobre o trabalho, buscando juntar o que foi mais relevante em cada uma das duas abordagens em um só texto.

A Parte V consiste nas conclusões gerais extraídas do trabalho e apresentadas de modo direto para simplificar o entendimento.

PARTE I
Apresentação



INTRODUÇÃO GERAL

Os efeitos do alumínio sobre os peixes têm sido intensivamente estudados desde a década de 80, em várias partes do mundo (Howels, 1984; Wood et al., 1988; Dietrich e Schlatter, 1989; Exley et al., 1991; Witters et al., 1992; Poléo, 1995; Ytrestoyl et al., 2001; Vuorinen et al., 2003; Barcarolli e Martinez, 2004; Monette e McCormick, 2008). Grande parte do interesse dos pesquisadores em relação ao alumínio reside no fato dele ser o metal mais abundante na crosta terrestre (Exley et al., 1991) e também um dos elementos mais presentes no ambiente (Batalha e Parlatore, 1977; Poléo, 1995; Ščančar et al., 2004).

O Al não é um metal essencial para humanos (Batalha e Parlatore, 1977; Ščančar et al., 2004) e sua presença normalmente é relacionada com danos em nível celular ou sistêmico, já que pode se acumular em diferentes órgãos, causando alterações metabólicas. Ainda, tem sido relacionado ao câncer de mama (Darbre, 2005; Mannello et al., 2009), doenças renais (Mahieu et al., 2005) e ao aumento na incidência de doenças neurológicas, como Mal de Parkinson e Alzheimer (Hughely et al., 1993). No ambiente aquático, uma alta toxicidade do Al já foi mostrada em vários trabalhos com peixes (Exley et al., 1991; Poléo et al., 1997; Vuorinen et al., 1999; Monette e McCormick, 2008).

O Al pode se transferir de utensílios de cozinha contaminando os alimentos (Alberti et al., 2003; Dashiti et al., 2004; Santos et al., 2004; Ščančar et al., 2004; Karbouj et al., 2009); está presente na poeira de centros urbanizados e com grande industrialização (Casarini et al., 2001; Jordão et al., 2002), além de ser comumente usado em fórmulas de desodorantes antiperspirantes (Darbre, 2005; Mannello et al., 2009) e agentes flocculantes para o tratamento de água (Silva et al., 2007; Cetesb, 2008). Entretanto, a forma pela qual o Al torna-se mais disponível para os organismos é, sem dúvida, por meio da passagem dos íons do metal presentes naturalmente no solo para os corpos de água, principalmente em decorrência da acidificação dos mesmos (Guibaud e Gualthier, 2003; Hindar, 2005).

Poléo (1995) explica que a toxicidade do Al pode ser justificada pela sua polimerização quando o pH do meio atinge o valor 5,0. Normalmente o que se encontra diluído na água com pH inferior a 4,0 é a forma octaédrica hexaidratada $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, ou como é comumente citada, Al^{3+} . Quando o pH se eleva para 5,0

espera-se a formação de hidróxidos de Al pela perda de prótons (principalmente o $\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4^+$) e a ligação de várias moléculas do octaedro desprotonado, formando cadeias de hidróxidos de Al. Essa é a forma mais comum do Al na água, com pH entre 5,0 e 6,0, e a maior responsável pela toxicidade aguda do Al (Poléo, 1995). Esse dado é extremamente relevante quando se sabe que cada dia mais os corpos de água do mundo têm sofrido processos de acidificação, em decorrência de ações antrópicas como poluição e industrialização exagerada, levando principalmente às chuvas ácidas (Keinanen et al., 1998; Ytrestoyl et al., 2001; Flues et al., 2002; Guibaud e Gualthier, 2003; Tammi et al., 2004).

De uma forma geral, a acidez proporciona uma maior disponibilização de íons metálicos, sendo, portanto, normalmente estudada quando se procura investigar os efeitos de um metal sobre algum organismo (Exley et al., 1991; Jobling, 1995; Alstad et al., 2005; Brunelli e Tripepi, 2005; Carvalho e Fernandes, 2006; Monette e McCormick, 2008). Além de sua importância no estudo com metais, a acidez por si só já funciona como um agente estressor para os peixes, causando problemas reprodutivos (Vuorinen et al., 2003), hematológicos (Wood e McDonald, 1982; Carvalho e Fernandes, 2006), endócrinos e metabólicos (Cole et al., 2001). Entretanto, a acidez associada ao Al faz com que os principais problemas sejam percebidos nas brânquias desses animais (Exley et al., 1991; Waring e Brown, 1995; Cole et al., 2001; Fivelstad et al., 2003; Teien et al., 2006).

As brânquias dos peixes já foram extensivamente estudadas e vem sendo o alvo de vários trabalhos no decorrer dos anos (Mallat, 1985; Perry, 1997; Goss et al., 1998; Evans et al., 2005; Varsamos et al., 2005; Hwang e Lee, 2008). As brânquias são órgãos multifuncionais diretamente envolvidos nas trocas gasosas, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e eliminação de excretas nitrogenadas (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Martinez e Cólus, 2002; Fernandes e Mazon, 2003). Devido à sua importância para o peixe e grande superfície de contato com a água, as brânquias representam o primeiro órgão afetado após exposição a contaminantes, servindo como bom indicador de contaminação aquática (Mallat, 1985; Fanta et al., 2003; Thophon et al., 2003).

Segundo Exley et al. (1991) os efeitos do Al sobre as brânquias podem ser resumidos em: 1) aumento na barreira de difusão dos gases respiratórios, devido à proliferação excessiva das células de muco, como forma de proteção ao órgão; 2)

efeitos diretos do Al sobre o epitélio, já que este pode precipitar-se lesando o tecido e 3) os efeitos histopatológicos causados pelo metal quando este é absorvido, como edema, fusão lamelar, hipertrofia e hiperplasia celular, degeneração e necrose. Uma vez dentro das células, o Al pode competir com outros íons, como o Mg^{+} , Ca^{2+} ou mesmo com o ATP, afetando assim o funcionamento de proteínas de transporte, como a Na^{+}/K^{+} -ATPase.

A Na^{+}/K^{+} -ATPase é uma proteína de membrana cuja principal função nas células é transportar $2K^{+}$ para dentro da célula e $3Na^{+}$ para fora dela, usando para isso, a energia da hidrólise do ATP. Sendo as brânquias o local primário de transporte iônico nos peixes, a Na^{+}/K^{+} -ATPase é bastante encontrada nas células ricas em mitocôndrias desse órgão, principalmente nos teleósteos (Lingwood et al., 2006; Silva et al., 2007; Hwang e Lee, 2008). Vários são os autores que tem mostrado a atividade da Na^{+}/K^{+} -ATPase como um bom indicador para diferentes estressores em peixes (Dang et al., 2000; Lappivaara et al., 2002; Lingwood et al., 2006) e em especial após exposições ao Al (Silva et al., 2007; Monette e McCormick, 2008).

As células ricas em mitocôndrias ou células-cloreto das brânquias possuem especial importância na osmorregulação dos peixes por serem as principais células transportadoras de íons em teleósteos (Wendelaar Bonga, 1997; Dang et al., 2000; Hirose et al., 2003; Varsamos et al., 2005, Hwang e Lee, 2008). Tais células localizam-se principalmente nos filamentos branquiais, próximo à base das lamelas (Perry, 1997; Hirose et al., 2003) e possuem uma ampla área superficial devido à presença de invaginações da membrana baso-lateral (Hirose et al., 2003). Como o próprio nome diz, possui muitas mitocôndrias (o que reflete uma grande atividade metabólica), e também muitos canais de Na^{+} , trocadores Cl^{-}/HCO_3^{-} , bombas Na^{+}/K^{+} -ATPase, canais de Ca^{2+} e Ca^{2+} ATPase (Perry, 1997; Clairborne et al., 2002). Todos esses transportadores são muito importantes na manutenção da homeostase dos fluidos corporais em teleósteos dulcícolas, já que estes compensam a perda de íons por difusão e o ganho osmótico de água absorvendo ativamente Ca^{2+} , Na^{+} e Cl^{-} através das brânquias e produzindo muita urina diluída, respectivamente (Randall et al., 2000; Hirose et al., 2003).

Lingwood et al. (2006) explicam que no atual modelo de tomada de sais (Fig. 1), uma H^{+} -ATPase apical gera um gradiente eletroquímico favorável à tomada passiva de Na^{+} por canais de Na^{+} no epitélio e acidificam a camada mais externa.

Na membrana apical, um antiporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ leva Cl^- para dentro da célula, enquanto que o H^+ e o HCO_3^- intracelular são provavelmente derivados da hidratação do CO_2 . O Cl^- deve sair da célula via canais na membrana basolateral, enquanto que o transporte de Na^+ é completado pela Na^+/K^+ -ATPase. Embora as CC de teleosteos dulcícolas pareçam ter menos Na^+/K^+ -ATPase do que os animais marinhos, elas ainda possuem uma quantidade muito maior dessa enzima do que as outras células do epitélio branquial (Perry, 1997).

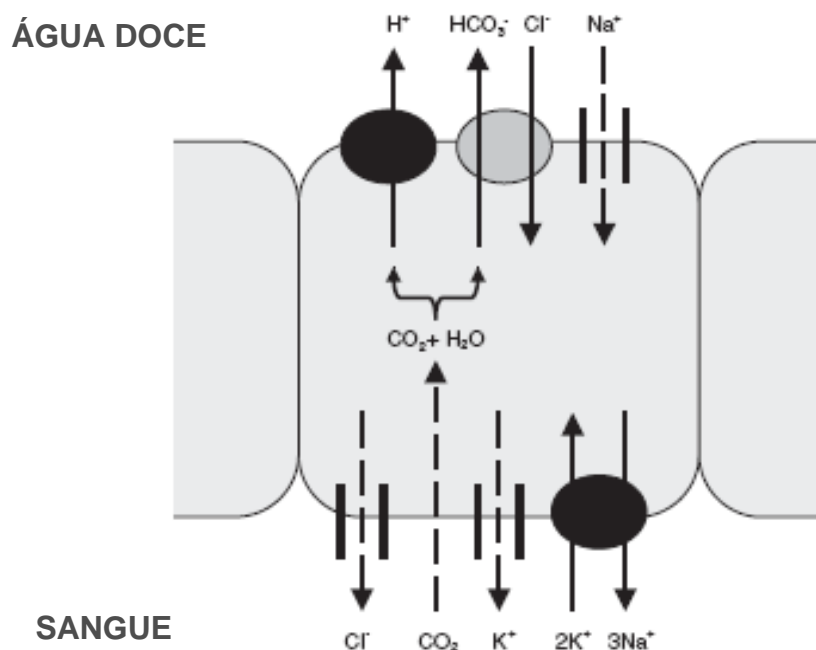


Fig. 1. Modelo para a tomada de sal através das células-cloreto de peixes dulcícolas (extraído de Lingwood et al., 2006).

Além da análise da enzima responsável pelo transporte iônico nos peixes, uma investigação da própria osmolaridade e das concentrações individuais dos principais íons (Na^+ , K^+ e Cl^-) podem revelar alterações no processo de hiperregulação em um peixe dulcícola submetido a algum estressor (Heath, 1987; Wang e Yin, 1997). No caso dos animais expostos ao Al, o que normalmente tem sido relatado é a diminuição significativa dos íons plasmáticos e conseqüentemente da osmolaridade (Dietrich e Schlatter, 1989; Exley et al., 1991; Wilkinson e Campbell, 1993; Witters et al., 1996; Ytrestoyl et al., 2001); seja em decorrência de uma diminuição da atividade da enzima

Na⁺/K⁺-ATPase ou devido a danos estruturais nas células-cloreto (Monette e McCormick, 2008). Assim, a análise histológica das brânquias de peixes expostos ao Al (principalmente em meio ácido) pode indicar o grau de toxicidade do Al e os possíveis mecanismos de ação nos peixes.

Alterações histológicas aparecem como respostas de médio-prazo quando animais são submetidos a estressores sub-letais (Silva e Martinez, 2007), representando um método rápido de detectar os efeitos de tais estressores, especialmente após exposições crônicas (Bernett et al., 1999). Ainda, são mais fáceis de serem observadas e podem indicar possíveis alterações funcionais (Fanta et al., 2003). Vários autores têm usado biomarcadores histopatológicos em peixes tanto em trabalhos de campo (Hinton et al., 1992; Schwaiger et al., 1997; Teh et al., 1997; Silva e Martinez, 2007; Camargo e Martinez, 2007) como em laboratório (Wester e Canton, 1991; Thophon et al., 2003). Esses autores apontam como uma das principais vantagens das análises histológicas a possibilidade de se avaliar os efeitos de um contaminante em um órgão-alvo específico, como as brânquias no caso do Al, servindo como sinal de alerta para riscos à saúde dos animais (Hinton e Laurén, 1990).

A maioria dos trabalhos realizados com Al até o momento concentra-se em regiões de clima frio ou temperado, no hemisfério Norte, muito provavelmente porque essas regiões, já muito urbanizadas e desenvolvidas, enfrentam problemas com acidificação dos ambientes aquáticos há mais tempo que a região tropical. Em locais onde existe ainda a possibilidade do derretimento de neve quando a temperatura aumenta, o problema da acidificação de corpos de água doce é ainda mais comum (Howels, 1984; Brunelli e Tripepi, 2005; Laudon et al., 2005), fazendo com que qualquer concentração de Al possa se tornar perigosa nesses locais (Lydersen et al., 2002).

No Brasil também tem sido observado um decaimento no pH de muitos rios e lagos, principalmente nos que são localizados próximos de grandes centros urbanos ou áreas extensivamente agrícolas (Lara et al., 2001; Artaxo et al., 2005; Cetesb, 2008). Considerando ainda que o Al é constituinte natural de muitos tipos de solo (Horbe et al., 2005), a situação antes notada apenas na Europa e América do Norte, passa a ser mais comum por aqui, gerando a necessidade de que mais estudos com Al em meio ácido sejam realizados com espécies nativas.

Um bom exemplo de espécie nativa da região neotropical é o *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecido como curimba. Trata-se de uma espécie comum nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, com grande relevância econômica e alta tolerância ao pH baixo (Takasusuki et al., 2004). Vários trabalhos têm mostrado o curimba como uma espécie sensível a diferentes contaminantes, o que faz dele um bom organismo indicador para testes de toxicidade e programas de monitoramento (Mazon et al., 2002; Martinez et al., 2004; Simonato et al., 2006; Camargo e Martinez, 2006; Camargo e Martinez, 2007; Vanzella et al., 2007).

Assim, considerando o exposto, o seguinte trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de exposições ao Al em meio ácido para uma espécie de peixe dulcícola da região neotropical. Para isso, duas abordagens foram seguidas: uma analisando aspectos morfo-funcionais das brânquias, que procurou avaliar os efeitos de exposições agudas (6, 24 e 96h) sobre a osmorregulação, estudando, portanto, a osmolaridade e os íons plasmáticos, a distribuição das células-cloreto e a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase branquial; uma averiguação da provável resposta de estresse em decorrência das exposições também foi realizada, avaliando para isso parâmetros hematológicos, metabólicos e o hormônio cortisol. O segundo enfoque levou em consideração os possíveis efeitos estruturais causados por exposições agudas (6, 24 e 96h) e sub-crônica (10 dias) ao Al, avaliando para isso as brânquias por meio de microscopia de luz e eletrônica de varredura e transmissão, além de microanálise de raios-x para detecção do Al depositado sobre o tecido branquial.

OBJETIVO

- Avaliar os efeitos de exposição ao Al em meio ácido nas brânquias e em processos relacionados a elas, no peixe neotropical *Prochilodus lineatus*.

METAS

- Realizar testes agudos e sub-crônicos com uma concentração sub-letal de Al;
- Analisar parâmetros osmoiônicos e relacionados à resposta de estresse (hematológicos, metabólicos e endócrino) nos peixes utilizados nos testes;
- Analisar as brânquias por meio de microscopia de luz e eletrônica de varredura e transmissão, dando ênfase nas células-cloreto;
- Investigar a deposição do Al na superfície branquial por meio de microanálise por raios-X.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberti, G., Biesuz, R., Profumo, A., Pesavento, M., 2003. Determination of the total concentration and speciation of Al in tea infusions. *J. Inorg. Biochem.*, 97, 79-88.

Alstad, N.E.W.; Kjelsberg, B.M.; Vøllestad, L.; Lydersen, E.; Poléo, A.B.S. 2005. The significance of water ionic strength on aluminium toxicity in brown trout (*Salmo trutta L.*). *Environ. Pollut.*, 133, 333-342.

Artaxo, P.; Gatti, L.V.; Leal, A.M.C.; Longo, K.M.; Freitas, S.R.; Lara, L.L.; Pauliquevis, T.M.; Procópio, A.S.; Rizzo, L.V. 2005. Química atmosférica na Amazônia: A floresta e as emissões de queimadas controlando a composição da atmosfera amazônica. *Acta amazonica*, 35 (2) 185-196.

Batalha, B.H. L.; Parlatore, A.C. 1977. Controle da qualidade da água para consumo humano. Bases conceituais e operacionais. Cetesb, São Paulo, 198 p.

Barcarolli, I.F., Martinez, C.B.R., 2004. Effects of aluminium in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72, 639-646.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, 22, 25–34.

Brunelli, E.; Tripeppi, S. 2005. Effects of low pH acute exposure on survival and gill morphology in *Triturus italicus* larvae. *J. Exp. Zool.*, 303A: 946-957.

Camargo, M.P., Martinez, C.B.R., 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 21, 61–69.

Camargo, M.M.P.; Martinez, C.B.R. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.*, 5 (3), 327-336.

Carvalho, C.S.; Fernandes, M.N. 2006. Effects of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, 251, 109-117.

Casarini, D.C.P., Dias, C.L., Alonso, C.D., 2001. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. Série Relatórios, Cetesb, São Paulo.

CETESB, 2008. Cetesb – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - Relatório da qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2007. Série Relatórios, Cetesb, São Paulo.

Clairborne, J.B.; Edwards, S.L.; Morrison-Shetlar, A.I. 2002. Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J. Exp. Zool.*, 293, 302-319.

Cole, M.B., Arnold, D.E., Watten, B.J., Krise, W.F., 2001. Haematological and physiological responses of brook charr, to untreated and limestone-neutralized acid mine drainage. *J. Fish Biol.*, 59, 79-91.

Dang, Z., Lock, R.A.C., Flick, G., Wendelaar Bonga, S.E., 2000. Na/K-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *J. Exp. Biol.*, 151, 517-428.

Darbre, P.D. 2005. Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *J. Inorg. Biochem.*, 99, 1912-1919.

Dashti, B; Al-Awadi, F; Alkandari, R; Ali, A; Al-Otaibi, J. 2004. Macro-and microelements contents of 32 Kuwaiti composite dishes. *Food Chem.*, 85, 331-337.

Dietrich, D.; Schlatter, C. 1989. Aluminium toxicity to rainbow trout at low pH. *Aquat. Toxicol.*, 15, 197-212.

Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid–base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.*, 85, 97–177.

Exley, C., Chappell, J.S., Birchall, J.D. 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *J. Theor. Biol.*, 151, 417-428.

Fanta, E.; Rios, F.S.; Romão, S.; Vianna, A.C.C.; Freiberger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54: 119-130.

Fernandes, M.N.; Mazon, A.F. 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L.; Kapoor, B.G. (Eds.). *Fish adaptations*. Enfield: Science Publishers, 418p.

Fivelstad, S.; Waagbø, R.; Zeitz, S.F.; Hosfeld, A.C.D.; Olsen, A.B.; Stefansson, S. 2003. A major water quality problem in smolt farms: combined effects of carbon

dioxide, reduced pH and aluminium on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts: physiology and growth. *Aquaculture*, 215, 339-357.

Flues, M.; Hama, P.; Limes, M.J.L.; Dantas, E.S.K.; Fornado, A. 2002. Evaluation of the rainwater acidity of a rural region due to a coal-fired power plant in Brazil. *Atmos. Environ.*, 35, 2397-2404.

Goss, G.G.; Perry, S.F.; Fryer, J.N.; Laurent, P. 1998. Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, 119 (1), 107-115.

Guibaud, G., Gualthier, C. 2003. Study of aluminum concentration and speciation of surface water in four catchements in Limousin region (France). *J. Inorg. Biochem.*, 16-25.

Heath, A.G., 1987. *Water pollution and fish physiology*. CRC Press, Florida.

Hindar, A. 2005. Whole-catchment application of dolomite to mitigate episodic acidification of streams induced by sea-salt deposition. *Sci. Total Environ.*, 343, 35-49.

Hinton, D.E.; Laurén, D.J. 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: McCarthy, J.F.; Shugart, L.R. (Eds.) *Biomarkers of Environmental Contamination*. Boca Raton: CRC Press.

Hinton, D.E.; Baumann, P.C.; Gardner, G.R.; Hawkins, W.E.; Hendricks, J.D.; Murchelano, R.A.; Okihira, M.S. *Histopathologic Biomarkers*. 1992. In: Hugget, R.; Kimerle, R.; Mehrle, P.; Bergman, H. (Eds.) *Biomarkers – biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers.

Hirose, S.; Kaneko, T.; Naito, N.; Takei, Y. 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 136, 593-620.

Horbe, A.M.C. Gomes, I.L.F.; Miranda, S.F.; Silva, M.S.R. 2005. Contribuição à hidroquímica de drenagens no Município de Manaus – AM. *Acta amazonica*, 35 (2), 119-124.

Howells, G.D. 1984. Fisheries decline: mechanisms and predictions. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 305, 529-547.

Hughely, J.E.; Keiter, E.A.; Keiter, R.L. 1993. *Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity*. Harper Collins, New York.

Hwang, P.P.; Lee, T.H. 2008. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, 148, 475-497.

Jobling, M. *Environmental biology of fishes*. 1995. Chapman & Hall, London. 455 p.

Jordão, C.P.; Pereira, M.G.; Bellato, C.R.; Pereira, J.L.; Matos, A.T. 2002. Assessment of water systems for contaminants from domestic and industrial sewages. *Environ. Monit. Assess.*, 79, 75-100.

Karbouj, R.; Desloges, I.; Nortier, P. 2009. A simple pre-treatment of aluminium cookware to minimize aluminium transfer to food. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 571–577.

Keinanen, M.; Peuranen, S.; Tigerstedt, C.; Vuorinen, P.J. 1998. Ion regulation in whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) yolk-sac fry exposed to low pH and aluminum at low and moderate ionic strength. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 40, 166-172.

Lapivaara, J.; Mikkonen, J.; Soimasuo, M. 2002. Attenuated carbohydrate and gill Na⁺, K⁺ - ATPase stress responses in Whitefish caged near bleached Kraft Mill discharges. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 51, 5-11.

Lara, L.B.L.S.; Artaxo, P.; Martinelli, L.A.; Victoria, R.L.; Camargo, P.B.; Krusche, A.; Ayers, G.P.; Ferraz, E.S.B.; Ballester, M.V. 2001. Chemical composition of rainwater and anthropogenic influences in the Piracicaba River Basin, Southeast Brazil. *Atmos Environ*, 35, 4937-4945.

Laudon, H.; Poleo, A.B.S.; Vollestad, L.A.; Bishop, K. 2005. Survival of brown trout during spring flood in DOC-rich streams in northern Sweden: the effect of present acid deposition and modelled pre-industrial water quality. *Environ. Pollut.*, 135, 121-130.

Lingwood, D., Harauz, G., Ballantyne, J.S. 2006. Decoupling the Na⁺/K⁺/ATPase in vivo: A possible new role in the gills of freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, 144, 451-457.

Lydersen, E., Rukke, N.W.A.; Jensen, J.G.B., Kjelsberg, B.M., Tornsjø, B.; Vogt, R.D.; Vøllestad, L.A.; Poléo, A.B.S. 2002. Seasonal variation in mortality of brown trout (*Salmo Trutta*) in an acidic Aluminium-Rich Lake. *J. Limnol.*, 61 (1) 61-68.

Mahieu, S.; Millen, N.; González, M.; Contini, M.D.C.; Elías, M.M. 2005. Alterations of the renal function and oxidative stress in renal tissue from rats chronically treated with aluminium during the initial phase of hepatic regeneration. *J. Inorg. Biochem.*, 99, 1858-1864.

Mallatt, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 42: 630-648.

Mannello, F.; Tonti, G.A.; Darbre, P.D. 2009. Concentration of aluminium in breast cyst fluids collected from women affected by gross cystic breast disease. *J. Applied Toxicol.*, 29, 1-6.

Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi, in: Medri, M.E., Bianchini, E., Shibatta, O., Pimenta, J.A. (Eds.), *A bacia do rio Tibagi*. Londrina, pp. 551-577.

Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2004. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.*, 64, 797-807.

Mazon, A.F.; Cerqueira, C.C.C.; Fernandes, M.N. 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the south american tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res. A*, 88, 52-63.

Monette, M.Y., McCormick, S.D. 2008. Impacts of short-term acid and aluminum exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar*) physiology: A direct comparison of parr and smolts. *Aquat. Toxicol.*, 86, 216-226.

Perry, S.F. 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.*, 45, 325-347.

Poleksić, V.; Mitrović-Tutundžić, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. 1994. In: Müller, R.; Lloyd, R. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Oxford: Fishing News Books, c.30, p.339-352.

Poléo, A.B.S., 1995. Aluminium polymerization – a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquat. Toxicol.*, 31, 347-356.

Poléo, A.B.S., Ostrabye, K., Osnevad, A.S., Andresen, R.A., Heibo, E., Vollestad, L.A., 1997. Toxicity of acid aluminium-rich water to seven freshwater fish species: a comparative laboratory study. *Environ. Pollut.*, 96, 129-139.

Randall, D.; Burggren, W.; French, K. 2000. *Eckert, fisiologia animal – mecanismos e adaptações*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Santos, E.E.; Lauria, D.C.; Porto da Silveira, C.L. 2004. Assessment of daily intake of trace elements due to consumption of foodstuffs by adults inhabitants of Rio de Janeiro city. *Sci. Total Environ.*, 327, 69-79.

Ščančar, J., Stibilj, V., Milačič, R., 2004. Determination of aluminium in slovenian foodstuff and its leachability from aluminium-cookware. *Food Chem.*, 151-157.

Schwaiger, J; Wanke, R.; Adam, S.; Pawert, M.; Honnen, W.; Triebs Korn, R. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.*, 6: 75-86.

Silva, A.G.; Martinez, C.B.R. 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 23, 185–192.

Silva, V.S., Nunes, A.M., Cordeiro, M.J., Calejo, A.I., Santos, S., Neves, P., Sykes, A., Morgado, F., Dunant Y., Gonçalves, P.P. 2007. Comparative effects of aluminum and ouabain on synaptosomal choline uptake, acetylcholine release and (Na⁺/K⁺)ATPase. *Toxicology*, 236, 158-177.

Simonato, J.D.; Albinati, A.C.; Martinez, C.B.R. 2006. Effects of the Water Soluble Fraction of Diesel Fuel Oil on Some Functional Parameters of the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 76, 505–511

Takasusuki, J., Araujo, M.R.R., Fernandes, M.N., 2004. Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72, 1075–1082.

Tammi, J., Rask, M., Vuorenmaa, J., Lappalainen, A., Vesala, S. 2004. Population responses of perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) to recovery from acidification in small Finnish lakes. *Hydrobiol.*, 528, 107-122.

Teh, S.J.; Adams, S.M.; Hinton, D.E. 1997. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat. Toxicol.*, 37: 51-70.

Teien, H.C., Kroglund, F., Salbu, B., Rosseland, B.O., 2006. Gill reactivity of aluminium species following liming. *Sci. Total Environ.*, 358, 206-220.

Thophon, S.; Kruatrachue, M.; Upatham, E.S.; Pokethitiyook, P.; Sahaphong, S.; Jaritkhuan, S. 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates*

calcarifer, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.*, 121: 307-320.

Vanzella, T.P.; Martinez, C.B.R.; Cólus, I.M.S. 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat. Res.*, 631, 36–43

Varsamos, S., Nebel, C., Charmantier, G. 2005. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, 141, 401-429.

Vuorinen, P.J.; Keinanen, M.; Peuranen, S.; Tigerstedt, C. 1999. Effects of iron, aluminium, dissolved humic material and acidity on grayling (*Thymallus thymallus*) in laboratory exposures, and a comparison with Brown trout (*Salmo trutta*). *Boreal Environ. Res.*, 3, 405-419.

Vuorinen, P.J., Keinanen, M., Peuranen, S., Tigerstedt, C., 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula* L.) in long-term exposure to acidity and aluminium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54, 255-276.

Wang, X.; Yin, Z. 1997. Using GIS to assess the relationship between land use and water quality at a watershed level. *Environ. Internat.*, 23: 103-14.

