

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

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO ESTRESSE EM *Prochilodus scrofa*
DURANTE A EXPOSIÇÃO AO COBRE E SUBSEQÜENTE
RECUPERAÇÃO EM ÁGUA SEM COBRE**

GUILHERME HENRIQUE DYONÍSIO PINHEIRO

Dissertação 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 Mestre em Ecologia e Recursos Naturais, tendo como orientadora a Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes.

SÃO CARLOS – SP
2004

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

P654rf

Pinheiro, Guilherme Henrique Dyonísio.

Respostas fisiológicas ao estresse em *Prochilodus scrofa* durante a exposição ao cobre e subsequente recuperação em água sem cobre / Guilherme Henrique Dyonísio. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

54 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Efeitos da poluição ambiental sobre os organismos. 2. Cortisol. 3. Estresse. 4. Na⁺/K⁺-ATPase. I. Título.

CDD: 574.5222(20^a)

ORIENTADORA

Dr^a Marisa Marciso Fernandes

Dedico este trabalho Karina, meu amor, e aos meus familiares, Beth, Noel e Clara, que sempre incentivaram e compartilharam comigo todos esses momentos.

AGRADECIMENTOS

A prof^a Dr^a Marisa Narciso Fernandes pela oportunidade, confiança e orientação;

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões e contribuições;

A FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro e a Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Furnas, Furnas-MG, pelos peixes fornecidos para realização deste trabalho;

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), pela utilização de seus laboratórios;

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas pela convivência, ajuda e carinho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN - UFSCar), pela oportunidade;

Ao tecnólogo José Roberto Sanches e ao técnico Nelson Mattos, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e pela amizade;

Aos secretários João, Roseli e Renata (PPG-ERN) e Carmem (DCF), pela atenção, paciência e disposição;

Aos colegas dos Laboratórios de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa e de Histologia: Aninha, André Cruz, Aurélia, Cheila, Cléo Leite, Eliane Oba, Flávia, Jane, Jeane, Laila, Lenise, Rosenil, Sandro e todos aqueles que muito me ensinaram e que, de alguma maneira, compartilharam os momentos de alegrias e de dificuldades durante a realização deste trabalho.

Em especial aos amigos de laboratório Marise Sakuragui, Fábio Castro, Cleoni Carvalho e Ellen Gravi pela ajuda indispensável no desenvolvimento deste trabalho;

E finalmente, agradeço a Deus, que é luz e que sempre ilumina meus caminhos.

RESUMO

O cobre é um elemento-traço essencial a todos os organismos, entretanto quando em alta concentração no meio aquático pode ser potencialmente tóxico. As alterações fisiológicas causadas pelo cobre