Waring, C.P., Brown, J.A., 1995. Ionoregulatory and respiratory responses of Brown trout, *Salmo trutta*, exposed to lethal and sublethal aluminium in acidic soft waters. *Fish Physiol. Biochem.*, 14, 81-91.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress in fish. *Physiol. Rev.*, 77, 591-625.

Wester, P.W.; Canton, J.H. 1991. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. *Comp. Biochem. Physiol. V.*, 100C, n.1/2. p. 115-117.

Wilkinson, K.J.; Campbell, P.G.C. 1993. Aluminum bioconcentration at the gill surface of juvenile atlantic salmon in acidic media. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 2083-2095.

Witters, H.E.; Van Puymbroeck, S.; Vanderborcht, O.I.J. 1992. Branchial and renal ion fluxes and transepithelial electrical potential differences in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of aluminium at low pH. *Environ. Biol. Fish.*, 34, 197-206.

Witters, H.E.; Puymbroeck, S.V.; Stouthart, J.H.X.; Wendelaar Bonga, S.E. 1996. Physicochemical changes of aluminium in mixing zone: mortality and physiological disturbances in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Environ. Toxicol. Chem.*, 15 (6), 986-996.

Wood, C.M., McDonald, D.G., 1982. Physiological mechanisms of toxicity to fish, in: Acid rain fisheries. Johnson, R.E. (Ed.), Bethesda, American Fisheries Society.

Wood, C.M.; Playle, R.C.; Simons, B.P.; Goss, G.G.; McDonald, D.G. 1988. Blood gases, acid-base status, ions and hematology in adult brook trout (*Salvelinus fontinalis*) under acid/aluminum exposure. Can. J. Aquat. Sci., 45, 1575-1586.

Ytrestoyl, T.; Finstad, B.; McKinley, R.S. 2001. Swimming performance and blood chemistry in Atlantic salmon spawners exposed to acid river water with elevated aluminium concentrations. J. Fish Biol., 58, 1025-1

PARTE II

Análise funcional



**EXPOSIÇÃO AO ALUMÍNIO PROMOVE DISTÚRBIOS
OSMORREGULATÓRIOS NO PEIXE DULCÍCOLA
NEOTROPICAL *Prochilodus lineatus***

**Marina M. P. Camargo^{a,b}; Marisa N. Fernandes^a e
Cláudia B. R. Martinez^b**

^aDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luis, Km 235, 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil;

^bDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid (PR- 445), Km 374, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

Nota: Artigo original aceito para publicação no periódico “Aquatic Toxicology” (*Elsevier*)

RESUMO

Exemplares juvenis do peixe neotropical *Prochilodus lineatus* foram expostos a $196 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al dissolvido em água ácida (grupo Al), somente à água ácida (grupo pH) ou à água com pH neutro (grupo CTR) por 6, 24 e 96h. Os efeitos do Al foram avaliados em parâmetros hematológicos (hemoglobina, hematócrito, número de eritrócitos), osmo-iônicos (íons, osmolaridade, densidade e distribuição de células-cloreto (CC) e a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias), metabólicos (proteínas e glicose) e endócrino (cortisol). Os peixes expostos ao Al tiveram todos os parâmetros hematológicos e metabólicos aumentados em relação ao CTR. Nos peixes expostos ao Al por 24 e 96h os parâmetros osmo-iônicos foram significativamente menores e a identificação da enzima Na^+/K^+ -ATPase por imunohistoquímica mostrou uma redução no número de CC nas brânquias. A atividade da enzima foi cerca de 50% menor nos animais expostos ao Al em todos os tempos. Considerando todos os resultados juntos, foi possível notar que exposições agudas ao Al causaram desequilíbrios iônicos, provavelmente devido aos efeitos do Al sobre a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase, à distribuição e número das CC assim como aos efeitos associados à resposta de estresse causada pela presença do metal.

Palavras-chave: alumínio, células-cloreto, brânquias, enzima Na^+/K^+ -ATPase branquial, resposta de estresse.

1. Introdução

O alumínio é o metal mais abundante da crosta terrestre e ocorre principalmente como óxidos e silicatos de alumínio (Sčančar et al., 2004). O alumínio é também encontrado no ar atmosférico de grandes cidades e áreas industrializadas (Casarini et al., 2001), além de ser usado como agente floculante no tratamento de água (Silva et al., 2007). Algumas áreas da Inglaterra, Estados Unidos e República Tcheca mostraram altas concentrações de Al na água de seus rios, alcançando valores de até $1350 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al total devido à poluição do ar e chuvas ácidas (Guibaud e Gualthier, 2003). No Brasil, esse metal é naturalmente encontrado no solo da região Amazônica onde as águas dos rios e córregos tem naturalmente pH baixo (Hara e Oliveira, 2004; Artaxo et al., 2005; Horbe et al., 2005). No Estado de São Paulo (sudeste do Brasil), 35% dos pontos avaliados em águas superficiais destinadas ao consumo humano contem altos níveis de Al dissolvido (de 100 a $5700 \mu\text{g.L}^{-1}$) (CETESB, 2008). Ainda, de acordo com a legislação brasileira, os limites para Al dissolvido em água doce ficam entre 100 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ (CONAMA 357, 2005).

O alumínio é muito tóxico para os peixes e a maioria dos estudos sobre toxicidade desse metal é restrita à espécies de peixes do Hemisfério Norte (Peuranen et al., 2002; McCartney et al., 2003; Silva et al., 2007; Monette e McCormick, 2008). Em áreas tropicais e neotropicais esses estudos ainda são raros (Barcarolli e Martinez, 2004), deixando uma lacuna no conhecimento sobre os efeitos fisiológicos do Al em espécies neotropicais de peixes, onde as altas temperaturas naturais da água podem ainda aumentar sua toxicidade (Lydersen et al., 1990).

A maioria dos estudos sobre a toxicidade do Al inclui também a relação do pH da água, já que a solubilidade do Al aumenta linearmente com a redução do pH, aumentando a presença de Al inorgânicos, a forma mais tóxica para os peixes (Gensemer e Playle, 1999). Por outro lado, a acidez por si só, causa vários efeitos nos peixes, como problemas hematológicos (Wood e McDonald, 1982; Carvalho e Fernandes, 2006), endócrinos e metabólicos (Cole et al., 2001) e reprodutivos (Vuorinen et al., 2003). Entretanto, quando a acidez é associada ao Al na água, os efeitos parecem se concentrar principalmente nas brânquias e nos processos fisiológicos relacionados a esse órgão (Waring e Brown, 1995; Cole et al., 2001; Teien et al., 2006). As brânquias são órgãos multifuncionais com especial importância

na osmorregulação de peixes (Hwang e Lee, 2008). Este órgão representa o principal órgão-alvo para poluentes devido sua extensa área de superfície em contato com o meio externo e a barreira muito estreita que oferece entre o ambiente e o meio interno do peixe (Dang et al., 2000; Cerqueira e Fernandes, 2002). Brânquias são os órgãos mais afetados pela contaminação por Al (Playle e Wood, 1990; Dietrich e Schlatter, 1989; Exley et al., 1991; Witters et al., 1992; Peuranen et al., 1993; Peuranen et al., 2002).

Nas brânquias, o principal tipo celular relacionado com a regulação iônica são as células-cloreto (Hirose et al., 2003), que estão localizadas principalmente nos filamentos branquiais, próximas da base da lamela (Perry, 1997; Hirose et al., 2003). Células-cloreto (CC) são grandes e arredondadas e caracterizadas por muitas mitocôndrias e um sistema tubular muito extenso, contendo alta densidade de atividade de Na^+/K^+ -ATPase (Dang et al., 2000).

Para manter a homeostase dos fluidos corporais, teleósteos de água doce compensam a perda iônica por difusão e o ganho osmótico de água absorvendo ativamente Na^+ , Cl^- e Ca^{+2} , pelas brânquias e produzindo grandes volumes de urina diluída, respectivamente (Hirose et al., 2003). Então, a análise dos íons e da osmolaridade do plasma, associada com a densidade e localização das CC, além da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase, que transporta ativamente íons nas brânquias, activity, podem ajudar no entendimento dos mecanismos pelos quais o Al é tóxico para teleósteos dulcícolas (Peuranen et al., 1993; Vuorinen et al., 2003). Portanto, no presente estudo foi realizada uma abordagem integrada examinando parâmetros osmo-iônicos e hematológicos além de outros associados com a resposta de estresse para avaliar os efeitos de exposições agudas ao Al em pH ácido na osmorregulação do peixe *Prochilodus lineatus*. Esta espécie foi escolhida por ser representativa da iciofauna neotropical e ser comumente encontrada em rios das regiões Sul e Sudeste do Brasil, além de ser considerada uma espécie bioindicadora em potencial (Martinez et al., 2004; Takasusuki et al., 2004; Simonato et al., 2006; Vanzella et al., 2007).

2. Material e métodos

Juvenis de *P. lineatus* (Valenciennes, 1847) (n = 115) com peso de $20,07 \pm 6,08$ g e comprimento total de $12,23 \pm 1,23$ cm (média \pm DP) foram obtidos na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina. Antes dos experimentos os peixes

foram aclimatados por 7 dias, em tanques de 300L com água não-clorada, aeração constante e fotoperíodo de 12h:12h. Durante a aclimatação, os animais foram alimentados a cada 2 dias, com ração comercial com 36% de proteína (Guabi®, BR) sendo a alimentação suspensa 24h antes do início dos testes de toxicidade. Os parâmetros físicos e químicos da água foram continuamente monitorados ($T = 21,8 \pm 0,9$ °C; $pH = 7,5 \pm 0,1$; $OD = 7,5 \pm 0,7$ mgO₂.L⁻¹; condutividade = $133,4 \pm 9,7$ μS.cm⁻¹; dureza = $42,5 \pm 6,0$ mg.CaCO₃.L⁻¹).

Depois da aclimatação, grupos de peixes (de 6 a 7 por aquário) foram transferidos para aquários de vidro de 100L cada, contendo água como o seguinte: peixes dos grupos CTR em água com pH neutro; peixes dos grupos pH em água com pH ácido ($\approx 5,0$); peixes dos grupos Al em água com pH ácido ($\approx 5,0$) + alumínio. O pH ácido foi conseguido pela adição de HCl 50% e o Al foi adicionado na concentração nominal de 1000 μg.L⁻¹ na forma de Al₂(SO₄)₃. Os testes de toxicidade em cada tempo experimental (6, 24 e 96 h) foram desenvolvidos separadamente em diferentes aquários. Todos os testes foram realizados com duplicatas.

Durante dos testes, a água foi monitorada para temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade. Amostras de água foram coletadas imediatamente após cada tempo experimental e foram analisadas para concentração de Al dissolvido e Al total, usando espectrometria de absorção atômica. A concentração de Al total foi determinada em amostras de água não-filtradas e a concentração de Al dissolvido foi determinada em amostras de água filtradas (0,45 μm); para ambas análises, amostras foram acidificadas com HNO₃.

Depois de cada período experimental, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1 g.L⁻¹) e amostras de sangue foram retiradas pela veia caudal por meio de seringas heparinizadas. Os animais foram então mortos por secção medular e as brânquias foram removidas e processadas para imunohistoquímica contra a enzima Na⁺/K⁺-ATPase e para o ensaio enzimático. Imediatamente após a amostragem, o sangue foi centrifugado (10 min, 10.000 g) e as amostras de plasma foram congeladas (-20°C) para medição posterior da osmolaridade, concentrações de íons, cortisol, proteínas e glicose.

2.1. Análises hematológicas

Amstras de sangue foram usadas para a determinação de hemoglobina (Hb), hematócrito (Hct) e contagem de células vermelhas (RBC). Hct foi determinado pela técnica de micro-hematócrito, usando capilares heparinizados e centrifugados por 5 min em centrífuga apropriada. A Hb foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, UK) usando um kit comercial (Analysa, Brazil). O RBC foi contado em amostras de sangue fixadas com tampão formol citrato, usando uma câmara de Neubauer espelhada, em microscópio de luz (magnificação de 400x).

2.2. Identificação das células-cloreto nas brânquias

As brânquias foram lavadas com solução salina e amostras de 4 arcos braquiais foram fixadas com Bouin por (6h), desidratadas em séries crescentes de etanol e embebidas em parafina. Cortes sagitais (8 μ m de espessura) foram feitos e processados de acordo com a técnica do complexo avidin-biotin-peroxidase (ABC) para visualizar as células-cloreto, por meio da identificação da enzima Na^+/K^+ -ATPase, de acordo com o método descrito por Dang et al. (2000). Os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal de rato para Na^+/K^+ -ATPase (IgG α 5) e como segundo antisoro foi usado o IgG goat-anti-mouse. Subsequentemente, 3-3'-diaminobenzidina (DAB) em tampão Tris-salino, contendo H_2O_2 (0,03%) foi aplicado e finalmente os cortes foram desidratados e montados.

As células-cloreto foram quantificadas em relação ao comprimento do filamento (mm) de acordo com sua localização: no filamento (CCF) ou nas lamelas (CCL), usando um fotomicroscópio (DM 2500, Leica, Germany) e um analisador de imagens (Leica *Qwin*, Germany). Para cada corte do mesmo peixe, 5 filamentos foram escolhidos e medidos ao acaso e tiveram as CC quantificadas. Os resultados foram expressos como número de CC por mm de filamento (média \pm DP).

2.3. Atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias

Após a lavagem dos arcos branquiais, os filamentos foram removidos e transferidos para tubos plásticos contendo tampão SEI (sacarose, Na_2EDTA e imidazol, β -mercaptoethanol, pH 7,4) e então mantidos congelados (-20°C) até o momento do ensaio enzimático. Para o ensaio, os filamentos foram homogeneizados

com o tampão SEI (10x o volume) e centrifugados (10.000 g, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi usado para determinar a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase, de acordo com o método descrito por Quabius et al., (1997) e adaptado para leitora de microplacas por Nolan (2000). O ensaio consiste em determinar a liberação de fosfato pelas amostras incubadas em tampão (NaCl, MgCl₂, imidazol, EDTA, ATP, pH 7,6) contendo KCl ou ouabaína. Uma solução de fosfato de 0,65 mM (Sigma) foi usada como padrão e as amostras foram analisadas em triplicatas a 620 nm em uma leitora de microplacas (ELX 800, BioTek, USA). A atividade da Na⁺/K⁺ ATPase foi expressa como $\mu\text{mol Pi/mg protein.h}^{-1}$.

2.4. Análises osmo-iônicas

As concentrações de Na⁺ e K⁺ foram medidas no plasma usando um fotômetro de chama (Analyzer, Brazil). A concentração de Cl⁻ foi determinada pelo método do tiocianato em espectrofotômetro a 470 nm (kit comercial, Analisa, Brazil). A osmolaridade foi determinada por congelamento usando-se um osmômetro apropriado (Osmomat 030, Gonotec, Germany).

2.5. Concentrações plasmáticas de cortisol, glicose e proteínas

O cortisol foi determinado no plasma por meio de kit comercial imunoenzimático (Diagnostic Systems, Laboratories, USA), e a absorbância foi lida em leitora de microplacas a 450nm. A concentração de glicose foi determinada usando um kit comercial colorimétrico, (Labstest, Brazil) a 505 nm em espectrofotômetro. A concentração plasmática de proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.6. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm DP. Os resultados obtidos em cada tratamento (CTR, pH ou Al), em cada tempo experimental (6, 24 ou 96h), foram comparados usando análise de variância fator único (ANOVA) ou o teste de Kruskal-Wallis, dependendo da normalidade e homogeneidade dos dados. As eventuais diferenças foram identificadas pelo post hoc teste de Tukey, com comparações entre todos os tratamentos. Diferenças estatísticas foram consideradas quando $P < 0,05$.

3. Resultados

Os valores dos parâmetros físicos e químicos da água em cada grupo experimental de cada período experimental estão mostrados na Tabela 1. Valores de temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade e dureza não variaram significativamente entre os grupos. Somente um peixe do grupo Al morreu após 24h de exposição. Nenhum peixe morreu nos demais grupos.

Tabela 1. Parâmetros físicos e químicos das amostras de água coletadas nos diferentes grupos durante os testes (6, 24 e 96h).

Parâmetro	grupo CTR	grupo pH	grupo Al
Temperatura (°C)	22,4 ± 0,5	22,4 ± 0,5	22,5 ± 0,5
pH	7,6 ± 0,5	5,1 ± 0,3	5,2 ± 0,1
Oxigênio dissolvido (mgO ₂ .L ⁻¹)	7,6 ± 1,0	7,4 ± 0,9	7,5 ± 0,8
Condutividade (µS.cm ⁻¹)	83,7 ± 23,6	104,1 18,3	104,6 15,0
Dureza (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	41,3 ± 7,9	41,6 ± 5,9	44,1 ± 7,3
Al total (µg.L ⁻¹)	ND	ND	438,00 ± 36,33
Al dissolvido (µg.L ⁻¹)	ND	ND	196,00 ± 26,08

Estes valores significam média ± DP (n = 5). ND: não detectado.

A concentração de hemoglobina, o hematócrito e a contagem de células vermelhas do sangue foram maiores nos animais expostos ao Al e ao pH do que os do CTR após 24 e 96h (Fig. 1). Após 6h de exposição, somente os peixes do Al mostraram Hb e RBC elevados.

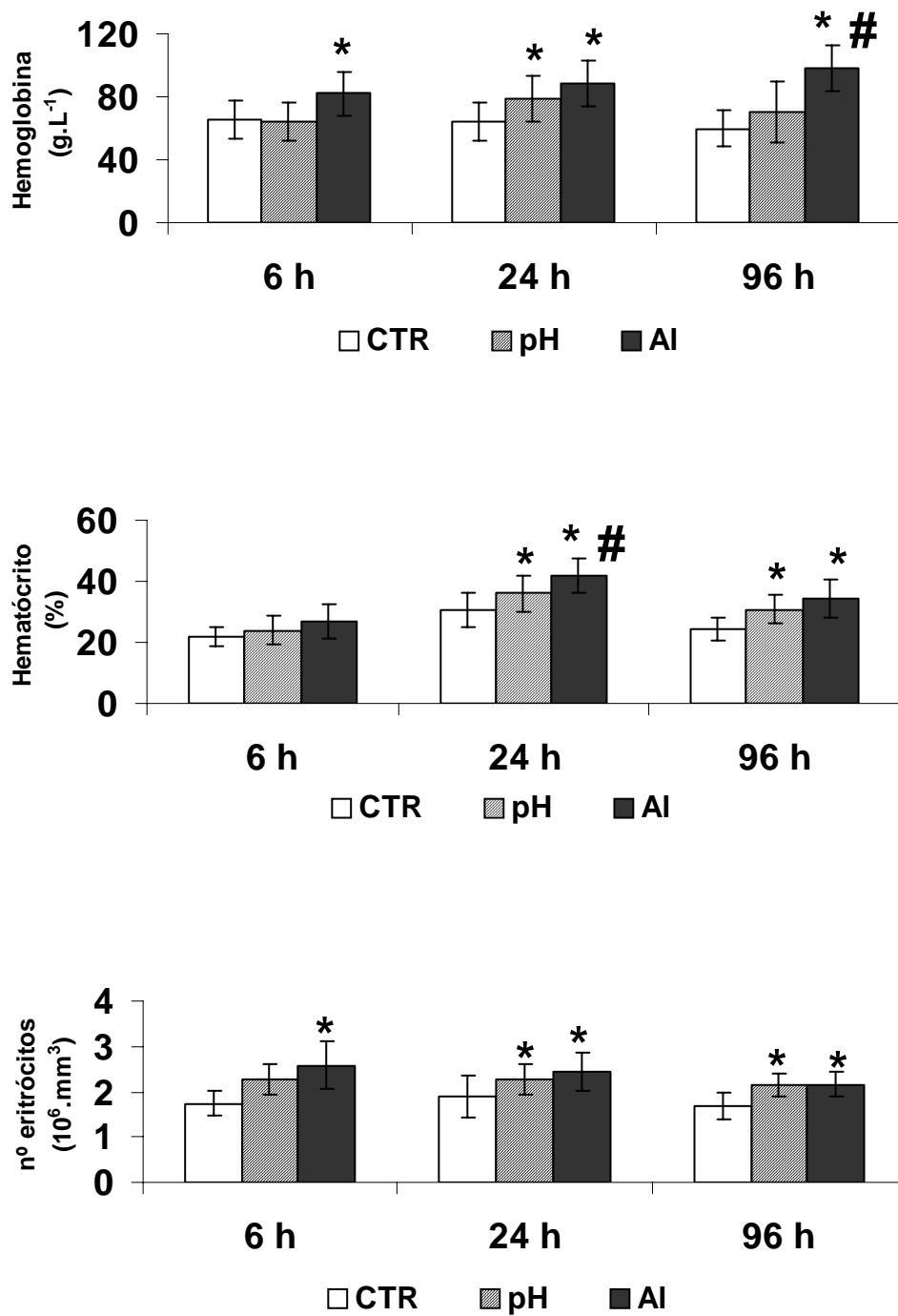


Fig. 1. Hemoglobina (A), hematócrito (B) e número de células vermelhas (C) de *P. lineatus* expostos por 6, 24 e 96h aos grupos CTR, pH ou AI. As barras indicam média e as linhas verticais o DP. * indica diferença significativa em relação ao grupo CTR e # indica diferença estatística em relação ao grupo pH para cada tempo experimental ($P < 0,05$)

Os peixes expostos ao Al por 24 e 96h mostraram redução significativa na osmolaridade plasmática, assim como nos íons sódio e cloreto quando comparados aos grupos CTR. (Figs. 2A, 2B, 2C). Não houve diferença significativa nesses parâmetros nos animais expostos somente ao pH ácido quando comparados aos grupos CTR. As concentrações plasmáticas de potássio mostraram grandes variações entre os diferentes tempos e grupos experimentais (Fig. 2D).

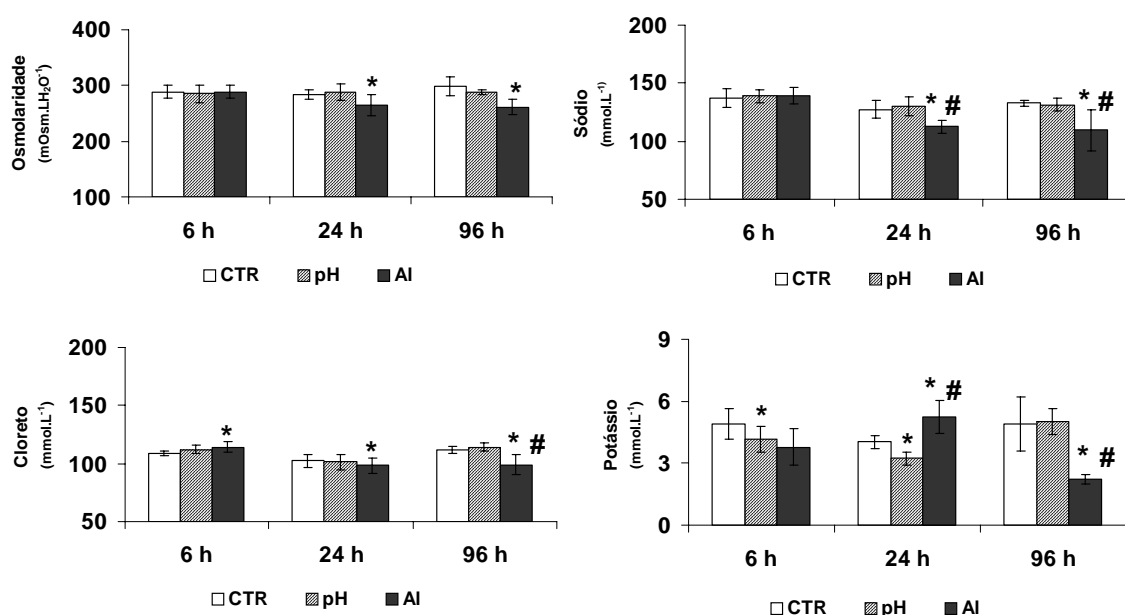


Fig. 2. Osmolaridade plasmática (A) e concentrações plasmáticas de sódio (B), cloreto (C) e potássio (D) de *P. lineatus* expostos por 6, 24 e 96h aos grupos CTR, pH ou Al. As barras indicam média e as linhas verticais o DP. * indica diferença significativa em relação ao grupo CTR e # indica diferença estatística em relação ao grupo pH para cada tempo experimental ($P < 0,05$).

Os peixes dos grupos Al mostraram altos níveis de glicose e proteínas totais quando comparados aos dos grupos CTR e pH, em todos os períodos experimentais (Figs. 3A, 3B). As concentrações plasmáticas de cortisol não variaram significativamente entre os diferentes tratamentos (Fig. 3C).

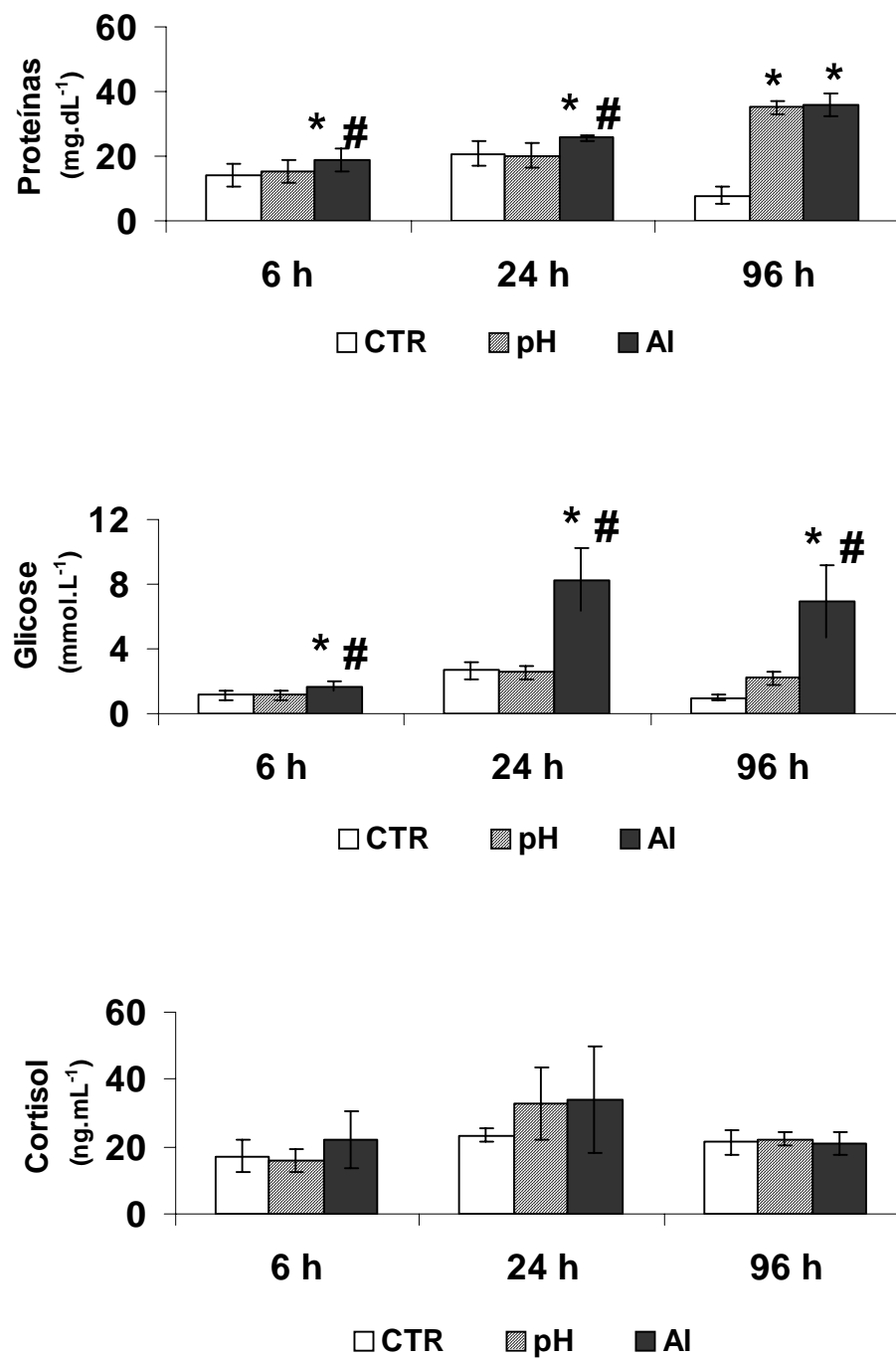


Fig. 3. Concentração plasmática de proteínas (A), glicose (B) e cortisol (C) de *P. lineatus* expostos por 6, 24 e 96h aos grupos CTR, pH ou AI. As barras indicam média e as linhas verticais o DP. * indica diferença significativa em relação ao grupo CTR e # indica diferença estatística em relação ao grupo pH para cada tempo experimental ($P < 0,05$).

A imunohistoquímica revelou que os *P. lineatus* dos grupos CTR mostraram mais CC distribuídas pelos filamentos e lamelas (Fig. 4A) do que os demais grupos. A exposição à água ácida aumentou o número de CC nos filamentos e nas lamelas (Fig. 4B), entretanto, os animais expostos ao Al mostraram grande redução no número de CC nas lamelas e nos filamentos (Fig. 4C).

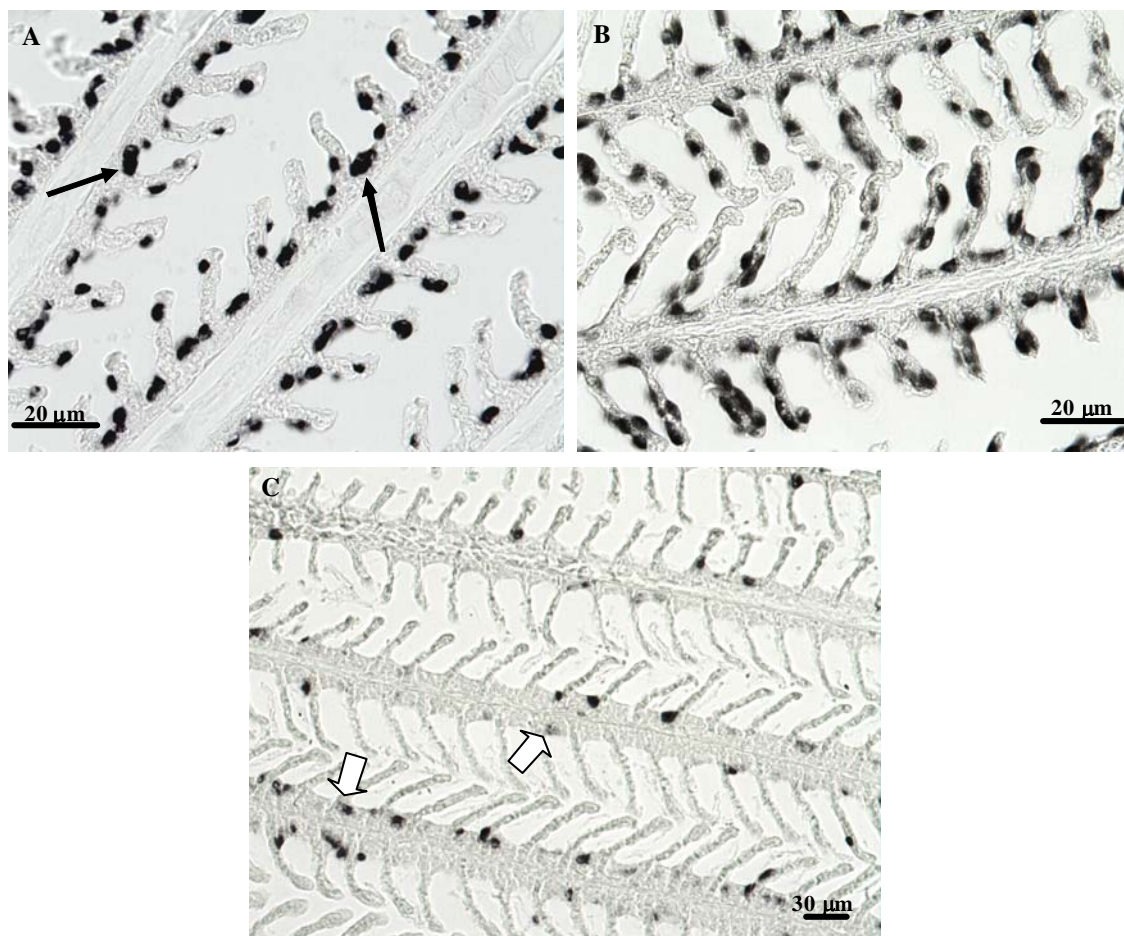


Fig. 4. Localização imunohistoquímica da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas células-cloreto de *P. lineatus* usados no experimento de 96h. As setas indicam forte imunoreatividade da Na^+/K^+ -ATPase nos peixes do grupo CTR (A). Nas brânquias dos peixes expostos ao pH (B) nota-se um aumento no número de CC nas lamelas e nos filamentos. Já nos animais expostos ao Al (C) as setas brancas indicam CC fracamente coradas e um número menor de células no epitélio como um todo. Barra de aumento 30 μm .

A Figura 5 mostra as alterações na densidade e localização das CC nos animais dos grupos CTR, pH e Al. No geral, a exposição ao pH ácido induziu um aumento na densidade de CC tanto no filamento como nas lamelas. Ao contrário, a exposição ao Al, mesmo que em pH ácido, resultou em uma redução significativa das CC nas lamelas já após 6h e nas lamelas e filamentos após 24 e 96h. A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias dos peixes expostos ao Al, em todos os períodos experimentais, mostrou-se inibida (em média 50% de inibição) quando comparada aos animais dos grupos CTR (Fig. 6), cuja atividade da Na^+/K^+ -ATPase teve um valor médio de $1,22 \mu\text{M Pi/mg protein.h}^{-1}$. A exposição ao pH ácido não resultou em diferenças significativas na atividade da enzima, em relação aos grupos CTR (Fig. 6).

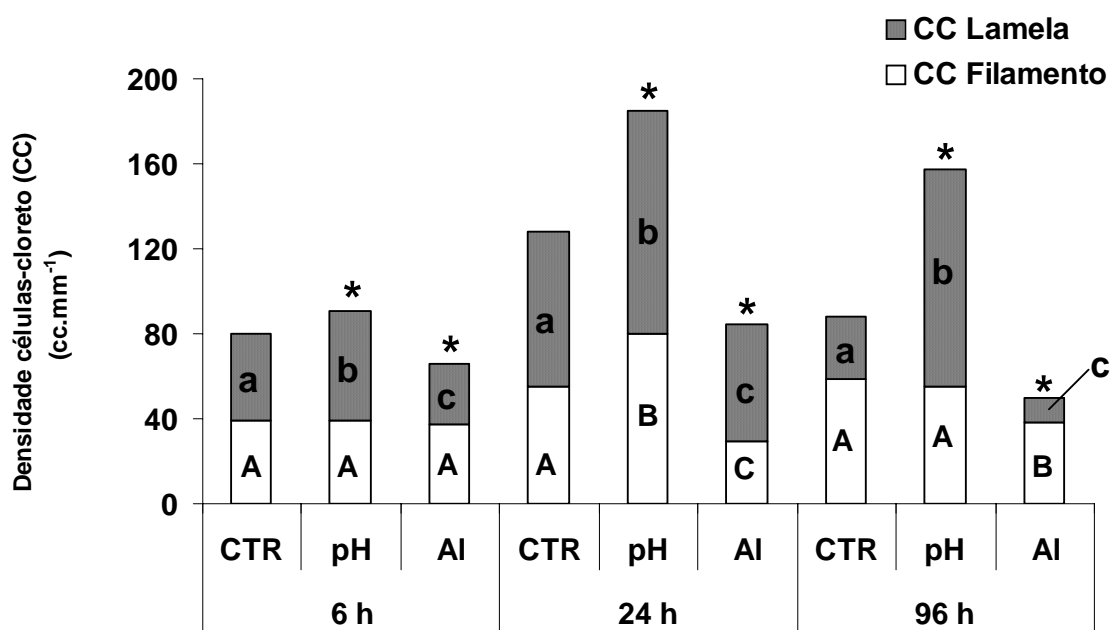


Fig. 5. Densidade de células-cloreto nas lamelas e nos filamentos das brânquias de *P. lineatus* expostos por 6, 24 e 96h aos grupos CTR, pH ou Al. * indica diferença significativa no número total de CC em relação aos respectivos grupos CTR; letras minúsculas são relacionadas às CC das lamelas e letras maiúsculas referem-se às CC do filamento. Letras diferentes indicam diferença estatística para cada parâmetro em cada período experimental ($P < 0,05$).

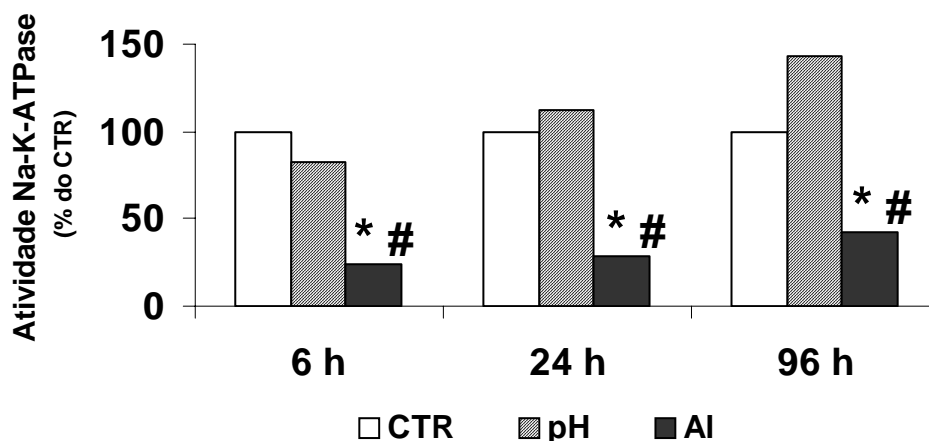


Fig. 6. Porcentagem da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias de *P. lineatus* expostos por 6, 24 e 96h aos grupos CTR, pH ou Al. * indica diferença estatística em relação aos grupos CTR e # indica diferença estatística em relação aos grupos pH para cada tempo experimental ($P < 0,05$).

4. Discussão

O peixe dulcícola neotropical *P. lineatus* exposto ao alumínio, em água com pH baixo (pH = 5,0), exibiu problemas osmorregulatórios indicados pela diminuição das concentrações plasmáticas de Na^+ and Cl^- , devido provavelmente à redução da densidade de CC nas brânquias e conseqüentemente a redução da atividade da Na^+/K^+ -ATPase. Resposta de estresse, suportada pelo alto nível de glicose no plasma, pode também ter corroborado com a perturbação osmo-iônica.

A concentração de Al dissolvido e o valor de pH usados nesse estudo já foram relatados em água superficiais no Brasil (Lara et al., 2001; Flues et al., 2002 ; Migliavacca et al., 2005; CETESB, 2008) devido a causas naturais ou emissões antropogênicas. A concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al dissolvido corresponde à máxima concentração permitida pela legislação brasileira para água doce. Entretanto, os resultados do presente estudo claramente mostram que valores próximos dessa concentração promovem sérios efeitos na osmorregulação de peixes.

A água com pH de 5,0 não é letal para *P. lineatus* (Takasusuki et al, 2004) embora já tenha sido relatado que esse valor é o máximo tolerado para a maioria dos peixes de água doce (Playle e Wood, 1990; Poléo, 1995; Waring e Brown, 1995). Valores de

pH entre 6,0 e 9,0 são recomendados para ambientes dulcícolas e proteção das comunidades de peixe no Brasil (CONAMA 357, 2005). Entretanto, episódios de rápida acidificação em corpos de água continental podem ocorrer durante acidentes ecológicos. Em tais casos, o Al do solo é mobilizado promovendo alta elevação no alumínio em sua forma dissolvida e mais tóxica, afetando os peixes (Monette e McCormick, 2008).

No presente estudo, o aumento do Hct e da contagem do RBC após 24 e 96h de exposição ao pH ácido ou ao Al em pH ácido não podem ser considerados bons indicadores da exposição ao Al, como sugerido por Whitters et al. (1996), pelo menos para *P. lineatus*. Mudanças nos parâmetros de sangue da mesma espécie expostas somente à água ácida (pH=4,5 at 20 and 30°C) foram descritas por Carvalho e Fernandes (2006). O número aumentado de RBC e conteúdo de Hb podem representar resposta secundária de estresse, que leva ao aumento das células vermelhas na circulação, por causa da contração do baço, para melhorar a tomada de O₂ para o metabolismo (Brown, 1993; Wendelaar Bonga, 1997; Hontela, 1998). Parâmetros sanguíneos elevados também foram descritos em peixes Salmoniformes, tais como *Salmo trutta* e *Oncorhynchus mykiss*, e no peixe neotropical *Leporinus macrocephalus* depois de exposição aguda ao Al em água ácida (Dietrich e Schlatter, 1989; Whitters et al., 1990; Whitters et al., 1996; Barcarolli e Martinez, 2004). Nesses trabalhos, as concentrações de Al variaram de 15 a 200 µg.L⁻¹. Poléo e Hytterod (2003) também registraram parâmetros sanguíneos elevados em salmões expostos ao Al em concentrações de 28 a 359 µg.L⁻¹ em águas alcalinas.

Resposta de estresse em *P. lineatus* também foi indicada pelo aumento da glicose no plasma após 6h de exposição ao Al. A elevação da glicose no plasma é uma resposta típica de qualquer animal enfrentando uma situação estressante (Brown, 1993; Lohner et al., 2001) e é mediada pela liberação de catecolaminas e do cortisol. O aumento da glicose no plasma foi resultado de processos gliconeogênicos ou da glicogenólise hepática para suprir a demanda energética causada pelo estresse (Whitters et al., 1996). Hiperglicemia já foi reportada, por vários autores, em peixes expostos ao cobre (Tavares-Dias et al., 2002), ao alumínio (Whitters et al., 1996; Barcarolli e Martinez, 2004) e outras situações estressantes diferentes (Mommensen et al., 1999). Como as catecolaminas são rapidamente eliminadas da circulação, a manutenção dos altos níveis de glicose, como observados no presente estudo, pode ser

resultado da liberação do cortisol, que deve ter ocorrido logo após a exposição ao poluente (Iwama et al., 2004). O cortisol é o principal hormônio corticosteróide em peixes, e os agentes tóxicos podem interferir em sua dinâmica (Mommsen et al., 1999). A ausência de alterações significativas no cortisol plasmático, no presente estudo, corrobora com dados previamente descritos por Langiano e Martinez (2008) e Pereira-Maduenho e Martinez (2008), para peixes da mesma espécie submetidos a diferentes agentes estressores. No geral, o aumento de cortisol ocorre entre 0,5 e 1h após a exposição ao contaminante (Barton, 2002) retornando aos níveis basais depois de alguns minutos ou poucas horas (Mommsen et al., 1999; Sloman et al., 2001, Iwama et al., 2004). A mobilização de reservas energéticas como parte da resposta de estresse também inclui o metabolismo proteico (Heath, 1987; Adams et al., 1990; Mommsen et al., 1999). No caso do presente estudo, os altos valores de proteínas totais observados nos animais expostos ao Al podem ser resultantes de dois eventos: mobilização de proteína para suprir a alta demanda energética imposta pelo estresse ou ainda, danos celulares com liberação de proteínas devido à ação direta do metal sobre as células (Exley et al., 1991 ; Wilson, 1996).

Metais na água podem agir diretamente ou indiretamente sobre as brânquias via hormônios de estresse causando mudanças na homeostase osmo-iônica. Peixes dulcícolas sofrem um influxo passivo de água e um efluxo de íons; equilibrando o fluxo osmótico por meio da excreção de grandes volumes de urina diluída e da tomada ativa de íons pelas brânquias (Goss et al., 1998; Evans et al., 2005; Lingwood et al., 2006; Hwang e Lee, 2008). O alumínio, em concentrações entre 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e em pH próximo de 5,0, interage com as brânquias e favorece a perda de eletrólitos (Dietrich e Schlatter, 1989; Exley et al., 1991). Entretanto, os presentes resultados sugerem que o Al interfira na tomada de sódio pelas brânquias de *P. lineatus*. Reduções nas concentrações plasmáticas de íons em peixes expostos ao Al já foram extensivamente relatadas (Dietrich and Schlatter, 1989; Exley et al., 1991; Wilkinson e Campbell, 1993; Witters et al., 1996). Níveis de sódio e cloreto reduzidos no plasma foram encontrados em *Leporinus macrocephalus* expostos ao Al em pH ácido (Barcarolli e Martinez, 2004) e em salmões em condições similares (Monette e McCormick, 2008).

Concentrações iônicas reduzidas no plasma não podem ser relacionadas apenas à redução na tomada ativa de íons, o aumento na permeabilidade paracelular no epitélio

branquial, que aumenta o efluxo passivo de íons, pode representar outra causa (Monette e McCormick, 2008). Nesse estudo, as análises das células-cloreto (CC) e da enzima Na^+/K^+ -ATPase foram usadas como uma forma de entender qual estágio da osmorregulação pode estar sendo prejudicado pela exposição ao Al.

A Na^+/K^+ -ATPase é uma proteína integral de membrana que usa a energia da hidrólise do ATP para transportar 2K^+ para dentro da célula e 3Na^+ para fora desta, para o sangue, possuindo grande importância nas brânquias de teleosteos (Lingwood et al., 2006; Silva et al., 2007; Hwang e Lee, 2008). Existe uma correlação positiva entre a coloração da CC com a atividade dessa enzima no epitélio branquial (Wandelaar Bonga et al., 1990; Dang et al., 2000). No presente estudo, a baixa atividade da Na^+/K^+ -ATPase determinada nas brânquias dos peixes expostos ao Al pode ser relacionada à baixa atividade dessa enzima nas CC fracamente coradas e no número reduzido de CC encontradas nos filamentos branquiais (devido à morte dessas células por apoptose e/ou necrose). Monette e McCormick (2008) também observaram resultados semelhantes em juvenis de salmões expostos ao Al em pH ácido. Estes autores afirmam que as CC são o principal local de acúmulo de Al nas brânquias, e conseqüentemente a morte dessas células facilitaria a eliminação do metal do órgão. As poucas CC notadas nos peixes expostos ao Al parecem estar deslocadas para a região lamelar mais do que no filamento. Dang et al. (2000) obtiveram resultados semelhantes com *Oreochromis mossambicus* expostos ao cobre, i.e., tanto número reduzido de CC nos filamentos como “migração” destas para as lamelas. CC nas lamelas branquiais estariam mais próximas da corrente sangüínea, facilitando a tomada de íons, o que também pode significar que estas células sejam mais resistentes ao metal do que as CC que permanecem no filamento (Dang et al., 2000). Algumas das CC que foram encontradas nas lamelas podem ainda representar células imaturas, que contendo uma menor quantidade ou atividade da Na^+/K^+ -ATPase, acabam menos coradas pela técnica de imunohistoquímica. A presença destas células imaturas pode representar a ação do cortisol, que interfere na diferenciação das CC. No presente estudo, esta idéia foi suportada ainda pela ocorrência de respostas secundárias de estresse (tais como o aumento da glicose no plasma e as respostas hematológicas). Além disso, é importante ressaltar que células-cloreto imaturas podem ter maiores concentrações de metalotioneínas, proteínas que se ligam aos metais, protegendo os tecidos contra a ação direta dos íons metálicos (Dang et al., 2000).

O aumento no número das CC nos peixes expostos somente à água ácida em todos os tempos experimentais pode estar mais relacionado à manutenção do balanço ácido-básico (Clairborne et al., 2002; Sakuragui et al., 2003; Hwang e Lee, 2008), do que diretamente à tomada de íons nesses peixes. Takasusuki et al. (2004) estabeleceram uma alta tolerância a mudanças de pH para o *P. lineatus*, entretanto, um pH de 4,5 é mais danoso à esta espécie do que um pH de 8,0.

Até o momento, não se tem determinado o papel exato das CC no transporte de Cl^- e Na^+ nas brânquias e na regulação ácido-básica. A troca de HCO_3^- pelo Cl^- juntamente com a H^+ /ATPase para eliminar H^+ cria um potencial elétrico que favorece o influxo de Na^+ (Hwang e Lee, 2008). Isso pode explicar, ao menos em parte, o aumento desse tipo celular em *P. lineatus* expostos ao baixo pH, permitindo que os peixes mantenham uma excreção eficiente de H^+ e de regulação iônica. A H^+ /ATPase já foi encontrada tanto nas CC como nas células pavimentosas da brânquia (Goss et al., 1998; Clairborne et al., 2002; Hwang e Lee, 2008).

Em resumo, o presente estudo aponta resultados relevantes sobre a toxicidade do Al em água ácida para a espécie de peixe neotropical, mostrando que *P. lineatus* sofreram várias alterações osmo-iônicas. As causas do desequilíbrio iônico provavelmente estão relacionadas aos efeitos do Al na atividade da Na^+/K^+ -ATPase, na distribuição e número das CC nas brânquias assim como aos efeitos associados à resposta de estresse causada pela presença do metal.

Referências

- Adams, S.M., Shugart, L.R., Southworth, G.R., Hinton, D.E., 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress, in: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 333-353.
- Artaxo, P.; Gatti, L.V.; Leal, A.M.C.; Longo, K.M.; Freitas, S.R.; Lara, L.L.; Pauliquevis, T.M.; Procópio, A.S.; Rizzo, L.V. 2005. Química atmosférica na Amazônia: A floresta e as emissões de queimadas controlando a composição da atmosfera amazônica. *Acta amazonica*, 35 (2) 185-196.
- Barcarolli, I.F., Martinez, C.B.R., 2004. Effects of aluminium in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72, 639-646.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ. Comp. Biol.* 42, 517–525.
- Brown, J.A., 1993. Endocrine responses to environmental pollutants, in: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (Eds.), *Fish ecophysiology*. Chapman & Hall, London, pp.276-296.
- Carvalho, C.S.; Fernandes, M.N. 2006. Effects of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, 251, 109-117.
- Casarini, D.C.P., Dias, C.L., Alonso, C.D., 2001. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. Série Relatórios, Cetesb, São Paulo.
- CETESB, 2008. Cetesb – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - Relatório da qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2007. Série Relatórios, Cetesb, São Paulo.
- Cerqueira, C.C.C.; Fernandes, M.N. 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 83-91.
- Clairborne, J.B.; Edwards, S.L.; Morrison-Shetlar, A.I. 2002. Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J. Exp. Zool.* 293, 302-319.
- Cole, M.B., Arnold, D.E., Watten, B.J., Krise, W.F., 2001. Haematological and physiological responses of brook charr, to untreated and limestone-neutralized acid mine drainage. *J. Fish Biol.*, 59, 79-91.

- CONAMA (2005) – Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005. in: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>. Accessed in: 11/12/2006.
- Dang, Z., Lock, R.A.C., Flick, G., Wendelaar Bonga, S.E., 2000. Na/K – ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. J. Exp. Biol., 151, 517-428.
- Dietrich, D.; Schlatter, C. 1989. Aluminium toxicity to rainbow trout at low pH. Aquat. Toxicol. 15, 197-212.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid–base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol. Rev. 85, 97–177.
- Exley, C., Chappell, J.S., Birchall, J.D., 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. J. Teor. Biol., 151, 417-428.
- Flues, M.; Hama, P.; Limes, M.J.L.; Dantas, E.S.K.; Fornado, A. 2002. Evaluation of the rainwater acidity of a rural region due to a coal-fired power plant in Brazil. Atmos Environ 35, 2397-2404.
- Gensemer, R.W., Playle, R.C., 1999. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 29, 315–450.
- Goss, G.G.; Perry, S.F.; Fryer, J.N.; Laurent, P. 1998. Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. Comp. Biochem. Physiol. A. 119 (1), 107-115.
- Guibaud, G., Gualthier, C., 2003. Study of aluminum concentration and speciation of surface water in four catchements in Limousin region (France). J. Inorg. Biochem., 16-25.
- Hara, F.A.; Oliveira, L.A. 2004. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. Acta amazonica, 34 (4), 343-357.
- Heath, A.G., 1987. Water pollution and fish physiology. CRC Press, Florida.
- Hirose, S.; Kaneko, T.; Naito, N.; Takei, Y. 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. Comp. Biochem. Physiol. B, 136, 593-620.
- Hontela, A., 1998. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. Environ. Toxicol. Chem., 17, 44-48.

- Horbe, A.M.C. Gomes, I.L.F.; Miranda, S.F.; Silva, M.S.R. 2005. Contribuição à hidroquímica de drenagens no Município de Manaus – AM. *Acta amazonica*, 35 (2), 119-124.
- Hwang, P.P.; Lee, T.H. 2008. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 148, 475-497.
- Iwama, G.K.; Afonso, L.O.B.; Vijayan, M.M. 2004. Stress in fish. *AquaNet Workshop on Fish Welfare*, Campbell River, B.C. Canada. September 27, 1-9.
- Langiano, V.C.; Martinez, C.B.R. 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 147, 222-231.
- Lara, L.B.L.S.; Artaxo, P.; Martinelli, L.A.; Victoria, R.L.; Camargo, P.B.; Krusche, A.; Ayers, G.P.; Ferraz, E.S.B.; Ballester, M.V. 2001. Chemical composition of rainwater and anthropogenic influences in the Piracicaba River Basin, Southeast Brazil. *Atmos Environ*, 35, 4937-4945.
- Lingwood, D., Harauz, G., Ballantyne, J.S. 2006. Decoupling the Na⁺/K⁺/ATPase in vivo: A possible new role in the gills of freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 144, 451-457.
- Lohner, T.W., Reash, R.J., Willet, V.E., Fletcher, J., 2001. Assessment of tolerant sunfish populations (*Lepomis* sp.) inhabiting selenium-laden coal ash effluents. Part 3. Serum chemistry and fish health indicators. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 50, 225-232.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Lydersen, E., Salbu, B; Poléo, A.B.S.; Muniz, I.P. 1990. The influences of temperature on aqueous aluminium chemistry. *Water Air Soil Pollut.*, 51: 203-215.
- Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi, in: Medri, M.E., Bianchini, E., Shibatta, O., Pimenta, J.A. (Eds.), *A bacia do rio Tibagi*. Londrina, pp. 551-577.
- Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2004. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.*, 64, 797-807.

- McCartney, A.G., Harriman, R., Watt, A.W., Moore, D.W., Taylor, E.M., Collen, P., Keay, E.J. 2003. Long-term trends in pH, aluminium and dissolved organic carbon in Scottish fresh waters; implications for brown trout (*Salmo trutta*) survival. *Sci. Total Environ.* 310, 133-141.
- Migliavacca, D.M.; Teixeira, E.C.; Machado, A.C.M. 2005. Composição química da precipitação atmosférica no sul do Brasil – estudo preliminar. *Química Nova*, 28 (3), 371-379.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, 548 mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211–268.
- Monette, M.Y., McCormick, S.D. 2008. Impacts of short-term acid and aluminum exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar*) physiology: A direct comparison of parr and smolts. *Aquat. Toxicol.* 86, 216-226.
- Nolan, D.T. “Unpublished results”. Skin response of fish to stressors. Doctorate thesis – Catholic University of Nijmegen, Holand.
- Pereira-Maduenho, L., Martinez, C.B.R., 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*, *Comp. Biochem. Physiol. C*, doi:10.1016/j.cbpc.2008.06.010
- Perry, S.F. 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 45, 325-347.
- Peuranen, S., Vuorinen, P.J., Vuorinen, M., Tuurala, H., 1993. Effects of acidity and aluminium on fish gills in laboratory experiments and in the field. *Sci. Total Environ.*, Supplement, 979-988.
- Peuranen, S., Keinanen, M., Tigerstedt, C., Kokko, J., Vuorinen, P.J., 2002. The effects of Fe and Al exposure with or without humic acid at two pH levels on the gills, oxygen consumption and blood and plasma parameters of juvenile grayling (*Thymallus thymallus*). *Large Rivers v.13, n.3-4, Arch. Hidrobiol.*, Supplement 141/3-4, 241-261.
- Playle, R.C.; Wood, C.M. 1990. Is precipitation of aluminum fast enough to explain aluminum deposition on fish gills? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 1558-1561.
- Poléo, A.B.S., 1995. Aluminium polymerization – a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquat. Toxicol.*, 31, 347-356.
- Poléo, A.B.S., Hytterød, S., 2003. The effects of aluminium in atlantic salmon (*Salmo salar*) with emphasis on alkaline water. *J. Inorg. Biochem.*, 89-96.

- Quabius, E.S.; Balm, P.H.M.; Wendelaar Bonga, S.E. 1997 Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *General and Comparative Endocrinology*, 108:472-482.
- Sakuragui, M.M.; Sanches, J.R.; Fernandes, M.N. 2003. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *J. Comp. Physiol. B*, 173, 309-317.
- Ščančar, J., Stibilj, V., Milačič, R., 2004. Determination of aluminium in slovenian foodstuff and its leachability from aluminium-cookware. *Food Chem.*, 151-157.
- Silva, V.S., Nunes, A.M., Cordeiro, M.J., Calejo, A.I., Santos, S., Neves, P., Sykes, A., Morgado, F., Dunant Y., Gonçalves, P.P. 2007. Comparative effects of aluminum and ouabain on synaptosomal choline uptake, acetylcholine release and (Na⁺/K⁺)ATPase. *Toxicology*, 236, 158-177.
- Simonato, J.D.; Albinati, C.A.; Martinez, C.B.R. 2006. Effects of the Water Soluble Fraction of Diesel Fuel Oil on Some Functional Parameters of the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 76, 505–511
- Sloman, K.A., Taylor, A.C., Metcalfe, N.B., Gilmour, K.M., 2001. Stress from air emersion fails to alter chloride cell numbers in the gills of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 59, 186-190.
- Takasusuki, J.; Araujo, M.R.R.; Fernandes, M.N. 2004. Effect of Water pH on Copper Toxicity in the Neotropical Fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodondidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 1075–1082
- Tavares-Dias, M., Martins, M.L., Schalch, S.H.C., Onala, E.M., Quintana, C.I.F., Moraes, J.R.E., Moraes, F.R., 2002. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, (Osteichthyes, Characidae) tratado com sulfato de cobre (CuSO₄). *Acta Scient.*, 24, 547-554.
- Teien, H.C., Kroglund, F., Salbu, B., Rosseland, B.O., 2006. Gill reactivity of aluminium species following liming. *Sci. Total Environ.*, 358, 206-220.
- Vanzella, T.P.; Martinez, C.B.R.; Cólus, I.M.S. 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat Res* 631, 36–43
- Vuorinen, P.J., Keinanen, M., Peuranen, S., Tigerstedt, C., 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula* L.) in

- long-term exposure to acidity and aluminium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54, 255-276.
- Waring, C.P., Brown, J.A., 1995. Ionoregulatory and respiratory responses of Brown trout, *Salmo trutta*, exposed to lethal and sublethal aluminium in acidic soft waters. *Fish Physiol. Biochem.*, 14, 81-91.
- Wendelaar Bonga, S.E.; Flick, G.; Balm, P.H.M.; Van der Meij, J.C.A. 1990. The ultrastructure of chloride cells on the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* during exposure to acidified water. *Cell Tissue Res.* 259, 575-585.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress in fish. *Physiol. Rev.*, 77, 591-625.
- Wilkinson, K.J.; Campbell, P.G.C. 1993. Aluminum bioconcentration at the gill surface of juvenile atlantic salmon in acidic media. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 2083-2095.
- Wilson, R.W. 1996. Physiological and metabolic costs of acclimation to chronic sublethal acid and aluminium exposure in rainbow trout, in: Taylor, E.W. (Ed.), *Toxicology of aquatic pollution. Physiological, cellular and molecular approaches.* Society for Experimental Biology, Seminar Series 57, University Press, Cambridge, pp. 143-167.
- Witters, H.E., Van Puymbroeck, S., Van Den Sande, I., Vanderborght, O.L.J., 1990. Haematological disturbances and osmotic shifts in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under acid and aluminium exposure. *J. Comp. Physiol. B.*, 160: 563 - 571.
- Witters, H.E.; Van Puymbroeck, S.; Vanderborght, O.L.J. 1992. Branchial and renal ion fluxes and transepithelial electrical potential differences in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of aluminium at low pH. *Environ. Biol. Fish.*, 34, 197-206.
- Witters, H.E.; Puymbroeck, S.V.; Stouthart, J.H.X.; Wendelaar Bonga, S.E. 1996. Physicochemical changes of aluminium in mixing zone: mortality and physiological disturbances in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (6), 986-996.
- Wood, C.M., McDonald, D.G., 1982. Physiological mechanisms of toxicity to fish, in: *Acid rain fisheries.* Johnson, R.E. (Ed.), Bethesda, American Fisheries Society.

PARTE III

Análise morfológica



**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ALUMÍNIO EM MEIO
ÁCIDO NA ESTRUTURA E ULTRA-ESTRUTURA
BRANQUIAL DO PEIXE NEOTROPICAL *Prochilodus
lineatus***

**Marina M. P. Camargo^{a,b}; Marisa N. Fernandes^a e
Cláudia B. R. Martinez^b**

^aDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luis, Km 235, 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil;

^bDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid (PR- 445), Km 374, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

Nota: Artigo original a ser submetido para publicação no periódico Comparative Biochemistry and Physiology - Part C” (*Elsevier*).

RESUMO

Juvenis do peixe neotropical *Prochilodus lineatus* foram expostos a $196 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al dissolvido em água ácida (grupo Al), somente à água ácida (grupo pH) ou à água com pH neutro (grupo CTR) por 6, 24, 96h e 10 dias para avaliar seus efeitos na estrutura (microscopia de luz - MO) e ultra-estrutura branquial (microscopia eletrônica de varredura [MEV], cálculo da área fracional das células-cloreto [AFCC] e transmissão [MET] e presença de alumínio no tecido branquial utilizando microanálise por raios-x [EDS]). A MO revelou que os peixes expostos ao Al em todos os tempos experimentais mostraram lesões mais amplamente distribuídas no órgão e consideradas de moderadas a severas, quando comparados aos expostos ao pH ou os dos grupos CTR. Nos grupos Al as principais alterações notadas foram hiperplasia do epitélio branquial, fusão lamelar e hipertrofia das células mucosas. Nos animais expostos ao pH a principal alteração notada nos diferentes tempos foi a hipertrofia das células do epitélio, principalmente das células-cloreto (CC). A MEV permitiu destacar o extenso desarranjo nas lamelas dos peixes dos grupos Al e descamação do epitélio desses mesmos animais além da redução do espaço interlamelar. Células-cloreto com aspecto “esponjoso” foram notadas nos grupos pH e Al além da alteração no padrão das microcristas das células pavimentosas (pv) em ambos os grupos. O EDS identificou poucos e pequenos picos de Al no epitélio branquial dos animais dos grupos CTR e pH, mas foi possível notar uma maior presença desse metal nos peixes dos grupos Al, com destaque para o tempo de 96h. Os animais expostos ao pH e Al em todos os tempos experimentais mostraram AFCC significativamente menores que as dos grupos CTR. A MET mostrou que os animais expostos ao Al têm mais CC deslocadas para as pontas das lamelas e que essas células apresentam o citoplasma menos denso, com uma menor quantidade de túbulos e mitocôndrias, núcleos nem sempre visíveis e com formas alteradas. A espessura das lamelas é maior devido ao inchaço das pv, reduzindo o espaço interlamelar. Há ainda uma maior quantidade de vacúolos presentes no citoplasma das CC desses animais. A análise da brânquia por diferentes formas permitiu concluir que a exposição de curimbas a uma concentração subletal de Al em meio ácido causa sérias alterações estruturais e conseqüentemente, funcionais nesse órgão, comprometendo seriamente a sobrevivência dos animais.

Palavras-chave: alumínio, acidez, brânquias, células-cloreto, microscopia eletrônica, microscopia de luz, peixe neotropical.

1. Introdução

O alumínio é um metal extremamente abundante na crosta terrestre e também está entre os elementos mais comuns no ambiente (Exley et al., 1991; Poléo, 1995; Ščančar et al., 2004), principalmente em áreas com grande urbanização e industrialização (Casarini et al., 2001; Silva et al., 2007). Guibaud e Gualthier (2003) identificaram altas concentrações (valores até $1350 \mu\text{g.L}^{-1}$) desse elemento na água de alguns locais da Inglaterra e República Tcheca, em decorrência das chuvas ácidas e da poluição relacionadas à grande industrialização dessas áreas. Lydersen et al. (2002) estudaram um lago acidificado (pH na faixa de 5,0) na Noruega cuja concentração média de Al chegava a $300 \mu\text{g.L}^{-1}$, motivo pelo qual não se encontravam mais peixes a muitos anos.

No Brasil a situação é semelhante quando são avaliados resultados de análise de água da região mais desenvolvida do país (Estado de São Paulo), aonde os valores de Al na água superficial chegam até $5700 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Cetesb, 2008), muito acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para Al dissolvido, que variam entre 100 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Conama 357, 2005).

O alumínio é muito tóxico para a maioria dos animais, inclusive humanos (Darbre, 2005; Karbouj et al., 2009). A toxicidade deste metal está bem estabelecida para os peixes (Exley et al., 1991; Poléo et al., 1997; Alberti et al., 2003; Barcarolli e Martinez, 2004; Silva et al., 2007; Monette e McCormick, 2008), nos quais o Al pode causar efeitos, mesmo em baixas concentrações, caso o pH mantenha-se abaixo de 6,2 (Fivelstad et al., 2003).

O pH do meio é um parâmetro normalmente incluído na avaliação da toxicidade de metais. A solubilidade do Al aumenta como resultado direto da redução do pH, levando ao aumento da presença de Al inorgânico, a forma de Al que é mais tóxica para os peixes (Gensemer e Playle, 1999; Lydersen et al., 2002; Laudon et al., 2005). A acidez por si só pode ser prejudicial aos organismos aquáticos, tendo sido relacionada à diminuição do número de espécies e das comunidades de peixes e anfíbios em alguns locais da América do Norte e Europa (Howells, 1984; Tammi et al., 2004; Brunelli e Tripepi, 2005). Vários estudos já mostraram efeitos da acidez em processos de reprodução, recrutamento, capacidade natatória, predação e refúgio de peixes (Wood e McDonald, 1982; Howells, 1984; Cole et al., 2001; Vuorinen et al., 2003). Entretanto, quando o baixo pH está associado ao Al, os efeitos concentram-se

nas brânquias e nos processos relacionados a esse órgão (Waring e Brown, 1995; Cole et al., 2001; Teien et al., 2006; Torre et al., 2007).

Dentre os tecidos mais comumente estudados na ecotoxicologia, a brânquia tem recebido especial atenção já que se trata de um órgão com diferentes e importantes funções para o peixe. As brânquias participam dos processos de trocas gasosas, excreção, manutenção do equilíbrio ácido-básico e osmorregulação (Poleksić e Mitrović-Tutundžić, 1994; Hwang e Lee, 2008). O epitélio branquial é considerado o local primário de transporte no peixe, devido ao gradiente osmótico e iônico encontrado entre as brânquias e o meio externo (Evans et al., 2005).

A regulação iônica nas brânquias é responsabilidade principal das células ricas em mitocôndrias ou células-cloreto (Hirose et al., 2003), localizadas principalmente nos filamentos branquiais, próximo à base das lamelas (Perry, 1997; Hirose et al., 2003). As células-cloreto (CC) possuem uma área superficial muito grande devido à presença de invaginações da membrana baso-lateral (Hirose et al., 2003) e contam ainda com muitos canais de Na^+ e de Ca^{2+} , trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e bombas Na^+/K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase, o que explica sua importância no transporte ativo de íons nas brânquias (Perry, 1997; Clairborne et al., 2002). O estudo destas células em peixes expostos ao Al é relevante, já que diversos autores relataram diminuição das concentrações dos íons plasmáticos após exposições a esse metal (Dietrich e Schlatter, 1989; Exley et al., 1991; Wilkinson e Campbell, 1993; Witters et al., 1996).

A grande área de contato que a brânquia fornece ao peixe faz com que ela seja o primeiro órgão afetado pela exposição a contaminantes (Exley et al., 1991; Witters et al., 1992; Peuranen et al., 1993; Peuranen et al., 2002) sendo assim responsável pela acumulação de diversos tipos de poluentes, bem como pela transferência destes para os compartimentos internos do animal via corrente sanguínea (Haaparanta et al., 1997; Thophon et al., 2003). Essas características fazem das brânquias um órgão bastante apropriado para indicação da qualidade da água (Mallat, 1985; Poleksić e Mitrović-Tutundžić, 1994; Fanta et al., 2003).

A maioria dos estudos com Al no tecido branquial de peixes restringe-se aos países de clima temperado, mas assim como no resto do mundo, os corpos de água de ambientes tropicais tem sofrido com o impacto das ações antrópicas (Lara et al., 2001; Almeida et al., 2005), entretanto, são poucos os estudos com espécies nativas desses

ambientes, principalmente no Brasil (Barcarolli e Martinez, 2004; Camargo e Martinez, 2006; Winkaler et al., 2007).

A espécie *Prochilodus lineatus* é representativa da ictiofauna neotropical, amplamente distribuída em rios da região sul e sudeste do Brasil, além de ser considerada uma espécie bioindicadora em potencial (Martinez et al., 2004; Simonato et al., 2006; Vanzella et al., 2007).

Levando em consideração o que foi exposto, o presente trabalho tem como objetivo investigar por quais mecanismos o Al em pH ácido afeta as brânquias, e conseqüentemente a osmorregulação, de uma espécie de peixe neotropical usando como ferramentas para isso técnicas de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e transmissão além da microanálise de raios-x.

2. Material e Métodos

Exemplares jovens de *P. lineatus* (Valenciennes, 1847), com peso de $12,22 \pm 7,35$ g e comprimento de $10,26 \pm 1,93$ cm (média \pm DP, n = 142) foram obtidos na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL) para serem usados em testes de toxicidade do tipo estáticos. Antes dos experimentos os peixes foram aclimatados por 7 dias em tanques de 300 L, preenchidos com água desclorada sob aeração constante e fotoperíodo de 12h:12h. Durante a aclimação, os animais foram alimentados com ração comercial com 36% de proteína (Guabi®, BR) a cada 2 dias e tiveram a alimentação suspensa 24 horas antes do início dos testes de toxicidade. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados (T = $21,8 \pm 0,9$ °C; pH = $7,5 \pm 0,1$; OD = $7,5 \pm 0,7$ mgO₂.L⁻¹; condutividade = $133,4 \pm 9,7$ µS.cm⁻¹; dureza = $42,5 \pm 6,0$ mg.CaCO₃.L⁻¹).

Após a aclimação, os peixes (de 6 a 9 por aquário, dependendo do tamanho dos animais) foram transferidos para aquários de vidro de 100L preenchidos com os seguintes meios experimentais: no grupo controle (CTR) os peixes foram transferidos para aquários contendo apenas água com pH neutro; no grupo pH foram transferidos para aquários contendo água com pH ácido ($\approx 5,0$), devido à adição de HCL 50%; e no grupo Al foram transferidos para aquários contendo água com Al em pH ácido ($\approx 5,0$). O alumínio foi adicionado à água como Al₂(SO₄)₃, na concentração nominal de 1000 µg.L⁻¹. Os testes de toxicidade foram realizados separadamente para cada tempo

experimental (6, 24, 96h e 10 dias), quando os 3 grupos experimentais (CTR, pH e Al) eram amostrados simultaneamente. Todos os testes foram feitos com réplicas.

Durante os testes, a água dos aquários foi continuamente monitorada para temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade. Amostras de água também foram coletadas imediatamente após cada período experimental para a análise de Al, em espectrofotômetro de absorção atômica, com limites de detecção variando entre 10 e 50 $\mu\text{g Al.L}^{-1}$. A concentração de Al total foi determinada em amostras de água não-filtradas, enquanto que a concentração de Al dissolvido foi determinada em amostras filtradas (0,45 μm); para ambas as análises as amostras foram acidificadas com HNO_3 .

Após cada período experimental, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1 g.L^{-1}) e mortos por secção medular para retirada das brânquias, que foram cuidadosamente lavadas em solução salina. As brânquias foram divididas em 2 partes, uma para a microscopia de luz e outra para a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

2.1 Microscopia de luz

Quatro arcos branquiais foram fixados em solução de Bouin por períodos de 5 a 6 horas (dependendo do tamanho do material), sendo depois incluídos em parafina e cortados com 5 μm de espessura em micrótomo manual (American Optical, 820). As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para descrição morfológica e, 10 cortes para cada animal, foram analisados em um foto-microscópio acoplado a um sistema de análise e captura de imagens (QWIN; Leica). A ocorrência de alterações histopatológicas nas brânquias foi avaliada semi-quantitativamente de duas formas: a) Cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA), com base na incidência de lesões, de acordo com Schwaiger et al. (1997). Um valor numérico foi atribuído para cada animal conforme a escala: grau 1 (ausência de alteração histológica), grau 2 (ocorrência de lesões pontualmente localizadas) e grau 3 (lesões amplamente distribuídas pelo órgão); b) Cálculo do Índice de Alteração Histológica (IAH), com base na severidade de cada lesão (Poleksić e Mitrović-Tutundžić, 1994). As alterações histológicas foram classificadas em estágios progressivos quanto ao comprometimento das funções teciduais: alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do tecido; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e

irreversíveis. Um valor de IAH foi calculado para cada animal através da fórmula: $IAH = 10^0 \Sigma I + 10^1 \Sigma II + 10^2 \Sigma III$, sendo *I*, *II* e *III* correspondente ao número de alterações de estágio I, II e III, respectivamente. Os valores de IAH entre 0 e 10 indicam um funcionamento normal do órgão; entre 11 e 20 indicam danos de leves a moderados no órgão; entre 21 e 50 indicam danos de moderados a severos; valores entre 51 e 100 indicam danos muito severos ao órgão e valores maiores que 100 indicam danos irreparáveis no tecido.

2.2 Microscopia eletrônica de varredura

Para as análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) outros 4 arcos das brânquias foram fixados em glutaraldeído 2,5% por 24h (em tampão fosfato 0,2 M pH 7,3) e depois transferidos para glutaraldeído 0,5% (4°C) até o momento do processamento. Essas brânquias foram cortadas em pedaços menores, de modo a conter apenas de 3 a 5 filamentos cada, e depois foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M (pH=7,3) por três vezes (total de 20 minutos). Em seguida, foi realizado tratamento anti-muco, durante o qual o material permaneceu dois segundos em água destilada, 24 h em glicerol 16% e depois 24 h em etanol 20%. Após esse tratamento foi realizada a desidratação em uma série crescente de soluções alcoólicas (etanol: 50, 70, 80, 90, 95 e 100) e o material foi transferido para um aparelho de ponto crítico utilizando-se CO₂ como líquido de transição, até a secagem completa. O material seco foi fixado no porta-amostra por meio de fita de carbono dupla-face de modo que a área de interesse (a região interna dos filamentos, no limite de inserção das lamelas e próximo ao septo) ficasse paralela ao porta-amostra. Após o posicionamento dos filamentos, o material foi recoberto com uma camada de ouro em um sistema de “sputtering” (Bal-Tec SCD 050 Sputter Coater).

2.3. Microanálise quantitativa por raios-x

Após o processamento das brânquias para MEV, algumas amostras foram recobertas com carbono (Bal-Tec SCD 050) para serem utilizadas na microanálise quantitativa por raios-x. A microanálise foi realizada por espectroscopia de dispersão de energia (EDS), utilizando-se um espectrômetro de raio-x por energia dispersiva (Inca X-Sight, Oxford), em uma distância de trabalho de 10 mm. O material foi examinado e

fotografado em microscópio de varredura (Quanta 200, FEI Company) operando com voltagem entre 20 e 25 kV.

2.4. Área fracional das células-cloreto

As medidas da área fracional das células-cloreto (AFCC) no epitélio branquial foram determinadas utilizando-se registros fotográficos dos grupos CTR, pH e Al de cada tempo experimental. Estes registros foram obtidos diretamente do microscópio eletrônico de varredura e foi usado também o fotomicroscópio Leica Qwin Software (Leica) para delineamento dos perímetros das células (total ou parcialmente visíveis) e cálculo das respectivas áreas. Esta análise não representa uma estimativa real da área de superfície apical das células-cloreto, pois não considera as microvilosidades, microdobras ou depressões da superfície das células (Bindon et al., 1994; Mazon et al., 2002), entretanto, refere-se à fração da área das células-cloreto por unidade de área do filamento branquial. Foram utilizadas imagens ao acaso com aumentos semelhantes para uma análise comparativa em relação à área do perímetro branquial de cada campo analisado e à área ocupada pelas células nos diferentes grupos. Foi utilizada a seguinte equação:

$$AFCC = \frac{\sum \text{área de todas as células-cloreto}}{\text{Área da Fotografia}}$$

2.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram utilizados fragmentos das amostras de brânquia fixadas em glutaraldeído 2,5% (em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,3) por 24 horas e armazenadas em glutaraldeído 0,5% até o momento da inclusão. Inicialmente as amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) por três vezes e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,3) por duas horas a 4°C. O excesso de tetróxido de ósmio foi retirado com 3 lavagens sucessivas em tampão fosfato 0,1 M (pH=7,3). As amostras fixadas foram desidratadas em concentrações graduais de acetona e posteriormente foram embebidas em resina Araldite 6005 (Ladd Research

LTDA). As amostras foram incluídas em moldes de silicone em posição sagital aos filamentos. Após a polimerização da resina foi efetuada a trimagem dos blocos e cortes semi-finos ($0,5\mu\text{m}$) foram corados com azul de Toluidina para seleção da região a ser analisada ao microscópio eletrônico. Após nova trimagem, cortes ultra-finos (70 nm) foram obtidos com ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT) e colocados sobre grades de cobre. As amostras foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes de brânquia foram observados em um microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai 12, FEI Company) e as imagens capturadas pelo software Imaging System e analisadas pelo Software System Analysis.

2.6 Análise estatística

Os resultados dos diferentes parâmetros obtidos nos três tratamentos (CTR, pH e Al) para um mesmo período de exposição (6, 24, 96h ou 10 dias), foram comparados entre si por meio de análise de variância paramétrica ou não paramétrica (ANOVA ou Kruskal-Wallis, respectivamente), dependendo da distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Quando indicado, as diferenças foram identificadas por meio de teste de comparação múltiplas (Tukey). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3. Resultados

Os resultados estão apresentados como média \pm D.P. Os parâmetros físicos e químicos da água mantiveram-se praticamente constantes em cada grupo experimental, nos diferentes tempos experimentais, e estão mostrados na Tabela 1. Apenas três peixes do grupo Al morreram durante os experimentos, um após 24 h e dois após 10 dias de exposição, nos demais experimentos não houve mortalidade.

Tabela 1. Parâmetros físicos e químicos da água nos diferentes grupos experimentais.

	CTR	pH	Al
Temperatura (°C)	20,17 ± 3,14	20,27 ± 3,02	20,27 ± 3,15
OD (mgO ₂ .L ⁻¹)	7,6 ± 0,07	7,35 ± 0,07	7,5 ± 0,28
Conductividade (µS.cm ⁻¹)	81,8 ± 2,6	104,1 18,3	104,6 15,
Dureza (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	41,3 ± 7,9	41,6 ± 5,9	44,1 ± 7,3
pH	7,4 ± 0,18	5,1 ± 0,0	5,1 ± 0,1
Al total (µg.L ⁻¹)	ND	ND	438,00 ± 36,33
Al dissolvido (µg.L ⁻¹)	ND	ND	196,00 ± 26,08

Os valores indicam média ± DP dos experimentos de 6, 24 e 96 h e 10 dias. ND: não detectado.

3.1 Microscopia de luz

As alterações histológicas branquiais encontradas nos *P. lineatus* testados estão apresentadas na Tabela 2 e as alterações mais frequentes estão representadas na Fig. 1. O aspecto normal das brânquias pode ser observado na Fig. 1A, destacando o espaço interlamelar bem definido, as lamelas com disposição paralela e organizada e as células epiteliais do filamento e das lamelas dispostas em poucas camadas (sem hiperplasia). Nos animais expostos somente ao pH (Fig. 1B e 1C), nos diferentes tempos experimentais, a alteração mais comum foi a hipertrofia das células do epitélio. Essa alteração foi freqüente na região de inserção da lamela no filamento, local onde normalmente são encontradas as células-cloreto (Fig. 1C), mas também foi possível notar aumento do volume celular em outras áreas da lamela, como mostrado na Fig.1B.

Nos animais dos grupos Al dos diferentes experimentos a alteração mais freqüentemente encontrada foi a hiperplasia das células epiteliais (Fig.1D e 1E). Em

muitos casos, a hiperplasia observada foi tão intensa que levou à fusão parcial (Fig.1G) ou total das lamelas secundárias (Fig. 1H), caracterizando uma redução significativa do espaço interlamelar quando comparado aos animais dos grupos CTR e pH. Hipertrofia celular também foi bastante comum, sendo que as células mucosas parecem ser o tipo celular mais afetado por essa alteração (Fig. 1F). Também foi possível notar um aumento no número dessas células e conseqüentemente da produção de muco nesses animais. Alterações vasculares foram observadas em alguns exemplares expostos ao Al, principalmente após 24h, sendo o aumento do volume dos canais sanguíneos (Fig.1H; com provável ruptura das células pilares), dilatação do canal marginal e congestão as alterações desse tipo mais comumente vistas. Aneurismas foram observados em alguns animais, como mostrado na Fig. 1D.

Tabela 2. Principais alterações histológicas encontradas nas brânquias dos *P. lineatus* utilizados nos testes de toxicidade de 6, 24, 96h e 10 dias de exposição, e seus respectivos estágios de severidade.

Alterações histológicas branquiais	Estágio
Hiperplasia do epitélio respiratório	I
Hipertrofia do epitélio respiratório	I
Desarranjo lamelar	I
Elevação do epitélio respiratório	I
Dilatação do canal marginal	I
Congestão vascular	I
Fusão parcial das lamelas	I
Fusão total das lamelas	I
Hemorragia com rompimento do epitélio	II
Aumento do volume dos vasos sanguíneos	II
Aneurisma	II

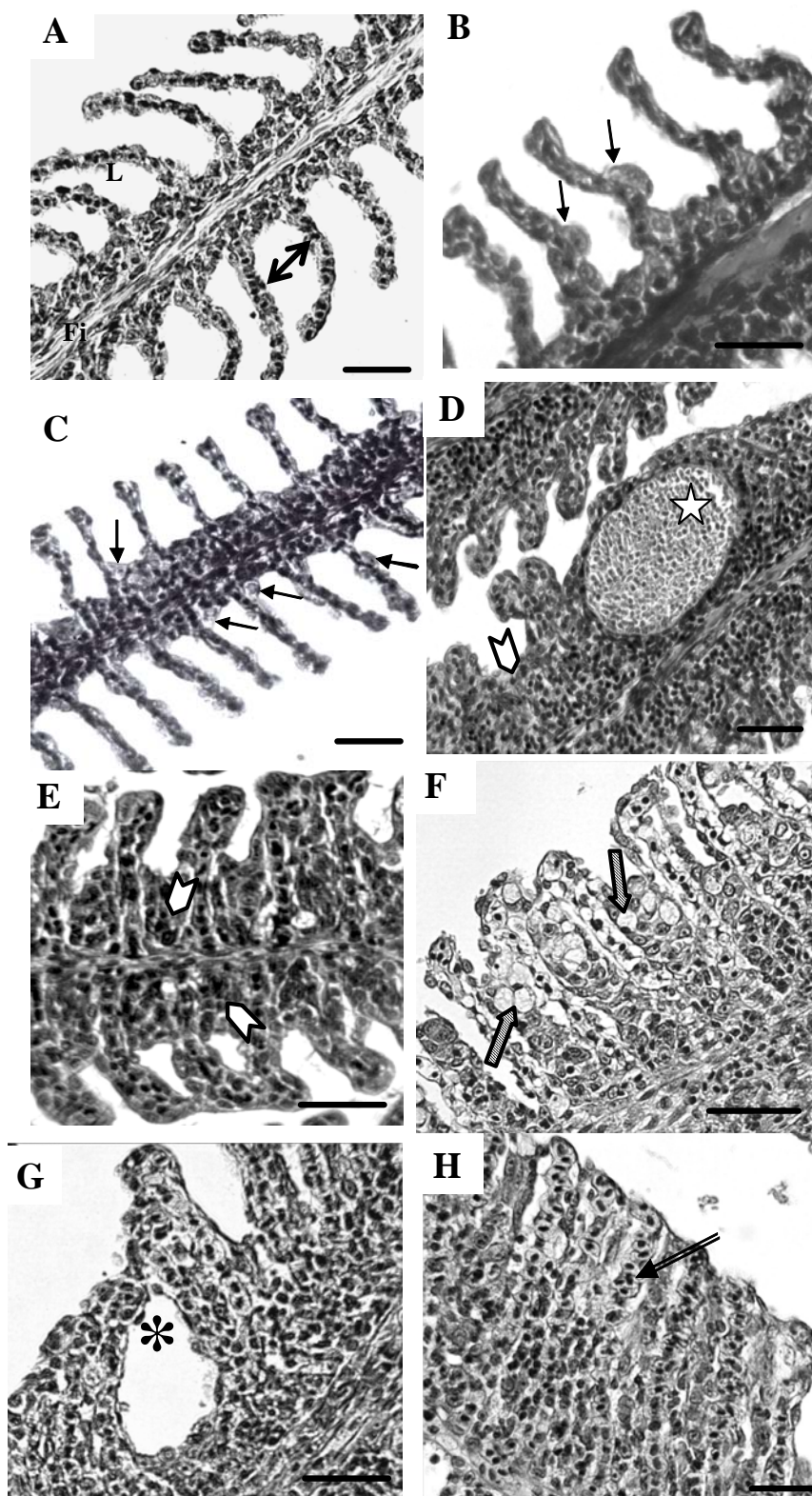


Fig. 1. Fotomicrografias de brânquias de *P. lineatus* submetidos aos tratamentos experimentais. Em A um exemplar do grupo CTR mostrando o aspecto normal das células das lamelas (L) e dos filamentos (Fi), além do espaço interlamelar preservado (seta). Em B e C as setas indicam hipertrofia das células-cloreto nos filamentos e nas lamelas de animais do grupo pH. De D até H as imagens referem-se a animais expostos ao Al, sendo que em D e E as setas claras indicam hiperplasia de células epiteliais e a estrela indica um grande aneurisma (D). As setas listradas (F) mostram hipertrofia de células mucosas nas lamelas, o * indica fusão parcial de algumas lamelas (G) e em H nota-se a fusão total de várias lamelas além do aumento do volume dos canais sangüíneos (seta dupla). Barra de aumento: 30 μ m.

Os valores médios de alteração, VMA (Fig. 2A), calculados para os animais expostos ao pH indicaram valores próximos de 2, o que significa que as alterações observadas nos diferentes tempos experimentais estão pontualmente distribuídas pelo tecido, sendo significativamente maiores que os encontrados para os grupos CTR. Já os Índices de Alteração Histológica, IAH (Fig. 2B), desses mesmos animais apresentaram valores médios entre 10 e 20, o que indica danos leves a moderados à brânquia, sem comprometer as funções do tecido. Os valores de IAH também foram significativamente maiores do que os encontrados para os grupos CTR em todos os períodos de exposição. O valor de IAH entre 10 e 20 pode ser justificado pelas alterações mais comumente encontradas, classificadas como de estágio I de severidade, como por exemplo, desarranjo lamelar, alguma hiperplasia de células epiteliais e elevação epitelial, além da já citada hipertrofia celular. Poucas foram as alterações de estágio II encontradas nesses animais, podendo citar como exemplos aumento do volume dos canais sanguíneos e hemorragia com rompimento do epitélio.

Nota-se pelos valores de VMA (Fig.2A) encontrados para os animais dos grupos AI, que as alterações observadas nesses peixes estavam mais amplamente distribuídas pela brânquia do que nos demais grupos. Os valores médios ficaram próximos de 3 em todos os tempos experimentais, apresentando diferença significativa em relação aos grupos CTR e também pH (com exceção do experimento de 10 dias onde a diferença foi só em relação ao grupo CTR). Os IAH calculados mostraram valores médios maiores que 20 (e estatisticamente diferentes dos grupos CTR), significando danos de moderados a severos nas brânquias dos animais expostos ao AI em todos os tempos experimentais. Não foram encontradas alterações consideradas de estágio III (como necrose e fibrose) em nenhum dos animais estudados.

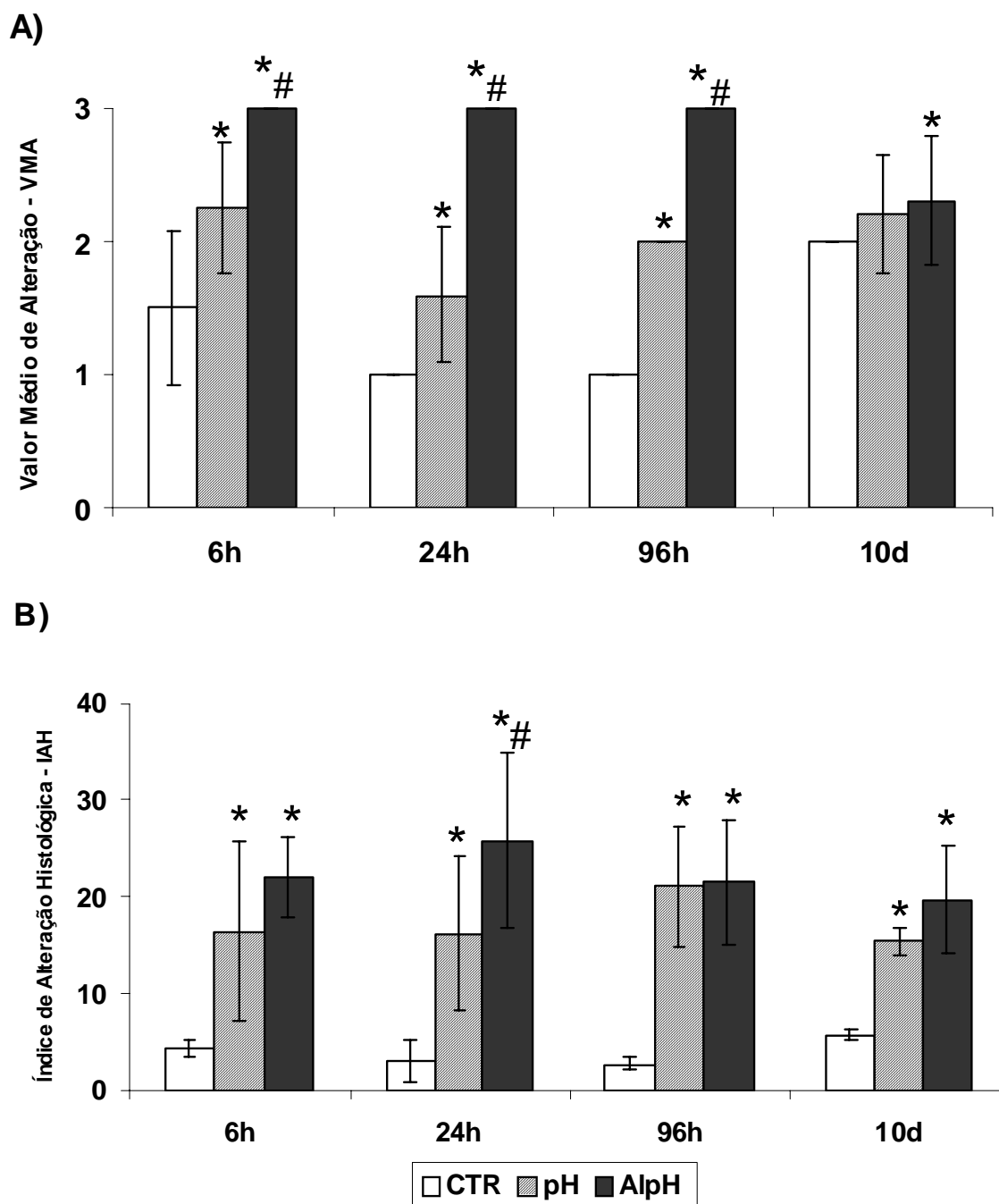


Fig. 2. Valores Médios de Alteração (A) e Índices de Alteração Histológica (B) calculados para as brânquias de *P. lineatus* expostos aos grupos CTR, pH ou Al por 6, 24, 96h ou 10 dias. As barras indicam médias e as linhas verticais o DP. * indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo CTR e # indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo pH ($P < 0,05$).

3.2 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura permitiu caracterizar as brânquias dos curimbas dos grupos CTR como possuindo lamelas dispostas de forma paralela e quase retilínea (delimitando bem o espaço interlamelar ou canal de água), recobertas por células pavimentosas (pv) grandes entremeadas por células-cloreto (CC). Os curimbas parecem apresentar com certa regularidade CC nas lamelas, entretanto tais células são muito mais comuns na região de inserção da lamela com o filamento (Fig. 3A). As CC dos animais CTR apresentam normalmente grandes áreas superficiais sendo possível notar a presença de microvilosidades em sua superfície apical. O padrão das pv se altera nas lamelas (com poucas ou nenhuma microcristas) e no filamento (muitas microcristas concêntricas distribuídas por toda a superfície celular).

Nos animais expostos ao pH houve alteração no padrão da superfície apical das pv, sendo que no filamento tais células parecem ter perdido as microcristas, assumindo um aspecto mais liso e microcristas longas e contínuas evidenciando o limite celular (Fig. 3B e 4A). Foi possível também notar um maior número de CC nas lamelas do que nos animais CTR, e tais células pareciam hipertrofiadas e com aberturas menores, de aspecto esponjoso (3B, 4A e 4C).

Os animais expostos aos grupos Al apresentaram o maior número de alterações levando, em muitos casos, à perda total das características normais do filamento branquial e a uma dificuldade em se identificar os tipos comuns de células, como as CC e as pv (Fig. 3C e 4B). O desarranjo das lamelas (Fig. 3C), a presença de descamação e sujeira (Fig. 4B) além de hiperplasia da base da lamela e fusão lamelar (Fig. 3C e 4E) foram as alterações mais comuns nesses animais. O aspecto esponjoso das CC bem como a alteração do padrão das microcristas das pv foi também notado nesse grupo (Fig. 3D). Uma característica importante nos animais desse grupo foi a redução do espaço interlamelar em decorrência da hiperplasia epitelial e das fusões.

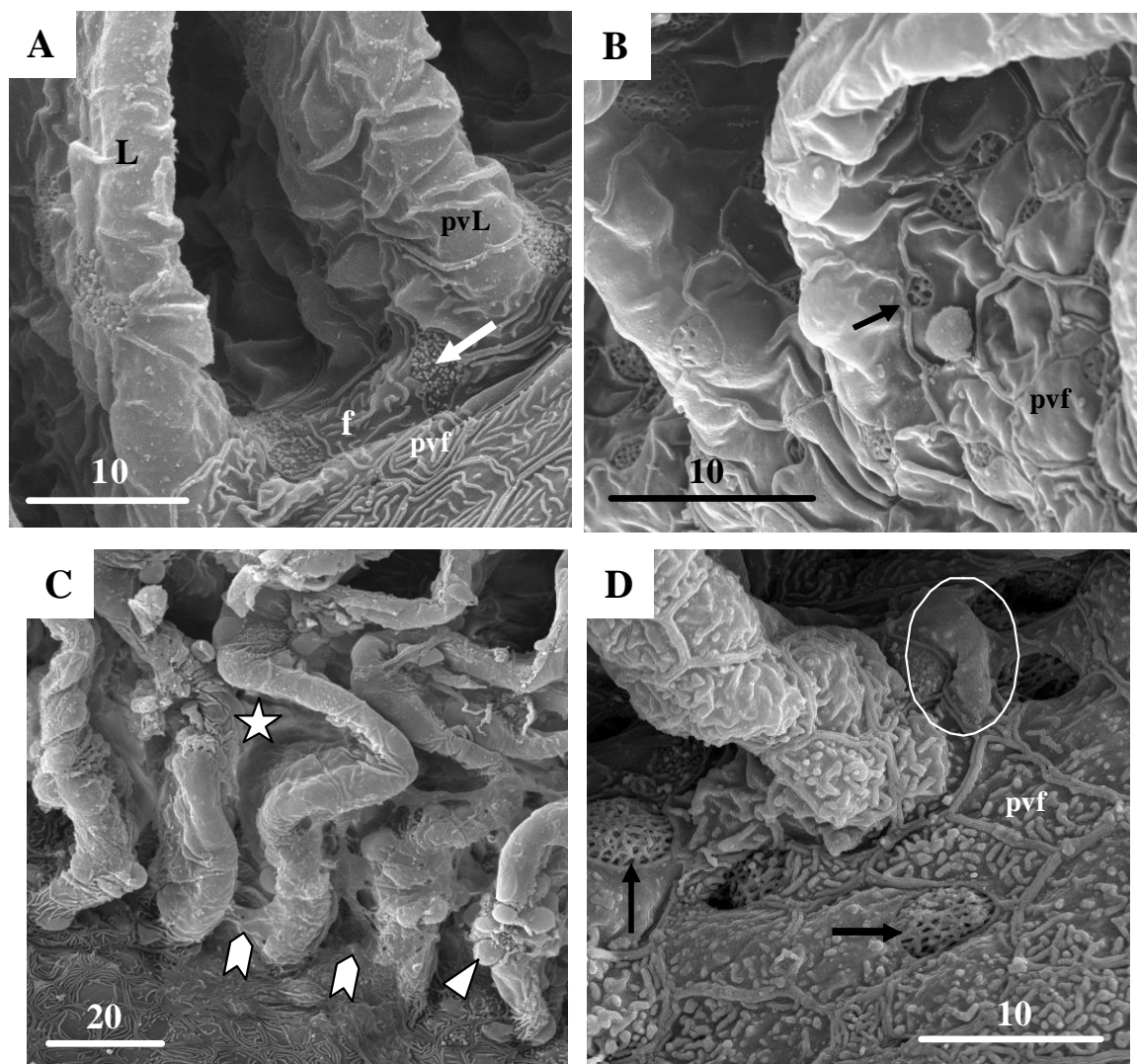


Fig. 3. MEV. Micrografias representativas de filamentos branquiais de *P. lineatus*, no ponto de inserção da lamela secundária (L) no filamento (f). Em um exemplar do grupo CTR (A) notar o padrão das microcristas das células pavimentosas no filamento (pvf) e nas lamelas (pvL) e uma célula-cloreto normal (seta). Nos animais expostos ao pH (B) ou nos animais expostos ao Al (D) é possível notar hipertrofia das pvL e alteração das microcristas das células pavimentosas (pvf e em detalhe, no círculo) e superfícies apicais de células-cloreto com aspecto de “esponja” (setas). Os animais expostos ao Al (C) mostraram ainda grande desarranjo nas lamelas, descamação do epitélio e fusão lamelar (estrela), células mucosas hipertrofiadas (cabeça de seta) além de hiperplasia na base das lamelas (setas largas). Para maior clareza das imagens somente algumas células foram rotuladas. Barra em micrômetros.

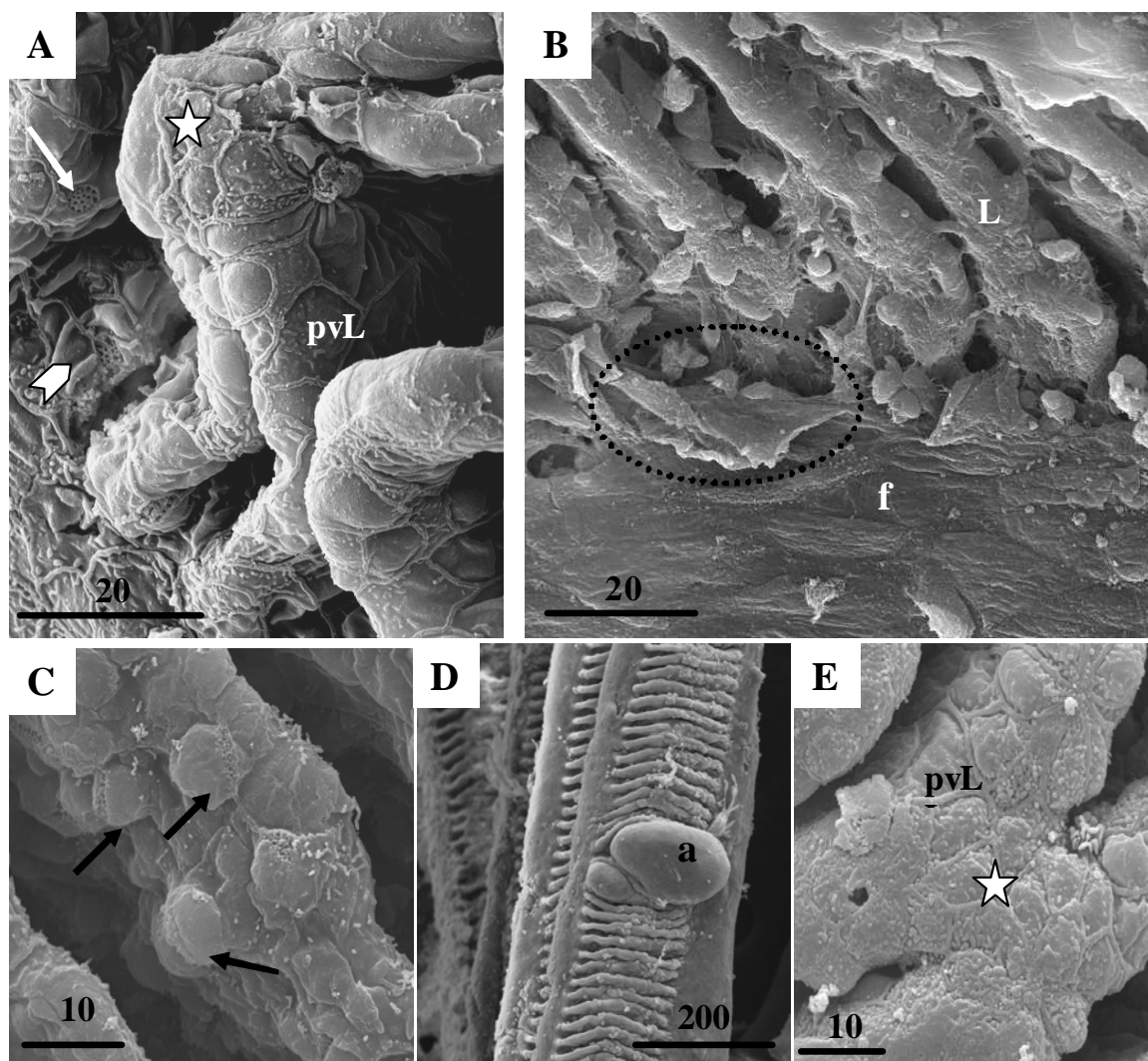


Fig. 4. MEV. Micrografias representativas de filamentos branquiais de *P. lineatus* mostrando as principais alterações encontradas nos animais expostos ao pH (A e C) ou ao Al (B, D e E). A seta larga (A) indica hiperplasia na base da lamela, o que levou muitas vezes à fusão lamelar (estrelas em A e E). Nota-se ainda o padrão alterado das microcristas das pvL nas mesmas figuras. Em B tem-se uma visão geral das lamelas (L) e do filamento (f) de um animal exposto ao Al, mostrando presença de resíduos e descamação do epitélio (no detalhe). Em C nota-se a hipertrofia de células-cloreto (setas), deslocadas para as lamelas. Em A vê-se o aspecto “esponjoso” da superfície apical de uma CC (seta). Em D notam-se 2 grandes aneurismas vasculares (a) entre as lamelas. Para maior clareza das imagens somente algumas células foram rotuladas. Barra em micrômetros.

3.3 Microanálise por raios-x (EDS)

A figura 5A ilustra o tipo de material que foi usado para a microanálise por raios-x, bem como as 4 regiões na brânquia (a-d) que foram analisadas nos 3 grupos experimentais (CTR, pH e Al), em todos os tempos experimentais (6, 24, 96h e 10 dias). Procurou-se verificar, se havia diferença na deposição do Al nas diferentes regiões da brânquia, analisando pra isso, os espectros de dispersão de elétrons obtidos em cada ponto. Entretanto, não foi possível notar um padrão pelos resultados, já que nos grupos Al, onde foram notados a maior parte dos picos, estes apareceram igualmente nas 4 regiões.

Os maiores picos de Al foram observados nos grupos Al em todos os tempos analisados. O tempo de 96h de exposição foi o que apresentou, dentre todos, os maiores picos desse metal.

Os grupos CTR e pH analisados também apresentaram, em alguns poucos espectros, pequenos picos de Al, o que provavelmente está relacionado à presença natural desse elemento na água da região, ficando abaixo do limite de detecção dos aparelhos usados nas análises de água por espectrofotometria de absorção atômica (resultados mostrados anteriormente).

Os elementos que mostraram picos em todos os espectros, C, O, N, Cl, Na, Si, P, S e Ca são usualmente observados e podem estar relacionados ao fixador usado no material (glutaraldeído), ao ácido HCl adicionado à água dos aquários pH e Al ou ainda à fita e ao banho de carbono usados no processamento para EDS.

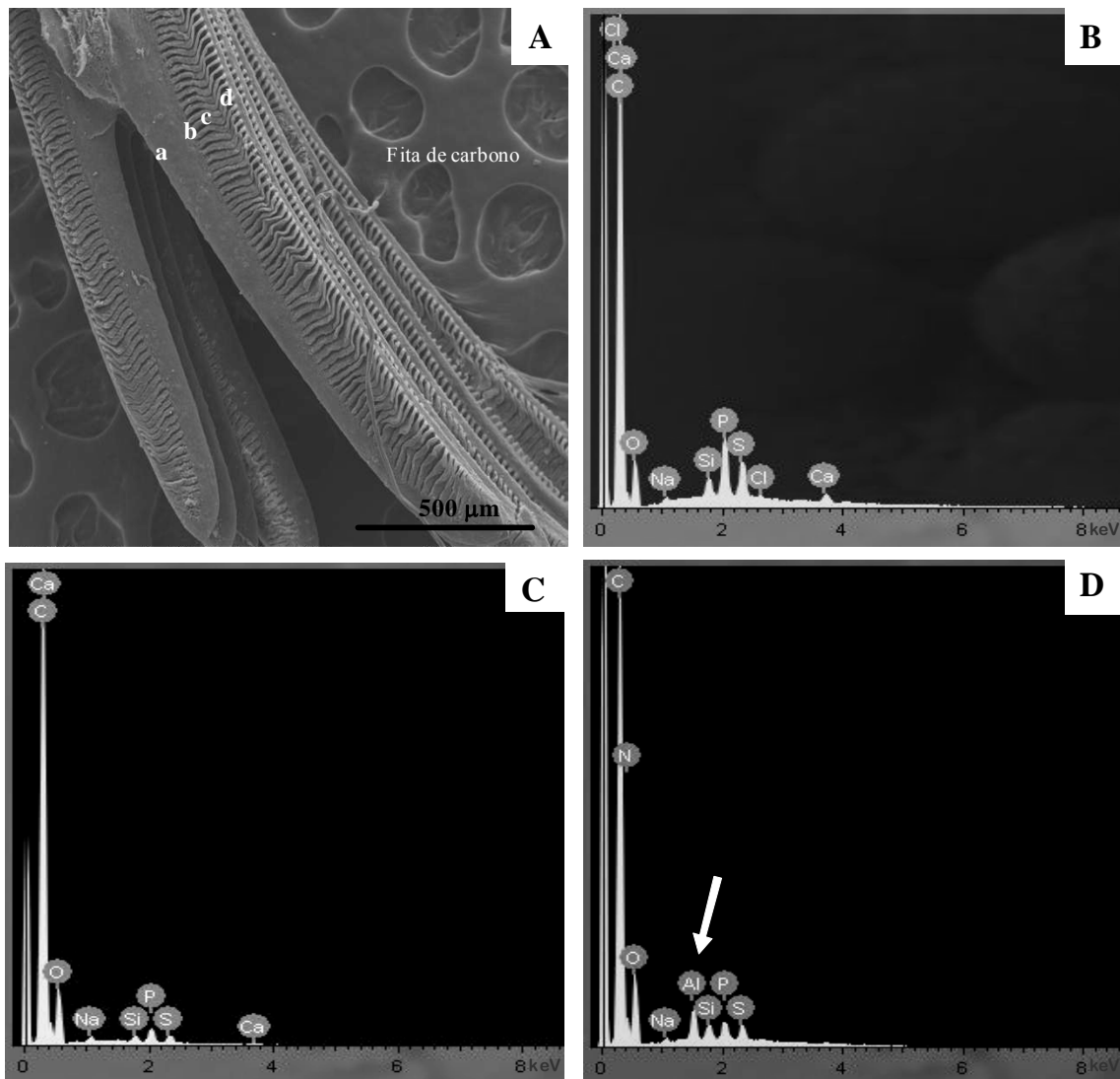


Fig. 5. Micrografia eletrônica de varredura de filamentos branquiais de *P. lineatus* ilustrando as 4 regiões (a-d) analisadas por microanálise por raios-x (A). Como não houve diferença aparente nos elementos observados nessas 4 regiões, de B-D são mostrados típicos espectros obtidos por microanálise por raios-x das brânquias de *P. lineatus* expostos por 96h aos grupos CTR (B), pH (C) e Al (D), sem considerar uma região específica da brânquia. Picos característicos de C, O, P, S, Cl, Ca, Na, Si e N são vistos em praticamente todos os grupos, oriundos da fita de carbono, do fixador utilizado, do HCl adicionado à água ou mesmo da própria constituição da brânquia. Picos de Al foram pouco observados no CTR e no pH, os maiores picos indicativos deste metal foram observados no grupo Al (seta branca). Voltagem de operação: 20 kV; distância de trabalho 10mm.

3.4 Área fracional das células-cloreto (AFCC)

Os resultados da AFCC calculados para as brânquias dos curimbas testados estão mostrados na Fig. 6. Os peixes expostos ao pH ou ao AI em todos os tempos experimentais apresentaram valores significativamente menores de AFCC do que os dos grupos CTR respectivos. Nesses grupos, as superfícies apicais das células-cloreto representam, em média, menos de 10% do filamento branquial. Nos grupos CTR o valor médio para a AFCC ficou em torno de 20% do filamento branquial.

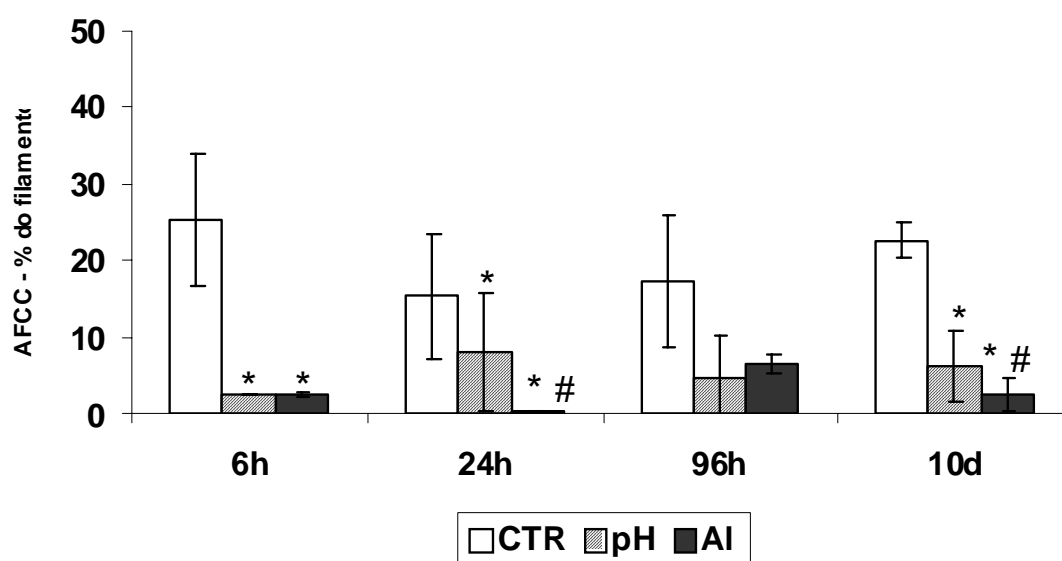


Fig. 6. Área fracional das células-cloreto medida nas brânquias de curimbas dos grupos CTR, pH ou AI de todos os tempos experimentais. As barras indicam as médias e as linhas verticais o DP. * indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo CTR e # indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo pH ($P < 0,05$).

3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

A ultraestrutura branquial dos *P. lineatus* está mostrada nas Fig. 7 e Fig. 8. Nos grupos CTR uma fina camada de células pavimentosas reveste as lamelas e o espaço interlamelar ou canal de água aparece preservado (Fig. 7A). A maior parte das CC foi identificada na base das lamelas e no filamento (Fig. 7A e 7C). As mitocôndrias das CC dos animais CTR tinham a forma elipsóide, com membranas bem definidas. O citoplasma dessas células apresenta sistema tubular bem desenvolvido, núcleo grande

e ovalado, normalmente visível e em posição central na célula. Há pouca quantidade de vacúolos e muito retículo endoplasmático liso (REL). As CC podem apresentar grande superfície apical em contato com o meio aquático, mas, às vezes, elas estão quase que totalmente recobertas por expansões citoplasmáticas das pv, o que restringe o contato dessas células com o meio externo.

Nos animais do grupo pH (Fig. 7B), assim como no CTR, o espaço interlamelar e a espessura das lamelas não foram alterados. As CC também estão mais posicionadas na base das lamelas, apresentando suas superfícies apicais ora em contato com o meio externo, ora recobertas por pv. Nota-se uma maior vacuolização do citoplasma dessas células, bem como uma aparente redução do sistema tubular e REL. As mitocôndrias apresentam formas mais variadas e normalmente alongadas. O núcleo destas células, quando visível, parece menor.

Nos animais expostos ao AI (Fig. 8) a principal diferença observada em relação aos grupos CTR e pH, foi a presença de um maior número de CC nas lamelas, principalmente na ponta destas, além do aumento da espessura das lamelas devido à hipertrofia das pv, o que diminuiu significativamente o espaço interlamelar (Fig. 8C). Aparentemente existe um menor número de mitocôndrias no citoplasma dessas CC, bem como uma grande quantidade de vacúolos, principalmente localizados na superfície apical das CC em contato com o meio externo (Fig. 8B). As mitocôndrias, muitas vezes, apresentam vacúolos e alteração no padrão das membranas. O núcleo, nem sempre visível, mostrou em diversos casos aspecto deformado, com alterações no envoltório e cromatina mais densa, podendo indicar processos de morte celular (Fig. 8A). O citoplasma das CC apresenta expansões citoplasmáticas na superfície apical, o que pode estar relacionado ao aspecto “esponjoso” observado na MEV nos mesmos animais (Fig. 8D).

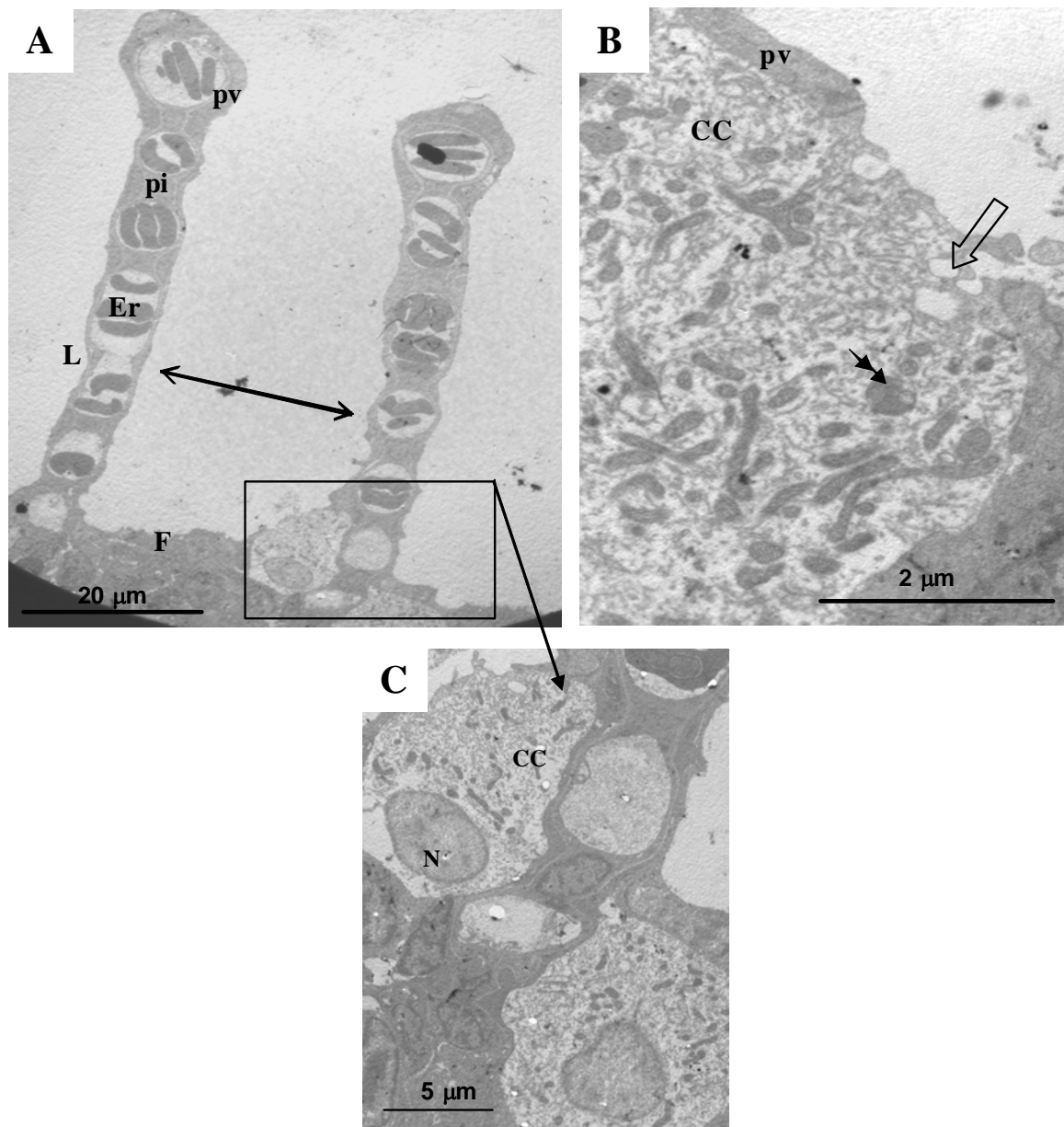


Fig. 7. MET. Micrografias representativas de microscopia eletrônica de transmissão de filamentos branquiais de *P. lineatus*, no ponto de inserção da lamela secundária (L) no filamento (F). Em um exemplar do grupo CTR (em A, aumento de 970x) nota-se o espaço interlamelar preservado (seta), os canais vasculares com eritrócitos (Er) separados pelas células pilares (pi) e as células pavimentosas (pv) fazendo o recobrimento da lamela. O detalhe destacado em C (aumento de 3900x), mostra 2 células cloreto (CC) localizadas nas base da lamela, com núcleo (N) bem definido e citoplasma com sistema tubular bem definido e várias mitocôndrias. Em B (aumento de 9700x) um animal do grupo pH onde nota-se as mitocôndrias de uma CC (seta dupla), um pv recobrindo parcialmente a abertura da CC e uma maior quantidade de vacúolos (seta vazada) na região apical.

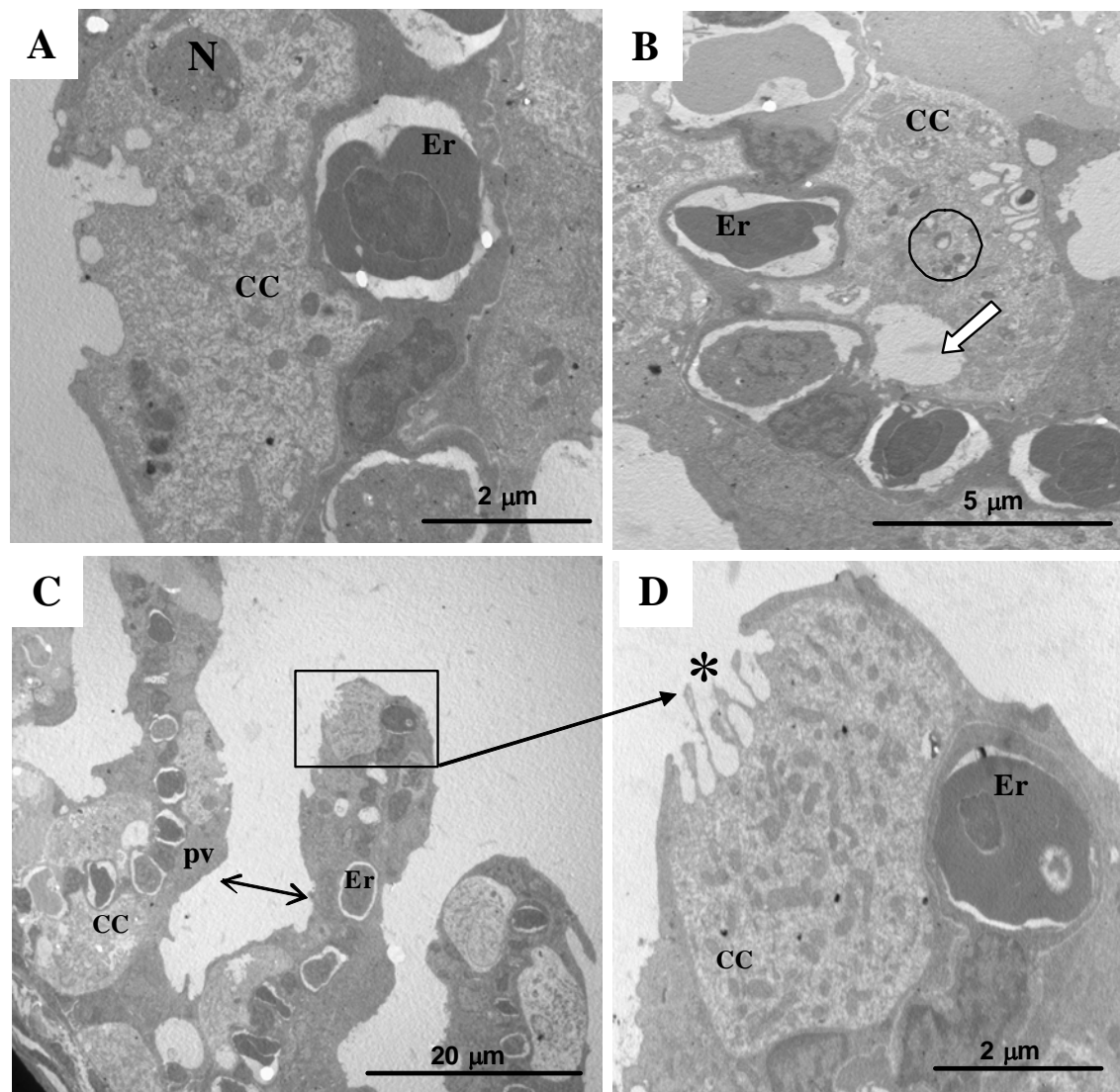


Fig. 8. MET. Micrografias representativas de microscopia eletrônica de transmissão de filamentos branquiais de *P. lineatus*. Em A (aumento de 5800x) tem-se um animal do grupo A1 mostrando CC degenerada com núcleo (N) reduzido e com forma alterada além de vacúolos na abertura e número reduzido de mitocôndrias, percebe-se ainda alterações no canal vascular onde estão os eritrócitos (Er); em B (aumento de 3900x) novamente um animal do grupo A1 mostrando CC com grande vacúolo (seta) e mitocôndrias também vacuolizadas (no círculo). Em C (aumento de 970x) um exemplar do grupo A1 mostra o espaço interlamelar bastante reduzido (seta) em decorrência da hipertrofia das pv. Vê-se muitas CC deslocadas para a ponta da lamela; no detalhe em D (aumento de 5800x) notam-se os prolongamentos da CC para o exterior (*), dando aparência de “esponja” vista na MEV.

4. Discussão

Vários trabalhos têm mostrado a investigação histopatológica como uma boa ferramenta para detectar os efeitos tóxicos de compostos químicos em órgãos-alvo de peixe (Schwaiger et al., 1997, Teh et al., 1997; Fivelstad et al., 2003; Thophon et al., 2003;), mesmo que normalmente não seja possível relacionar um tipo específico de lesão a determinado contaminante (Mallatt, 1985; Silva e Martinez, 2007).

O presente estudo procurou, por meio da histopatologia branquial, avaliar os efeitos de exposições agudas ao Al em meio ácido. A concentração de Al dissolvida utilizada (aproximadamente $200 \mu\text{g.L}^{-1}$) é semelhante à concentração máxima estabelecida na lei brasileira para rios e lagos destinados ao uso humano e proteção de comunidades ícticas, além de também já ter sido utilizada em diferentes estudos com peixes, normalmente na região temperada (Dietrich e Schlatter, 1989; Wilkinson e Campbell, 1993; Witters et al., 1996; D'Cruz et al., 1998; Laudon et al., 2005). Lydersen et al. (2002) afirmaram que qualquer concentração de Al acima de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ já pode ser tóxica para peixes em exposições agudas. Poléo (1995) afirmou que é a polimerização do metal sobre o epitélio branquial que explica sua toxicidade para os peixes, sendo que esse fenômeno começa a acontecer quando o pH atinge a faixa de 5,0. O fato de que temperaturas mais altas da água também estejam relacionadas à polimerização do Al (Lydersen et al., 1990) só aumenta a relevância de estudos com peixes nativos de regiões tropicais, como no caso do curimba, que ainda possui grande relevância econômica nas regiões onde é encontrado (Takasusuki et al., 2004).

Uma das principais alterações observadas nas brânquias dos curimbas expostos ao Al ou somente ao pH foi a hipertrofia das células epiteliais. No caso dos animais expostos somente à acidez, a hipertrofia ocorreu principalmente nas CC localizadas na base das lamelas, local onde esse tipo celular é mais frequentemente encontrado (Perry, 1997; Hirose et al., 2003). Como já mencionado, as brânquias possuem entre suas funções, a de manter o equilíbrio ácido-básico, função atribuída às pv e também às CC (Goss et al., 1998; Clairborne et al., 2002; Hwang e Lee, 2008). Sakuragui et al. (2003) afirmaram que as alterações no equilíbrio iônico e/ou ácido-básico causadas pelo estresse causam alterações morfológicas no epitélio branquial, como um aumento das CC, o que possivelmente aumenta a absorção ativa de íons de forma a repor o efluxo de íons por difusão. Portanto, o aumento do volume das CC nos animais

expostos ao ambiente ácido deve estar relacionado a um aumento na atividade dessas células, provavelmente devido a uma maior necessidade desses animais em excretar o excesso de íons H^+ .

Já nos animais expostos ao Al, foram as células mucosas que apresentaram hipertrofia, sugerindo uma maior produção de muco nesses peixes. O muco facilita as trocas gasosas no epitélio branquial (Brunelli e Tripepi, 2005), fazendo parte, portanto, da composição normal da brânquia de um peixe. Gensemer e Playle (1999), entretanto, relatam que um aumento na cobertura mucosa é freqüente nas brânquias de peixes após estresse ácido ou exposição ao Al. Isso pode ser explicado devido às cargas positivas do Al ligarem-se facilmente às cargas negativas do muco e de estruturas branquiais (Fivelstad et al., 2003), facilitando, assim, o acúmulo do metal sobre a brânquia. Wilkinson e Campbell (1993) afirmam ainda que o excesso de muco induzido pelo Al pode contribuir para os distúrbios na regulação iônica normalmente observados após exposição ao Al.

A hiperplasia de células epiteliais foi, sem dúvida, a alteração mais relevante nos animais expostos ao Al em todos os tempos experimentais, sendo tão severa em alguns casos, que causou fusão parcial ou total das lamelas respiratórias desses animais. Mazon et al. (2002) observaram respostas semelhantes com curimbas expostos ao cobre e Matei e Komov (1992) também observaram fusão e grande desarranjo lamelar em salmões expostos ao Al em meio ácido.

Alterações como hiperplasia e também hipertrofia são consideradas como respostas de defesa já que aumentam a distância entre o sangue do peixe e a água, de forma a reduzir a absorção do contaminante pelo animal (Mallatt, 1985; Hinton e Laurén, 1990; Poleksić e Mitrović-Tutundžić, 1994; Fernandes e Mazon, 2003). Entretanto esse processo aumenta também a distância de difusão dos gases respiratórios (Fernandes e Mazon, 2003), podendo levar a um quadro de hipóxia (Sakuragui et al., 2003), o que, segundo Witters et al. (1996) é a principal causa de morte de peixes em decorrência da exposição ao Al.

Por outro lado, Neville (1985) postula que são as alterações iônicas as principais responsáveis pela toxicidade aguda do Al em meio ácido. As principais alterações observadas, tanto pela microscopia de luz como pela eletrônica nos curimbas expostos ao Al, mostraram que as CC são as células que mais parecem ter sua função alterada. As CC são as principais responsáveis pelo transporte iônico na brânquia (Perry, 1997; Hirose et al., 2003; Varsamos et al., 2005; Hwang e Lee, 2008), e alterações como

maior vacuolização do citoplasma, núcleos deformados, superfície apical com aspecto “esponjoso” entre outras podem mesmo estar comprometendo seu funcionamento e conseqüentemente levar à uma perda significativa na tomada de íons nesses peixes (Wendelaar Bonga, 1997; Dang et al., 2000; Clairborne et al., 2002).

A análise da ultraestrutura das brânquias de *P. lineatus* mostrou semelhança à já observada por Mazon et al. (2002) para a mesma espécie e confirmou muito do que foi indicado pela microscopia de luz no presente trabalho, como por exemplo o desarranjo lamelar, a hiperplasia e a hipertrofia das células epiteliais e principalmente as alterações nas CC nos peixes expostos ao baixo pH ou ao Al. A alteração do padrão das microcristas das células pavimentosas parece ser uma ação direta da acidez sobre o epitélio já que foi observada nos animais dos grupos pH e Al. Microcristas ou microvilosidades aumentam a área superficial das células em contato com o meio externo e servem também como estruturas de retenção de muco, entretanto como já postularam Mazon et al. (2002), é difícil saber o significado fisiológico da redução das microcristas, podendo apenas indicar atividade celular.

Uma alteração freqüentemente observada pela MEV e pela MET nos animais expostos ao Al foi a redução do espaço interlamelar devido à hiperplasia da base das lamelas. Como já discutido anteriormente, o aumento da espessura das lamelas leva a um maior distanciamento do sangue do animal para a água, evitando em parte o contato com o contaminante, mas prejudicando a tomada dos gases respiratórios.

O aspecto esponjoso das CC visto nos animais do grupos pH e Al pode estar relacionado aos prolongamentos emitidos pelo citoplasma dessas células como forma de alcançar o meio externo. Segundo Fernandes e Perna-Martins (2002), esse tipo de CC pode formar uma cripta apical no lugar da abertura normal, devido à cobertura parcial que as células pavimentosas fazem sobre as CC, formando um microambiente diferente do meio externo mais uma vez. Tal situação tem sido relacionada com a dureza da água, mas também já foi descrita para animais transferidos para águas acidificadas (Wendelaar Bonga et al., 1990). A maior cobertura das CC pelas pv pode ser a causa de a área fracional das CC dos animais expostos ao pH e ao Al ter sido significativamente menor do que nos animais CTR e novamente reflete um prejuízo no funcionamento dessas células, principalmente em relação à tomada de íons.

O aumento no número de CCs após exposição à água ácida como visto no presente trabalho também foi observado por Matei e Komov (1992) em salmões expostos ao Al em meio ácido. Tal resposta parece estar relacionada a ajuste do

epitélio branquial ao estresse osmótico e iônico desencadeado pela acidez. Brunelli e Tripepi (2005) estudando anfíbios do gênero *Triturus* expostos ao pH 4,5 explicam que o ácido promove um aumento na permeabilidade das junções oclusivas por remover o cálcio das glicoproteínas carregadas negativamente que selam essas junções, acarretando perda de íons por vias paracelulares, sendo esse processo também descrito para peixes (Monette e McCormick, 2008). Wood e MacDonald (1987) ainda explicam que a perda iônica enfrentada pelos animais deve-se principalmente ao efluxo de Na^+ já que os cátions estimulam os canais de Na^+ e a tomada ativa desse íon é reduzida, principalmente na presença de Al (Goss et al., 1998; Clairborne et al., 2002; Brunelli e Tripepi, 2005; Hwang e Lee, 2008;). O fato das CCs estarem deslocadas da base das lamelas para a região apical também sugere que tais células estejam sendo recrutadas a ficarem em uma posição onde seu contato com a água seja favorecido, facilitando assim, a troca iônica (Dang et al., 2000).

Alterações vasculares foram mais comuns nos animais expostos ao Al em meio ácido o que explica, inclusive, os valores mais altos de VMA e IAH desses animais em relação aos demais grupos. Alterações como hemorragia, aumento do volume dos canais vasculares e aneurismas são consideradas de estágio II segundo classificação de Poleksić e Mitrović-Tutundžić (1994), sendo, portanto, mais severas e causando maior comprometimento à estrutura tecidual.

Exposições subletais a contaminantes costumam afetar principalmente o epitélio lamelar (Hinton e Laurén, 1990), contudo, algumas alterações vasculares também podem acontecer após estresse mais severo, como parece ter ocorrido com os animais expostos ao Al. Nesses casos, os danos se devem às células pilares que, se rompidas, podem ocasionar um maior fluxo de sangue para o interior da lamela, resultando em dilatação do canal marginal, congestão ou até mesmo em um aneurisma (Takashima e Hibiya, 1995; Rosety-Rodríguez, 2002). A formação de um aneurisma normalmente está relacionada com o rompimento do complexo juncional entre as células pilares (Heath, 1987; Martinez et al., 2004), devido ao maior fluxo de sangue ou ainda à ação direta dos contaminantes sobre essas células. Esse é um tipo de lesão considerada mais grave, que dificulta a recuperação do tecido (Poleksić e Mitrović-Tutundžić, 1994).

Estudos focando a distribuição de metais nos tecidos podem ser úteis para entender as vias de acumulação e detoxificação das espécies (Corrêa Jr. et al., 2005). A espectrometria de energia dispersiva (EDS) permite detectar e identificar os raios-X

produzidos pelo impacto do feixe de elétrons na amostra, permitindo uma análise qualitativa e quantitativa dos elementos presentes (Leite et al., 2002). Os dados de EDS para detecção do Al não mostraram, entretanto, uma deposição significativa desse metal na superfície branquial dos curimbas utilizados nos testes como era esperado, já que nem todos os animais expostos ao Al mostraram picos do metal quando analisados pela técnica de EDS. A análise por EDS é limitada ao poder de penetração do feixe de elétrons na amostra, que normalmente é de 1 a 5 μm , permitindo, portanto, somente a caracterização dos elementos constituintes da superfície do material (Leite et al., 2002). O tempo experimental de 96h mostrou os picos mais altos, mas na maioria dos casos, os picos observados não foram muito elevados. A hipótese elaborada foi a de que os tempos de 6 e 24h foram insuficientes para a deposição significativa do Al na brânquia e que 10 dias seja um período excessivo, onde o órgão provavelmente elimina o metal de sua superfície, por meio da morte de algumas células, como por exemplo as CC (Monette e McCormick, 2008). Ainda, a técnica de EDS utilizada no presente estudo (amostras processadas para microscopia de varredura) pode não ter detectado o Al, já que trata-se de uma análise mais superficial. Caso o metal se deposite mais profundamente nas células branquiais, só seria possível verificar sua presença por meio de EDS realizado com microscopia de transmissão, como no trabalho de Corrêa Jr. et al. (2005), que obtiveram resultados melhores na detecção de Cr e Mn no caranguejo *Ucides cordatus*, quando utilizaram-se dessa técnica de EDS.

5. Conclusões

As alterações observadas nas brânquias dos curimbas permitiram concluir que tanto exposições agudas como sub-crônica ao Al em meio ácido desencadearam alterações estruturais que comprometem o epitélio das brânquias e conseqüentemente seu funcionamento. As alterações afetaram as células mucosas e pavimentosas do epitélio, mas principalmente as células-cloreto, que mostraram um maior comprometimento de organelas importantes, como núcleo, mitocôndrias e sistema tubular, afetando então, a capacidade osmorregulatória desses animais.

6. Referências bibliográficas

- Alberti, G., Biesuz, R., Profumo, A., Pesavento, M., 2003. Determination of the total concentration and speciation of Al in tea infusions. *J. Inorg. Biochem.* 97, 79-88.
- Almeida, J.S.; Meletti, P.C.; Martinez, C.B.R. 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol, C* 140, 356 – 363.
- Barcarolli, I.F., Martinez, C.B.R., 2004. Effects of aluminium in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72, 639-646.
- Bindon, S.D.; Gilmour, K.M.; Fenwick, J.C.; Perry, S.F. 1994. The effect of branchial chloride proliferation on gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 97, 47-63.
- Brunelli, E.; Tripeppi, S. 2005. Effects of low pH acute exposure on survival and gill morphology in *Triturus italicus* larvae. *J. Exp. Zool.* 303A: 946-957.
- Camargo, M.M.P.; Martinez, C.B.R. 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 61-69.
- Casarini, D.C.P., Dias, C.L., Alonso, C.D., 2001. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. Série Relatórios, Cetesb, São Paulo.
- CETESB, 2008. Cetesb – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental -Relatório da qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2007. Série Relatórios, Cetesb, São Paulo.
- Clairborne, J.B.; Edwards, S.L.; Morrison-Shetlar, A.I. 2002. Acid-base regulation in fishes:cellular and molecular mechanisms.*J.Exp. Zool.* 293, 302-319.
- Cole, M.B., Arnold, D.E., Watten, B.J., Krise, W.F., 2001. Haematological and physiological responses of brook charr, to untreated and limestone-neutralized acid mine drainage. *J. Fish Biol.*, 59, 79-91.
- CONAMA (2005) – Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução N° 357 de 17 de março de 2005. in: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>. Accessed in: 11/12/2006.
- Corrêa Jr., J.D.; Silva, M.R.; Silva, A.C.B.; Lima, S.M.; Malm, O.; Allodi, S. 2005. Tissue distribution, subcellular localization and endocrine disruption patterns induced by Cr and Mn in the crab *Ucides cordatus*. *Aquat. Toxicol.* 73, 139-154.
- Dang, Z., Lock, R.A.C., Flick, G., Wendelaar Bonga, S.E., 2000. Na/K – ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to cooper. *J. Exp. Biol.*, 151, 517-428.
- Darbre, P.D. 2005. Alumimium, antiperspirant and breast cancer. *J. Inorg. Biochem.* 99, 1912–1919.
- D’Cruz, L.M.; Dockray, J.J.; Morgan, I.J. Wood, C.M. 1998. Physiological effects of sublethal acid exposure in juvenile rainbow trout on limited or unlimited ration during a simulated global warming scenario. *Physiol. Zool.* 71 (4), 359-376.
- Dietrich, D.; Schlatter, C. 1989. Aluminium toxicity to rainbow trout at low pH. *Aquat. Toxicol.* 15, 197-212.
- Evans, D.H.; Piermarini, P.M.; Choe, K.P. 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol Rev* 85: 97–177.

- Exley, C., Chappell, J.S., Birchall, J.D., 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *J. Teor. Biol.*, 151, 417-428.
- Fanta, E.; Rios, F.S.; Romão, S.; Vianna, A.C.C.; Freiberger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54: 119-130.
- Fernandes, M.N.; Perna-Martins, S.A. 2002. Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the gill of armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loriicaridae). *Acta Zoologica*, 83, 321-328.
- Fernandes, M.N.; Mazon, A.F. 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L.; Kapoor, B.G. (Eds.). *Fish adaptations*. Enfield: Science Publishers, 418p.
- Fivelstad, S.; Waagbø, R.; Zeitz, S.F.; Hosfeld, A.C.D.; Olsen, A.B.; Stefansson, S. 2003. A major water quality problem in smolt farms: combined effects of carbon dioxide, reduced pH and aluminium on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts: physiology and growth. *Aquaculture*, 215, 339-357.
- Gensemer, R.W.; R.C. Playle. 1999. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 29: 315-450.
- Goss, G.G.; Perry, S.F.; Fryer, J.N.; Laurent, P. 1998. Gill morphology and aci-base regulation in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 119 (1), 107-115.
- Guibaud, G., Gualthier, C., 2003. Study of aluminum concentration and speciation of surface water in four catchements in Limousin region (France). *J. Inorg. Biochem.*, 16-25.
- Haaparanta, A.; Valtonen, E.T.; Hoffman, R.W. 1997. Gill anomalies of perch and roach from four lakes differing in water quality. *Journal of Fish Biology*. 50: 575-591.
- Heath, A.G., 1987. *Water pollution and fish physiology*. CRC Press, Florida.
- Hinton, D.E.; Laurén, D.J. 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: McCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Eds.) *Biomarkers of Environmental Contamination*. Boca Raton: CRC Press.
- Hirose, S.; Kaneko, T.; Naito, N.; Takei, Y. 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 136, 593-620.
- Howells, G.D. 1984. Fisheries decline: mechanisms and predictions. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. (305) 529-547.
- Hwang, P.P.; Lee, T.H. 2008. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 148, 475-497.
- Karbouj, R.; Desloges, I.; Nortier, P. 2009. A simple pre-treatment of aluminium cookware to minimize aluminium transfer to food. *Food Chem. Toxicol.* 47, 571-577.
- Lara, L.B.L.S.; Artaxo, P.; Martinelli, L.A.; Victoria, R.L.; Camargo, P.B.; Krusche, A.; Ayers, G.P.; Ferraz, E.S.B.; Ballester, M.V. 2001. Chemical composition of rainwater and anthropogenic influences in the Piracicaba River Basin, Southeast Brazil. *Atmos Environ*, 35, 4937-4945.
- Laudon, H.; Antonio B.S. Pole, A.B.S.; Vøllestad, L.A.; Bishop, K. 2005. Survival of brown trout during spring flood in DOC-rich streams in northern Sweden: the effect of present acid deposition and modelled pre-industrial water quality. *Environmental Pollution*, 135, 121-130.

- Leite, B., Ishida, M.L.; Alves, E.; Carrer, H.; Pascholati, S.F.; Kitajima, E.W. 2002. Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca²⁺ and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 645-650.
- Lydersen, E., Salbu, B.; Poléo, A.B.S.; Muniz, I.P. 1990. The influences of temperature on aqueous aluminium chemistry. *Water Air Soil Pollut.*, 51: 203-215.
- Lydersen, E., Rukke, N.W.A.; Jensen, J.G.B., Kjelsberg, B.M., Tornsjø, B.; Vogt, R.D.; Vøllestad, L.A.; Poléo, A.B.S. 2002. Seasonal variation in mortality of brown trout (*Salmo Trutta*) in an acidic Aluminium-Rich Lake. *J. Limnol.* 61 (1) 61-68.
- Mallatt, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences.* 42: 630-648.
- Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2004. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.*, 64, 797-807.
- Matei, V.E.; Komov, V.T. 1992. 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.* 28 (5), 453-460.
- Mazon, A.F.; Cerqueira, C.C.C.; Fernandes, M.N. 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the south american tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ, Res. A*, 88, 52-63.
- Monette, M.Y., McCormick, S.D. 2008. Impacts of short-term acid and aluminum exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar*) physiology: A direct comparison of parr and smolts. *Aquat. Toxicol.* 86, 216-226.
- Neville, C.M. 1985. Physiological responses of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to acid and aluminum – Prediction of field responses from laboratory data. *Can. J. Fish. aquat. Sci.*, 42: 2004-2019.
- Peuranen, S., Vuorinen, P.J., Vuorinen, M., Tuurala, H., 1993. Effects of acidity and aluminium on fish gills in laboratory experiments and in the field. *Sci. Total Environ., Supplement*, 979-988.
- Peuranen, S., Keinanen, M., Tigerstedt, C., Kokko, J., Vuorinen, P.J., 2002. The effects of Fe and Al exposure with or without humic acid at two pH levels on the gills, oxygen consumption and blood and plasma parameters of juvenile grayling (*Thymallus thymallus*). *Large Rivers v.13, n.3-4, Arch. Hidrobiol., Supplement 141/3-4*, 241-261.
- Perry, S.F. 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 45, 325-347.
- Poleksić, V.; Mitrović-Tutundžić, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R.; Lloyd, R. *Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish.* Oxford: Fishing News Books, 1994. c.30, p.339-352.
- Poléo, A.B.S., 1995. Aluminium polymerization – a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquat. Toxicol.*, 31, 347-356.
- Poléo, A.B.S., Ostrabye, K., Osnevad, A.S., Andresen, R.A., Heibo, E., Vollestad, L.A., 1997. Toxicity of acid aluminium-rich water to seven freshwater fish species: a comparative laboratory study. *Environ. Pollut.*, 96, 129-139.
- Rosety-Rodríguez, M.; Ordoñez, F.J.; Rosety, M.; Rosety, J.M.; Ribelles, A.; Carrasco, C. 2002. Morpho-histochemical changes in the gills of turbot, *Scophthalmus maximus* L., induced by sodium dodecyl sulfate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51: 223-228.
- Sakuragui, M.M.; Sanches, J.R.; Fernandes, M.N. 2003. Gill chloride cell

proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *J. Comp. Physiol. B*, 173, 309-317.

Ščančar, J., Stibilj, V., Milačič, R., 2004. Determination of aluminium in slovenian foodstuff and its leachability from aluminium-cookware. *Food Chem.*, 151-157.

Schwaiger, J.; Wanke, R.; Adam, S.; Pawert, M.; Honnen, W.; Triebs Korn, R. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 6: 75-86.

Silva, A.G.; Martinez, C.B.R. 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23, 185–192.

Silva, V.S., Nunes, A.M., Cordeiro, M.J., Calejo, A.I., Santos, S., Neves, P., Sykes, A., Morgado, F., Dunant Y., Gonçalves, P.P. 2007. Comparative effects of aluminum and ouabain on synaptosomal choline uptake, acetylcholine release and (Na⁺/K⁺)ATPase. *Toxicology*, 236, 158-177.

Simonato, J.D.; Albinati, A.C.; Martinez, C.B.R. 2006. Effects of the Water Soluble Fraction of Diesel Fuel Oil on Some Functional Parameters of the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 76, 505–511

Takashima, F.; Hibya, T. 1995. An atlas of fish histology: normal and pathological features. 2 ed. Tokyo: Fisher, 165p.

Takasusuki, J., Araujo, M.R.R., Fernandes, M.N., 2004. Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 1075–1082.

Tammi, J., Rask, M., Vuorenmaa, J., Lappalainen, A., Vesala, S. 2004. Population responses of perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) to recovery from acidification in small Finnish lakes. *Hydrobiologia*, 528, 107-122.

Teh, S.J.; Adams, S.M.; Hinton, D.E. 1997. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*. 37: 51-70.

Teien, H.C., Kroglund, F., Salbu, B., Rosseland, B.O., 2006. Gill reactivity of aluminium species following liming. *Sci. Total Environ.*, 358, 206-220.

Thophon, S.; Kruatrachue, M.; Upatham, E.S.; Pokethitiyook, P.; Sahaphong, S.; Jaritkhuan, S. 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental pollution*. 121: 307-320.

Torre, F.R., Salibian, A., Ferrar, L. 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere*, 68, 1582-1590.

Vanzella, T.P.; Martinez, C.B.R.; Cólus, I.M.S. 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat Res* 631, 36–43

Varsamos, S., Nebel, C., Charmantier, G. 2005. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 141, 401-429.

Vuorinen, P.J., Keinanen, M., Peuranen, S., Tigerstedt, C., 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula* L.) in long-term exposure to acidity and aluminium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54, 255-276.

Waring, C.P., Brown, J.A., 1995. Ionoregulatory and respiratory responses of Brown trout, *Salmo trutta*, exposed to lethal and sublethal aluminium in acidic soft

waters. *Fish Physiol. Biochem.*, 14, 81-91.

Wendelaar Bonga, S.E.; Flick, G.; Balm, P.H.M.; Van der Meij, J.C.A. 1990. The ultrastructure of chloride cells on the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* during exposure to acidified water. *Cell Tissue Res.* 259, 575-585.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress in fish. *Physiol. Rev.*, 77, 591-625.

Wilkinson, K.J.; Campbell, P.G.C. 1993. Aluminum bioconcentration at the gill surface of juvenile atlantic salmon in acidic media. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 2083-2095.

Winkaler, E.U.; Santos, T.R.M.; Machado-Neto, J.G.; Martinez, C.B.R. 2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 145, 236-244.

Witters, H.E.; Van Puymbroeck, S.; Vanderborght, O.I.J. 1992. Branchial and renal ion fluxes and transepithelial electrical potential differences in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of aluminium at low pH. *Environ. Biol. Fish.*, 34, 197-206.

Witters, H.E., S. Van Puymbroeck, A.J.H.X. Stouthart & S.E. Wendelaar Bonga. 1996. Physico-chemical changes of aluminium in mixing zones: Mortality and physiological disturbances in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 986-996.

Wood, C.M., McDonald, D.G., 1982. Physiological mechanisms of toxicity to fish, in: Acid rain fisheries. Johnson, R.E. (Ed.), Bethesda, American Fisheries Society.

Wood, C.M., McDonald, D. 1987. The physiology of acid/ aluminium and toxic effects on Atlantic salmo. In: Witters, H, Vanderborght, O, editors. Ecophysiology of acid stress in aquatic organisms. *Ann Soc R Zool Belg.* 117:399-410.

PARTE IV

Considerações finais



CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho usou duas abordagens distintas para avaliar os efeitos de uma concentração subletal de Al, associado ao pH ácido em um peixe dulcícola neotropical, *Prochilodus lineatus*: primeiro foram considerados os possíveis efeitos nos parâmetros osmo-iônicos e de resposta de estresse (hematológicos, metabólicos e endócrino), buscando verificar as possíveis alterações funcionais no peixe; e segundo foram avaliadas as brânquias dos peixes por meio de microscopia de luz e eletrônica, com o intuito de verificar as alterações causadas no nível estrutural desses animais.

No primeiro artigo apresentado os parâmetros osmo-iônicos foram escolhidos já que a osmorregulação tem sido relatada como sendo o processo que mais sofre os efeitos do Al em peixes. Os efeitos nos íons e osmolaridade obtidos nesse estudo foram muito semelhantes aos de outros trabalhos, realizados com diferentes espécies de peixe, o que parece revelar que alterações na regulação iônica sejam realmente uma característica da contaminação por Al em meio ácido.

Não existe ainda um consenso entre os pesquisadores sobre o mecanismo exato pelo qual o Al em meio ácido afeta a osmorregulação nos peixes. Os indícios mais claros são de que os efeitos concentrem-se na redução da atividade da enzima transportadora de íons, a Na^+/K^+ -ATPase. Uma redução de cerca de 50% foi notada nas brânquias dos curimbas do presente trabalho, fazendo com que os peixes deixassem de captar íons do ambiente, dado também confirmado pelos resultados diminuídos dos íons e da osmolaridade plasmática. Os efeitos do Al também parecem concentrar-se nas células-cloreto (CC) das brânquias, e sendo essas células um local onde a enzima Na^+/K^+ -ATPase é abundante, seu estudo vem acrescentar informações ao processo. No presente trabalho, a imunohistoquímica realizada nas brânquias revelou uma diminuição significativa desse tipo celular nos peixes expostos ao Al, o que corrobora com a hipótese de diminuição da captação ativa de íons, já que as CC, células responsáveis por isso, estão em número reduzido acarretando, muito provavelmente, a redução também da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nesse órgão.

Como já mostrado anteriormente, as brânquias possuem grande importância quando se pretende estudar um peixe submetido ao estresse decorrente da exposição ao Al, principalmente se ocorrer em pH ácido. A importância nesse caso parece estar

mais relacionada às funções de captação ativa de íons e manutenção do equilíbrio ácido-básico, do que propriamente de respiração desse órgão. Portanto, a abordagem do segundo artigo, que procurou avaliar a estrutura branquial de animais expostos, acrescentou importantes dados à análise geral dos efeitos observados.

As brânquias dos peixes submetidos ao AI em pH ácido apresentaram lesões mais sérias e em maior número quando comparadas aos animais do grupo CTR ou expostos somente à acidez. As principais alterações encontradas (hiperplasia, hipertrofia e fusão lamelar) representam formas de defesa do órgão contra a entrada do contaminante via corrente sanguínea, pois aumentam a distância de difusão entre água e sangue, mas acabam prejudicando também as trocas gasosas, podendo levar os animais à hipóxia.

Devido à importância desse tipo celular, as análises de MEV e MET concentraram-se nas CC e revelaram dados que corroboram com os já apresentados no primeiro artigo em relação aos íons e enzima Na^+/K^+ -ATPase. Nos animais expostos somente a acidez, parece haver um aumento no número de CC tanto nos filamentos como nas lamelas; já nos animais expostos ao AI em pH ácido essas células aparecem raramente, e quando sim, foram notadas deslocadas para as pontas das lamelas. Essa mudança de posição das CC poderia estar relacionada a uma tentativa dos animais de captarem mais íons, mantendo as células responsáveis por isso o mais próximas da água quanto for possível. Quando se lembra que a distância de difusão entre água e sangue também mostrou-se muito aumentada nesses animais devido à hiperplasia e hipertrofia do epitélio, fica ainda mais claro o porquê do deslocamento das CC para a região apical das lamelas.

A análise de parâmetros relacionados à resposta de estresse, como glicemia, parâmetros sanguíneos, metabólicos e o hormônio cortisol, só colaboraram para o melhor entendimento do processo pelo qual o AI é tóxico para os peixes.

Devido às alterações na estrutura branquial, que possivelmente reduzem as trocas gasosas, o aumento do número de eritrócitos e conseqüentemente de hemoglobina, significa uma tentativa dos animais de captarem mais oxigênio da água e excretarem o CO_2 produzido. A mobilização da glicose e proteínas aumentando seus níveis no sangue também representam meios do animal responder ao estresse, já que representam energia extra para os vários processos que são requeridos em tais situações. Apesar de não ter sido constatado um aumento nos níveis séricos do cortisol, em nenhum dos animais estudados, é provável que o hormônio tenha

apresentado seus picos logo após as exposições ao AI, já que a maioria das respostas relacionadas anteriormente são mediadas ou mantidas pelo hormônio cortisol, servindo portanto, como uma forma indireta de se comprovar a resposta de estresse.

A maioria das alterações observadas no presente trabalho, sejam elas funcionais ou estruturais, já foram extensivamente relatadas em outros trabalhos com peixes e AI. A principal diferença deste para os demais estudos é que o trabalho aqui apresentado foi realizado com uma espécie de peixe da região neotropical, e a maioria dos anteriores com espécies da Europa e América do Norte.

Estudos como o apresentado aqui são ainda escassos no Brasil, mas extremamente necessários, já que com as temperaturas mais altas dos ambientes tropicais a concentração de oxigênio dissolvido tende a ser menor o que compromete ainda mais a saúde dos peixes nesses locais. Ainda, *P. lineatus* é uma espécie de peixe que realiza migrações para completar seu ciclo reprodutivo, sendo que um contato com o AI em algum momento poderia deixá-lo debilitado e incapaz de migrar, o que comprometeria a sobrevivência da espécie a longo prazo.

Resultados como os que foram apresentados aqui permitem concluir que conhecer bem a fauna de um local e como ela responde às diferentes situações é a melhor maneira de se propor e executar planos adequados de monitoramento da qualidade das águas sujeitas, cada dia mais, a contaminação decorrente da ação antrópica.

PARTE V
Conclusões



CONCLUSÕES

- Exposições agudas a uma concentração subletal de Al em meio ácido causam prejuízos na hiperregulação iônica na espécie de peixe *Prochilodus lineatus*
- A diminuição da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase branquial parece ser a principal causa da menor tomada de íons nesses peixes;
- Exposições agudas e também sub-crônica a uma concentração subletal de Al em meio ácido também promovem alterações estruturais nas brânquias do peixe *Prochilodus lineatus*;
- As alterações afetaram principalmente as células-cloreto das brânquias, levando a uma diminuição da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase dessas células, provável apoptose das mesmas, deslocamento para a área apical da lamela e redução de sua área de abertura, comprometendo no geral a função desse tipo celular.

ANEXO

Artigo in press





Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*

Marina M.P. Camargo^{a,b}, Marisa N. Fernandes^a, Cláudia B.R. Martinez^{b,*}

^a Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luis, Km 235, 13565-905 São Carlos, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid (PR-445), Km 374, 86051-900 Londrina, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2009

Received in revised form 4 May 2009

Accepted 27 May 2009

Keywords:

Chloride cells

Gills

Metal

Na⁺/K⁺-ATPase

Stress response

ABSTRACT

The aim of this study was to understand the effects of the interaction between aluminium and low pH in a native fish species *Prochilodus lineatus*. Thus, juveniles of this neotropical fish species were exposed to 196 µg L⁻¹ of dissolved aluminium in acid water (Al group), only to acid water (pH group) or to water with neutral pH (CTR group) for 6, 24 and 96 h. Al effects were evaluated with regard to hematological parameters (hemoglobin, hematocrit and red blood cell number), plasma ions and osmolarity, density and distribution of chloride cells (CC), Na⁺/K⁺-ATPase activity in the gills, metabolic (protein and glucose) and endocrine (cortisol) parameters. The fish exposed to Al had increased hematological and metabolic parameters in relation to the CTR group after all periods of exposure. In fish exposed to Al for 24 and 96 h plasma ions and osmolarity were significantly lower and the identification of the enzyme Na⁺/K⁺-ATPase by immunohistochemistry indicated a reduction in the number of CC in the gills. Enzyme activity was 50% lower in fish exposed to Al in all experimental times. Taken together these results showed that acute exposure to Al causes an ionic imbalance, probably related to the effects of Al on Na⁺/K⁺-ATPase activity, on the distribution and number of chloride cells in the gills as well as the effects associated with the stress response caused by the presence of the metal.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aluminium is the most abundant metal on earth and mostly occurs as oxide and silicate of aluminium (Ščančar et al., 2004). Aluminium is also found in the atmospheric air of the big cities and industrialized areas (Casarini et al., 2001), and is used as a flocculation agent in water treatment (Silva et al., 2007). Some areas of England, United States and Czech Republic have high concentrations of Al in their river waters, reaching up to 1350 µg L⁻¹ of total Al due to air pollution and acid rain (Guibaud and Gualthier, 2003). In Brazil, this metal is naturally found in the Amazon region soil where the water of the rivers and streams has naturally low pH (Hara and Oliveira, 2004; Artaxo et al., 2005; Horbe et al., 2005). In the state of São Paulo (Southeast Brazil), 35% of the examined surface waters destined for public consumption contain high levels of dissolved Al (100–5700 µg L⁻¹) (CETESB, 2008). Even though, according to the Brazilian law, the limits for dissolved Al in freshwater is between 100 and 200 µg L⁻¹ (CONAMA 357, 2005).

Aluminium is toxic to fishes and most studies on Al toxicity are restricted to fish species from the Northern hemisphere (McCartney

et al., 2003; Monette and McCormick, 2008). In the tropical and neotropical areas such studies are still rare (Barcarolli and Martinez, 2004), leaving a gap in the knowledge of the physiological effects of Al in neotropical fishes where the high temperature of natural water may increase toxicity (Lydersen et al., 1990).

Most of the studies on Al toxicity in fish are related to the pH of water, as the solubility of Al increases linearly with the reduction in pH increasing the presence of inorganic Al, the form of Al most toxic to fish (Gensemer and Playle, 1999). In contrast, acidity, by itself, causes several effects in fishes such as hematological (Wood and McDonald, 1982; Carvalho and Fernandes, 2006), endocrine and metabolic (Cole et al., 2001) and reproductive (Vuorinen et al., 2003) disturbances. However, when acidity is associated with Al in water the effects are concentrated mainly in the gills and all physiological processes related to this organ (Waring and Brown, 1995; Cole et al., 2001; Teien et al., 2006). The gills are a multi-functional organ playing an important role in osmoregulation of fish (Hwang and Lee, 2008). This organ represents the main target-organ of pollutants due to its extensive surface area in contact with the external environment and the very thin barrier between the environmental water and internal milieu of fish (Dang et al., 2000; Cerqueira and Fernandes, 2002). Gills are the most affected organ by Al contaminated water (Dietrich and Schlatter, 1989; Playle and Wood, 1990; Peuranen et al., 1993).

* Corresponding author. Tel.: +55 43 3371 4650; fax: +55 43 3371 4467.
E-mail address: cbueno@uel.br (C.B.R. Martinez).

In the gills the main cells related to ionic regulation are the chloride cells (Hirose et al., 2003), which are located mostly in the gill filaments, close to the base of the lamellae (Perry, 1997; Hirose et al., 2003). Chloride cells (CC) are large and round cells characterized by numerous mitochondria and an extensive tubular membrane system containing a high density of Na^+/K^+ -ATPase activity (Dang et al., 2000).

In order to maintain their body fluid and mineral homeostasis, freshwater teleosts compensate for diffusive ion loss and osmotic gain of water by actively absorbing Na^+ , Cl^- and Ca^{2+} through the gills and producing large volumes of diluted urine, respectively (Hirose et al., 2003). Thus, ion analysis and plasma osmolarity, associated with the determination of density and localization of CC, besides Na^+/K^+ -ATPase activity, which actively transport ions through the gills, should be informative for the understanding of the mechanism of Al toxicity in freshwater teleosts (Peurinen et al., 1993; Vuorinen et al., 2003). Therefore, in the present study an integrated approach examining plasma ions and osmolarity, CC distribution and density, gill Na^+/K^+ -ATPase activity, and hematological parameters besides others associated with stress response, was employed in order to evaluate the effect of acute exposure to aluminium in acid pH on the osmoregulation of the *Prochilodus lineatus* fish. This species was chosen because it represents a neotropical fish commonly found in rivers of the south and southeast regions of Brazil, and it is also considered a potential bioindicator species (Martinez et al., 2004; Takasusuki et al., 2004; Simonato et al., 2006).

2. Materials and methods

Juveniles *P. lineatus* (Valenciennes, 1847) ($n=115$) weighing 20.07 ± 6.08 g and total length equals 12.23 ± 1.23 cm (mean \pm SD) were obtained from the hatchery station of State University of Londrina. Prior to experiments, the fish were acclimated, for 7 days, in 300 L tanks with non-chlorinated water, constant aeration and a photoperiod of 12 h:12 h. During acclimation, the animals were fed with commercial pellet food with 36% protein (Guabi®, BR) every 2 days, and the feeding was suspended 24 h before the beginning of the toxicity tests. The physical and chemical parameters of the water were continuously monitored ($T=21.8 \pm 0.9^\circ\text{C}$; $\text{pH} 7.5 \pm 0.1$; $\text{DO}=7.5 \pm 0.7$ mg O_2 L^{-1} ; conductivity = 133.4 ± 9.7 $\mu\text{S cm}^{-1}$; hardness = 42.5 ± 6.0 mg CaCO_3 L^{-1}).

After acclimation, groups of fish (6 or 7 per aquarium) were transferred to glass aquaria (100 L each) containing water as follows: fish of the control group (CTR) to water with neutral pH; fish of pH group (pH) to water with acid pH (5.0); fish of Al group (Al) to water in acid pH (5.0) + aluminium. Acid pH in water was obtained by the addition of 50% HCl and the aluminium was added to water as $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. The toxicity tests in each experimental time (6, 24 and 96 h) were performed in separated aquaria. All toxicity tests were carried out in duplicate.

During the tests, water was monitored for temperature, pH, dissolved oxygen and conductivity. Samples of water collected immediately after each experimental period were analysed for Al concentration, using atomic absorption spectrophotometry. The concentration of total Al was determined in samples of non-filtered water and the concentration of dissolved Al was determined in filtered water samples (0.45 μm); for both analyses, samples were acidified with HNO_3 .

At the end of each experimental period, fish were anaesthetised with benzocaine (0.1 g L^{-1}) and a blood sample was withdrawn, via the caudal vein, using heparinised plastic syringes. The animals were then killed by medullar section and the gills were removed and processed for immunohistochemical against Na^+/K^+ -ATPase and enzyme assay. Immediately after sampling, the blood was cen-

trifuged (10 min, $10,000 \times g$) and samples of plasma were frozen (-20°C) for osmolarity, ion concentrations, cortisol, glucose and protein analyses.

2.1. Hematological analysis

Blood samples were used to determine the hematocrit (Hct), hemoglobin content (Hb) and red blood cells count (RBC). Hct was determined by micro-hematocrit technique, using heparinised capillary tubes and centrifuged for 5 min in an appropriate centrifuge. Hemoglobin was determined by the cyanometahemoglobin method, in a spectrophotometer (Libra 532, Biochrom, UK) using a commercial kit (Analisa, Brazil). Red blood cells were counted in blood samples fixed in formol-citrate buffer, using an improved Neubauer chamber under a light microscope (magnification of 400X).

2.2. Identification of chloride cells in the gills

The gills were washed with saline solution and samples from the gill were fixed in Bouin's fluid (6 h), dehydrated in ethanolic crescent series and embedded in paraffin. Sagittal sections (8 μm in thickness) were made and processed according to the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) technique to visualize chloride cells, through the identification of Na^+/K^+ -ATPase, according to the method described by Dang et al. (2000). Slides were incubated with a mouse monoclonal antibody to Na^+/K^+ -ATPase (IgG α 5) and goat-anti-mouse IgG was used as the second antiserum. Subsequently, 3-3'-diaminobenzidine (DAB 0.05 M) in Tris-buffered saline (pH 7.4), containing H_2O_2 (0.03%) was applied. Finally, sections were dehydrated and mounted.

The chloride cells were quantified in relation to the filament length (mm) according to their localization: in the gill filament (CCF) or in the gill lamellae (CCL), using a photomicroscope (DM 2500, Leica, Germany) and an image analyser (Leica Qwin, Germany). For each section from the same fish, five filaments were randomly selected and measured for CC quantification. The results were expressed as the number of CC per mm of filament (mean \pm SD).

2.3. Na^+/K^+ -ATPase activity in the gills

After washing the gill arches, the gill filaments were removed and transferred to plastic tubes containing SEI buffer (sucrose 0.3 M, Na_2EDTA 0.1 mM, imidazole 0.03 M, β -mercaptoethanol 10 mM, pH 7.4) and then kept frozen (-20°C) until the moment of enzyme assay. For assay, the gill filaments were homogenised with SEI buffer (10 \times volume) and centrifuged ($10,000 \times g$, 15 min, 4°C). The supernatant was used to determine Na^+/K^+ -ATPase activity, according to the method described by Quabius et al. (1997) and adapted for a microplate reader by Nolan (2000). The assay consists of determining the phosphate released by the samples incubated in buffer (NaCl 100 mM, MgCl_2 8 mM, imidazole 30 mM,

Table 1
Physical and chemical parameters of the water samples collected in the different groups during the tests (6, 24 and 96 h).

Parameter	CTR group	pH group	Al group
Temperature ($^\circ\text{C}$)	22.4 ± 0.5	22.4 ± 0.5	22.5 ± 0.5
pH	7.6 ± 0.5	5.1 ± 0.3	5.2 ± 0.1
Dissolved oxygen (mg O_2 L^{-1})	7.6 ± 1.0	7.4 ± 0.9	7.5 ± 0.8
Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	83.7 ± 23.6	104.1 ± 18.3	104.6 ± 15.0
Hardness (mg CaCO_3 L^{-1})	41.3 ± 7.9	41.6 ± 5.9	44.1 ± 7.3
Total Al ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ND	ND	438.0 ± 36.3
Dissolved Al ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ND	ND	196.0 ± 28.7

The values represent means \pm SD ($n=5$). ND: not detected.

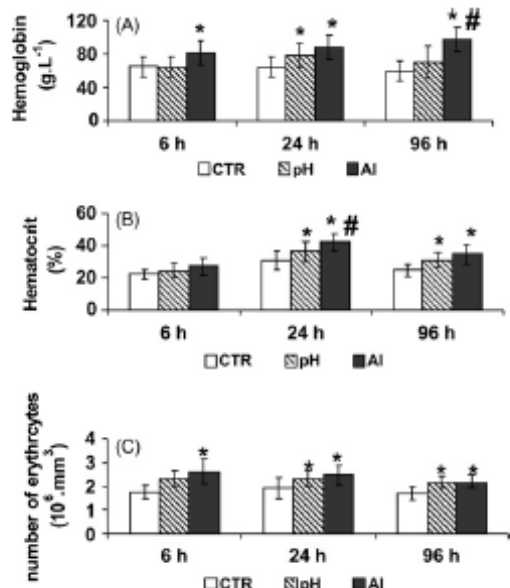


Fig. 1. Hemoglobin (A), hematocrit (B) and number of erythrocytes (C) of *P. lineatus* exposed to 6, 24 and 96 h to CTR, pH or AI groups. The bars indicate mean and the vertical lines, the SD (number of animals: 10–13). *Different from the CTR group and # different from the pH group for each experimental period ($P < 0.05$).

EDTA 0.1 mM, ATP 3 mM, pH 7.6) containing KCl (5 mM) or ouabain (2.5 mM). A solution of 0.65 mM phosphate (Sigma) was used as standard and the samples were analysed in triplicate at 620 nm in a microplate reader (ELX 800, BioTek, USA). Na^+/K^+ -ATPase activity was expressed as $\mu\text{mol Pi}/\text{mg protein h}^{-1}$. Protein concentration was determined according to the method described by Lowry et al. (1951).

2.4. Plasma ions and osmolarity

The concentrations of Na^+ and K^+ were measured in plasma using a flame photometer (Analyser, Brazil). The concentration of Cl^- was determined with the thiocyanate method in spectrophotometer at 470 nm (commercial kit, Analisa, Brazil). Osmolarity

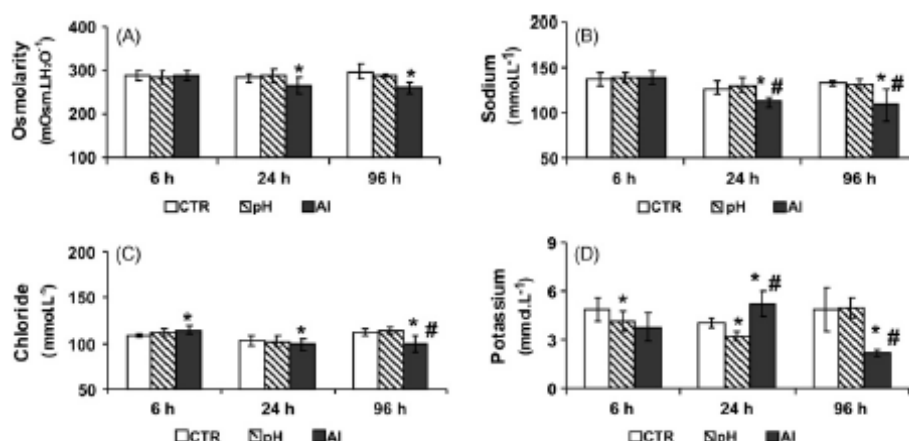


Fig. 2. Plasma osmolarity (A) and concentrations of sodium (B), chloride (C) and potassium (D) of *P. lineatus* exposed to 6, 24 and 96 h to CTR, pH or AI groups. The bars indicate mean and the vertical lines, the SD (number of animals: 10–13). *Different from the CTR group and # different from the pH group for each experimental period ($P < 0.05$).

was determined using a freezing point osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Germany).

2.5. Plasma concentrations of cortisol, glucose and proteins

Cortisol was determined in plasma with a commercial immunoenzymatic assay kit (Diagnostic Systems, Laboratories, USA), and the absorbance was read in a microplate reader at 450 nm. The concentration of glucose was determined using a commercial colorimetric kit (Labstest, Brazil) at 505 nm in a spectrophotometer. Plasma protein concentration was determined according to the method described by Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin (BSA) as standard.

2.6. Statistical analysis

The results are presented as means \pm SD. The results obtained in each treatment (CTR, pH or AI), at each experimental time (6, 24 or 96 h), were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal–Wallis test, depending on data normal distribution and homogeneity of variance. Differences were analysed by a post hoc Tukey test for all pairwise comparisons between treatments. Statistical significance was designated as $P < 0.05$.

3. Results

Only one fish of the AI group died after 24 h of exposure. No fish died in the other groups. Over the course of the study, the values of temperature, dissolved oxygen, conductivity and hardness did not varied significantly among control, pH and AI groups (Table 1). The mean pH values were 7.6 ± 0.5 in control groups and 5.1 ± 0.3 and 5.2 ± 0.1 in pH and AI groups, respectively. In AI groups, the mean concentration of total AI was $438 \pm 36.35 \mu\text{g L}^{-1}$ and of dissolved AI was $196 \pm 28.7 \mu\text{g L}^{-1}$ (Table 1).

3.1. Hematological parameters

Hemoglobin content was significantly greater in *P. lineatus* exposed to AI for 6 h (increased 24.3%), 24 h (increased 38.1%) and 96 h (increased 63.3%) in comparison to respective control fish. Fish exposed only to pH 5 showed a significant increase in Hb content (21.8%) only after 24 h exposure (Fig. 1A). The hematocrit of fish exposed to AI for 24 h ($41.7 \pm 5.5\%$) and 96 h

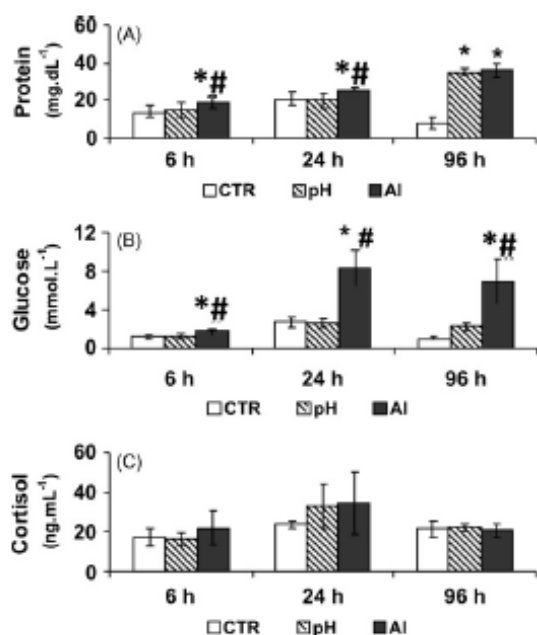


Fig. 3. Plasmatic concentrations of proteins (A), glucose (B) and cortisol (C) of *P. lineatus* exposed to 6, 24 and 96 h to CTR, pH or Al groups. The bars indicate mean and the vertical lines, the SD (number of animals: 10–13). * Different from the CTR group and # different from the pH group for each experimental period ($P < 0.05$).

($34.6 \pm 6.2\%$) or only to pH 5 for 24 h ($36.2 \pm 5.9\%$) and 96 h ($30.7 \pm 4.8\%$) was significantly greater than those of the respective control groups (30.7 ± 5.6 and 24.5 ± 3.9). The exposure to Al or only to acid pH for 6 h did not affect fish hematocrit, which did not differ from control value ($21.8 \pm 3.2\%$) (Fig. 1B). The number of red blood cells also increased significantly after 24 and 96 h of exposure to Al (29.1% and 27.8%, respectively) and to pH 5 (21.2% and 27.2%, respectively), in relation to respective controls (Fig. 1C). After 6 h, only fish exposed to Al showed RBC counts significantly greater (48.3%) than respective control fish (Fig. 1C).

3.2. Plasma ions and osmolarity

Plasma osmolarity decreased significantly in fish exposed to Al for 24 h (6.8%) and 96 h (12.6%) in relation to respective controls (Fig. 2A). Sodium plasmatic concentrations were lower than respective control values after both time points, decreasing from 127.5 to 112.4 mM after 24 h and from 132.7 to 109.3 mM after 96 h of Al exposure (Fig. 2B). Plasma Cl⁻ levels of fish exposed to Al for 24 and 96 h were also significantly lower than control fish (decreased 3.9% and 11.7%, respectively) (Fig. 2C). Plasma osmolarity as well as the plasmatic concentrations of sodium and chloride of fish exposed to pH 5 did not differ from control values throughout the study (Fig. 2A–C). Plasma K⁺ concentrations showed large variability among different exposure times and experimental groups (Fig. 2D).

3.3. Plasma protein, glucose and cortisol

Plasma protein levels of Al exposed fish were significantly greater than in control fish after 6 h (34.7%), 24 h (24%) and 96 h (364%). In fish exposed only to pH 5, for 6 and 24 h, plasma protein

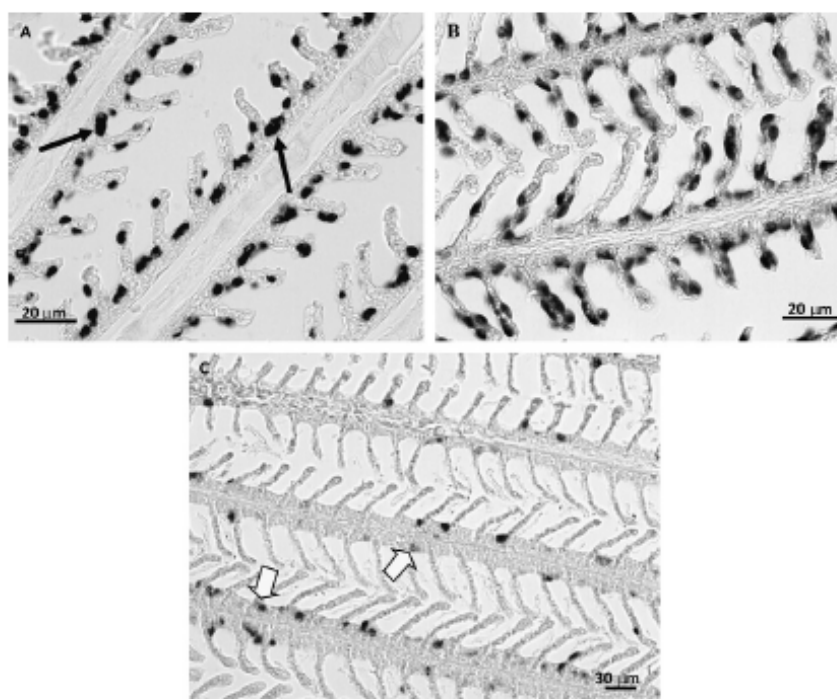


Fig. 4. Immunohistochemistry location of the Na⁺/K⁺-ATPase enzyme in the chloride cells (CC) of *P. lineatus* used in the experiment of 96 h. The arrows indicate strong immunoreactivity of Na⁺/K⁺-ATPase in the fish of CTR group (A). In the gills of fish exposed to Al group (C), white arrows indicate CC weakly stained and also a small number of CC, and in the fish exposed to pH group (B) is noted an increased number of lamellar and filamental CC. Scale bar: 30 μm.

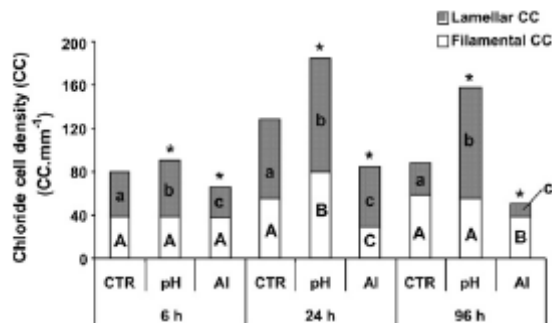


Fig. 5. Density of chloride cells in the lamellar and filamental regions of the gills of *P. lineatus* exposed to 6, 24 and 96 h to CTR, pH or Al groups. * Different from the total number of CC in the respective CTR group; small letters are related to the lamellar CC and capital letters are related to filamental CC. Different letters indicates statistical difference for each parameter in each experimental period ($P < 0.05$).

levels were not affected, but increased significantly (352%) in relation to control group after 96 h exposure (Fig. 3A). Fish exposed to Al also showed significantly higher levels of glucose after 6 h (45.3%), 24 h (213%) and 96 h (492%) than respective control groups (Fig. 3B). Plasma glucose levels were not significantly different between pH and respective control groups, in any experimental period (Fig. 3B). Plasma cortisol concentration did not change significantly among different treatments, in any experimental period, ranging from 16 to 34 ng mL⁻¹ (Fig. 3C).

3.4. CC distribution and density

P. lineatus from the control group has large number of CC distributed throughout the filament and lamellar epithelium (Fig. 4A). The exposure to acid water did not change such CC distribution (Fig. 4B), however, after Al exposure CC in the lamella disappeared and those in the filament were extremely reduced (Fig. 4C). Fig. 5 shows the changes in CC density and localization in the gills of fish from control, pH and Al groups. In general, exposure to acid water induced an increase in CC density in both, filament and lamella (also shown in Fig. 4B). Conversely, aluminium exposure, although in acid water, resulted in significant reduction of CC density in the lamella after 6 h and in both filament and lamella after 24 and 96 h.

3.5. Gill Na⁺/K⁺-ATPase activity

Na⁺/K⁺-ATPase activity in the gills of fish exposed to Al, at all exposure times, showed significant inhibition (on average, 50% reduction) when compared to the animals from control groups (Fig. 6), which Na⁺/K⁺-ATPase activity was 1.22 μM Pi/mg protein h⁻¹. Acid exposure did not produce any sig-

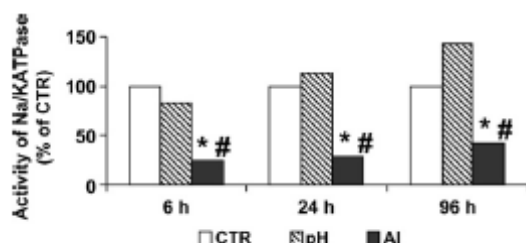


Fig. 6. Percentage of activity of Na⁺/K⁺-ATPase enzyme in the gills of *P. lineatus* exposed to 6, 24 and 96 h to CTR, pH or Al groups. * Different from the CTR group and # different from the pH group for each experimental period ($P < 0.05$).

nificant difference in the Na⁺/K⁺-ATPase activity in relation to CTR groups (Fig. 6).

4. Discussion

The neotropical freshwater fish *P. lineatus* exposed to aluminium, at low water pH (pH 5.0), exhibited osmoregulatory disruption indicated by plasma Na⁺ and Cl⁻ concentration decrease, probably due to the reduction of chloride cells density in the gills and consequent reduced Na⁺/K⁺-ATPase activity. Stress condition, supported by high glucose content in plasma, may have corroborated to osmoregulatory disturbance.

The concentration of dissolved Al and the pH value used in this study have already been reported in surface waters in Brazil (Lara et al., 2001; Flues et al., 2002) due to natural causes or because of anthropogenic emissions. The concentration of 200 μg L⁻¹ of dissolved Al corresponds to the maximal concentration allowed by the Brazilian guidelines for freshwater. However, the results of the present study clearly showed that this concentration promotes some serious effects on fish osmoregulation.

Water pH of 5 is not lethal to *P. lineatus* (Takasusuki et al., 2004) although it has been found to be the maximal tolerated for most freshwater fishes (Playle and Wood, 1990; Poléo, 1995; Waring and Brown, 1995). Values of pH between 6 and 9 are recommended for freshwater used for the protection of fish communities in Brazil (CONAMA 357, 2005). However, episodes of rapid acidification in continental water bodies may occur during ecological accidents. In such situations Al from the soil is mobilised providing high elevation of aluminium in its dissolved and more toxic form affecting fish (Monette and McCormick, 2008).

In the present study, the increased hematocrit and RBC counts after 24 and 96 h exposure to acid water and to Al in acid water cannot be considered as a good indicator of Al exposure, as suggested by Witters et al. (1996), at least, for *P. lineatus*. Changes in blood parameters of same species exposed only to low water pH (pH 4.5 at 20 and 30 °C) have been described by Carvalho and Fernandes (2006). The increased number of RBC and hemoglobin content may represent the secondary stress response, which leads to an increased RBC in the circulation, because of spleen contraction, to improve O₂ uptake for metabolism (Brown, 1993; Wendelaar Bonga, 1997; Hontela, 1998). Elevated blood parameters were also described in Salmoniformes fish, such as *Oncorhynchus mykiss* and *Salmo trutta*, and in the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* after acute exposure to Al in acid water (Witters et al., 1990; Witters et al., 1996; Barcarolli and Martinez, 2004). In these works, Al concentrations varied from 15 to 200 μg L⁻¹. Poléo and Hytterød (2003) also registered elevated blood parameters in salmon exposed to Al concentrations from 28 to 359 μg L⁻¹ in alkaline waters.

Stress response in *P. lineatus* was also indicated by the increased plasma glucose after 6 h of Al exposure. The elevation in plasma glucose is a typical response for any animal facing a stressing situation (Brown, 1993; Lohner et al., 2001) and it is mediated by the catecholamines and cortisol release. The increase in plasma glucose was the result of gluconeogenic processes or hepatic glycogenolysis to supply the increase in the energy demand caused by stress (Witters et al., 1996). Hyperglycaemia has been reported, by several authors, in fishes exposed to copper (Tavares-Dias et al., 2002), to aluminium (Witters et al., 1996; Barcarolli and Martinez, 2004) and other different stressing situations (Mommensen et al., 1999). As the catecholamines are rapidly eliminated from the circulation, the maintenance of the high plasma glucose levels, as observed in the present study, could have resulted from cortisol release, which might have occurred just after exposure to pollutant (Iwama et al., 2004). Cortisol is the main corticosteroid hormone in fish, and toxic agents can thereby interfere on its dynamics (Mommensen et al.,

1999). The absence of significant changes in plasma cortisol, in the present study, corroborates with the data previously reported by Langiano and Martinez (2008) and Pereira-Maduenho and Martinez (2008), for the same fish submitted to different stressful agent. In general, the increase in cortisol occurs between 0.5 and 1 h after exposure to a contaminant (Barton, 2002) returning to the basal levels after some minutes or few hours (Mommensen et al., 1999; Sloman et al., 2001; Iwama et al., 2004). The mobilisation of energy reserves as part of the stress response also includes protein metabolism (Heath, 1987; Adams et al., 1990; Mommensen et al., 1999). In the case of the present study, the high values of total protein observed in the animals exposed to Al may be the result of two events: protein mobilisation to meet the higher energy demand imposed by stress, or cell damage and proteins release due to direct action of the metal on the cells (Exley et al., 1991; Wilson, 1996).

Metals in water may act directly or indirectly via stress hormones in the gills causing changes in osmo-ionic homeostasis. Freshwater fish undergo passive influx of water and ions efflux and equilibrates the osmotic flux excreting large volume of diluted urine and taking actively ions by the gills (Evans et al., 2005; Lingwood et al., 2006; Hwang and Lee, 2008). Aluminium, at concentrations between 100 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ and at a pH of near to 5.0, interacts with the gills and favour electrolytes loss (Dietrich and Schlatter, 1989; Exley et al., 1991). However, the present data suggest that Al interfered on sodium uptake by the gills of *P. lineatus*. Reductions on plasma ions concentrations in fish exposed to Al were already reported (Dietrich and Schlatter, 1989; Exley et al., 1991; Witters et al., 1996). Reductions in plasma sodium and chloride concentrations were found in *L. macrocephalus* exposed to Al in acid pH (Barcarolli and Martinez, 2004) and salmon in similar conditions (Monette and McCormick, 2008).

Decreased plasma ionic concentrations in stressed fishes cannot be related only to the reduced active uptake of ions, the increase in paracellular permeability of the branchial epithelium, which increases the passive efflux of ions, might represent another cause (Monette and McCormick, 2008). In this study, the analysis of chloride cells (CC) and of Na^+/K^+ -ATPase was used as an approach to understand which stage of the osmoregulation process would be damaged in fish exposed to Al.

Na^+/K^+ -ATPase is a protein that is linked to the cell membrane and it uses energy from the hydrolysis of ATP in order to transport 2K^+ into the cell and 3Na^+ out from the cell to the blood, being of great importance in the gills of teleosts (Lingwood et al., 2006; Silva et al., 2007; Hwang and Lee, 2008). There is a positive correlation between the staining of the CC and the activity of this enzyme in the branchial epithelium of fish (Dang et al., 2000). In the present study, the lower activity of Na^+/K^+ -ATPase determined in the gills of the fish exposed to Al could be related to the lower activity of this enzyme in the poorly stained CC and to the smaller number of CC found in the filaments (due to the death of these cells through apoptosis and/or necrosis). Monette and McCormick (2008) also observed similar results in young salmon after acute exposure to Al in acid pH. These authors claim that the CCs are the main site for the accumulation of aluminium in the gills, and consequently the death of these cells would facilitate the elimination of Al from this organ. The few CC noted in the fish exposed to Al seemed to be displaced mostly to the lamellar region rather than in the filament. Dang et al. (2000) obtained similar results in *Oreochromis mossambicus* exposed to copper, i.e., both a decreased number of CC in the filaments and the migration of CC to the branchial lamellae. CC in gill lamellae would be closer to the bloodstream, facilitating ion uptake, which can also mean that these cells are more resistant to the metal than the CC that remain in the filament (Dang et al., 2000). Some of the CC that were found in the lamellae could represent immature cells as well, with a smaller quantity and/or activity of Na^+/K^+ -ATPase, and therefore, they were less stained. The pres-

ence of these immature cells might represent the action of cortisol, which interferes with CC differentiation. In the present study, this idea would be supported by the occurrence of secondary stress responses (such as the increase in blood glucose and hematological parameters). Besides, it is important to point out that the immature CC could show greater concentrations of metallothioneins, proteins that could bind metals and protect the tissue from the direct action of metal ions (Dang et al., 2000).

The increase in the number of CC in fish exposed only to acid water, at all experimental periods may be related to the maintenance of acid–base balance (Clairborne et al., 2002; Sakuragui et al., 2003; Hwang and Lee, 2008), rather than directly related to ion uptake in these fish. Takasusuki et al. (2004) established a high tolerance for changes in water pH for *P. lineatus*, however, a pH of 4.5 is more stressful to this fish species than one of 8.0.

Until now, the exact role of CCs in the transport of Cl^- and Na^+ across the gills and in the acid–base regulation is not well established. The exchange of HCO_3^- for Cl^- together with the H^+/ATPase to eliminate H^+ creates an electrical potential that favours the influx of Na^+ (Hwang and Lee, 2008). This may explain, at least in part, the increasing of these cells in *P. lineatus* exposed to low water pH, allowing fish to maintain an efficient active excretion of H^+ and ion regulation. H^+/ATPase has been found in both the CC and pavement cells of the gill (Goss et al., 1998; Clairborne et al., 2002; Hwang and Lee, 2008).

In summary, the present study points out relevant results of the toxicity of Al in acid water to a neotropical fish species, showing that *P. lineatus* experienced osmoregulatory disturbances. The causes of ionic unbalance is probably related to the effects of Al on Na^+/K^+ -ATPase activity, on the distribution and number of chloride cells in the gills as well as the effects associated with the stress response caused by the presence of the metal.

Acknowledgments

The authors thank the Hatchery Station of State University of Londrina (EPUEL) for the supply of fish and Helen Sadauskas Henrique and Marcelo Gustavo Paulino (UFSCar) for assistance during the immunohistochemistry assay. The Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) supported this work (grant no. 477073/2006-9). This work is part of the PhD Thesis of M.M.P. Camargo who received a doctoral scholarship from CTHidro/CNPq. M.N. Fernandes and C.B.R. Martinez are research fellows from CNPq and members of the Brazilian Institute of Aquatic Toxicology (INCT-TA, CNPq: 573949/2008-5).

References

- Adams, S.M., Shugart, L.R., Southworth, G.R., Hinton, D.E., 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 333–353.
- Artaxo, P., Gatti, L.V., Leal, A.M.C., Longo, K.M., Freitas, S.R., Lara, L.L., Pauliquevis, T.M., Procópio, A.S., Rizzo, L.V., 2005. Química atmosférica na Amazônia: a floresta e as emissões de queimadas controlando a composição da atmosfera amazônica. *Acta Amazonica* 35 (2), 185–196.
- Barcarolli, I.F., Martinez, C.B.R., 2004. Effects of aluminium in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 639–646.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525.
- Brown, J.A., 1993. Endocrine responses to environmental pollutants. In: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (Eds.), *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London, pp. 276–296.
- Carvalho, C.S., Fernandes, M.N., 2006. Effects of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture* 251, 109–117.
- Casarini, D.C.P., Dias, C.L., Alonso, C.D., 2001. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. Série Relatórios. CETESB, São Paulo.

- Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.H., 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 83–91.
- CETESB, 2008. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório da qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 2007. Série Relatórios, CETESB, São Paulo.
- Claiborne, J.B., Edwards, S.L., Morrison-Shetlar, A.I., 2002. Acid–base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J. Exp. Zool.* 293, 302–319.
- Cole, M.B., Arnold, D.E., Watten, B.J., Krise, W.F., 2001. Haematological and physiological responses of brook charr, to untreated and limestone-neutralized acid mine drainage. *J. Fish Biol.* 59, 79–91.
- CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio Ambiente. Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=38&ano=2005> (accessed 11.12.06).
- Dang, Z., Lock, R.A.C., Flick, G., Wendelaar Bonga, S.E., 2000. Na/K-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *J. Exp. Biol.* 151, 517–428.
- Dietrich, D., Schlatter, C., 1989. Aluminium toxicity to rainbow trout at low pH. *Aquat. Toxicol.* 15, 197–212.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid–base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85, 97–177.
- Edey, C., Chappell, J.S., Birchall, J.D., 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *J. Theor. Biol.* 151, 417–428.
- Rues, M., Hama, P., Limes, M.J.L., Dantas, E.S.K., Formado, A., 2002. Evaluation of the rainwater acidity of a rural region due to a coal-fired power plant in Brazil. *Atmos. Environ.* 35, 2397–2404.
- Geneser, R.W., Playle, R.C., 1999. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 29, 315–450.
- Goss, G.G., Perry, S.F., Fryer, J.N., Laurent, P., 1998. Gill morphology and acid–base regulation in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A* 119 (1), 107–115.
- Guibaud, G., Gualthier, C., 2003. Study of aluminum concentration and speciation of surface water in four catchments in Limousin region (France). *J. Inorg. Biochem.* 16–25.
- Hara, F.A., Oliveira, L.A., 2004. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e básicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amazonica* 34 (4), 343–357.
- Heath, A.G., 1987. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press, Florida.
- Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., Takei, Y., 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol. B* 136, 593–620.
- Hontela, A., 1998. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 44–48.
- Horbe, A.M.C., Gomes, I.L.F., Miranda, S.F., Silva, M.S.R., 2005. Contribuição à hidroquímica de drenagens no Município de Manaus—AM. *Acta Amazonica* 35 (2), 119–124.
- Hwang, P.P., Lee, T.H., 2008. New insights into fish ion regulation and mitochondria-rich cells. *Comp. Biochem. Physiol. A* 148, 475–497.
- Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M., 2004. Stress in fish. In: *AquaNet Workshop on Fish Welfare*, Campbell River, B.C., Canada, September 27, 2004, pp. 1–9.
- Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 222–231.
- Lara, L.B.L.S., Artaxo, P., Martinelli, L.A., Victoria, R.L., Camargo, P.B., Krusche, A., Ayers, G.P., Ferraz, E.S.B., Ballester, M.V., 2001. Chemical composition of rainwater and anthropogenic influences in the Piracicaba River Basin, Southeast Brazil. *Atmos. Environ.* 35, 4937–4945.
- Lingwood, D., Harauz, G., Ballantyne, J.S., 2006. Decoupling the Na⁺/K⁺ATPase in vivo: a possible new role in the gills of freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A* 144, 451–457.
- Lohner, T.W., Reash, R.J., Willet, V.E., Fletcher, J., 2001. Assessment of tolerant sunfish populations (*Lepomis* sp.) inhabiting selenium-laden coal ash effluents. Part 3. Serum chemistry and fish health indicators. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 50, 225–232.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lyderson, E., Salbu, B., Poléo, A.B.S., Muniz, I.P., 1990. The influences of temperature on aqueous aluminium chemistry. *Water Air Soil Pollut.* 51, 203–215.
- Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2004. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.* 64, 797–807.
- McCartney, A.G., Harriman, R., Watt, A.W., Moore, D.W., Taylor, E.M., Collen, P., Keay, E.J., 2003. Long-term trends in pH, aluminium and dissolved organic carbon in Scottish fresh waters; implications for brown trout (*Salmo trutta*) survival. *Sci. Total Environ.* 310, 133–141.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211–268.
- Monette, M.Y., McCormick, S.D., 2008. Impacts of short-term acid and aluminum exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar*) physiology: a direct comparison of parr and smolts. *Aquat. Toxicol.* 86, 216–226.
- Nolan, D.T., 2000. Skin response of fish to stressors. Ph.D. Thesis, Catholic University of Nijmegen, Holland.
- Pereira-Maduenho, L., Martinez, C.B.R., 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 148C, 265–272.
- Perry, S.F., 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 45, 325–347.
- Peuranen, S., Vuorinen, P.J., Vuorinen, M., Tuurala, H., 1993. Effects of acidity and aluminium on fish gills in laboratory experiments and in the field. *Sci. Total Environ. Suppl.*, 979–988.
- Playle, R.C., Wood, C.M., 1990. Is precipitation of aluminum fast enough to explain aluminum deposition on fish gills? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 1558–1561.
- Poléo, A.B.S., 1995. Aluminium polymerization—a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquat. Toxicol.* 31, 347–356.
- Poléo, A.B.S., Hyttered, S., 2003. The effects of aluminium in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with emphasis on alkaline water. *J. Inorg. Biochem.*, 89–96.
- Quabius, E.S., Balm, P.H.M., Wendelaar Bonga, S.E., 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 472–482.
- Sakuragui, M.M., Sanches, J.R., Fernandes, M.H., 2003. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *J. Comp. Physiol. B* 173, 309–317.
- Ščančar, J., Stibilj, V., Milačič, R., 2004. Determination of aluminium in slovenian foodstuff and its leachability from aluminium-cookware. *Food Chem.*, 151–157.
- Silva, V.S., Nunes, A.M., Cordeiro, M.J., Calejo, A.I., Santos, S., Neves, P., Sykes, A., Morgado, F., Durant, Y., Gonçalves, P.P., 2007. Comparative effects of aluminium and ouabain on synaptosomal choline uptake, acetylcholine release and (Na⁺/K⁺)ATPase. *Toxicology* 236, 158–177.
- Simonato, J.D., Albinati, C.A., Martinez, C.B.R., 2006. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76, 505–511.
- Sloan, K.A., Taylor, A.C., Metcalfe, N.B., Gilmour, K.M., 2001. Stress from air emersion fails to alter chloride cell numbers in the gills of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 59, 186–190.
- Takasuzuki, J., Araujo, M.R.R., Fernandes, M.H., 2004. Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 1075–1082.
- Tavares-Dias, M., Martins, M.L., Schalch, S.H.C., Onala, E.M., Quintana, C.I.F., Moraes, J.R.E., Moraes, F.R., 2002. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, (Osteichthyes, Characidae) tratado com sulfato de cobre (CuSO₄). *Acta Scient.* 24, 547–554.
- Teien, H.C., Kroglund, F., Salbu, B., Rosseland, B.O., 2006. Gill reactivity of aluminium species following liming. *Sci. Total Environ.* 358, 206–220.
- Vuorinen, P.J., Keinänen, M., Peuranen, S., Tigerstedt, C., 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula* L.) in long-term exposure to acidity and aluminium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 255–276.
- Waring, C.P., Brown, J.A., 1995. Ionoregulatory and respiratory responses of Brown trout, *Salmo trutta*, exposed to lethal and sublethal aluminium in acidic soft waters. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 81–91.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625.
- Wilson, R.W., 1996. Physiological and metabolic costs of acclimation to chronic sub-lethal acid and aluminium exposure in rainbow trout. In: Taylor, E.W. (Ed.), *Toxicology of Aquatic Pollution. Physiological, Cellular and Molecular Approaches*. Society for Experimental Biology, Seminar Series 57, University Press, Cambridge, pp. 143–167.
- Witters, H.E., Van Puymbroeck, S., Van Den Sande, I., Vanderborcht, O.L.J., 1990. Haematological disturbances and osmotic shifts in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under acid and aluminium exposure. *J. Comp. Physiol. B* 160, 563–571.
- Witters, H.E., Puymbroeck, S.V., Stouthart, J.H.X., Wendelaar Bonga, S.E., 1996. Physicochemical changes of aluminium in mixing zone: mortality and physiological disturbances in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (6), 986–996.
- Wood, C.M., McDonald, D.G., 1982. Physiological mechanisms of toxicity to fish. In: Johnson, R.E. (Ed.), *Acid Rain Fisheries*. American Fisheries Society, Bethesda.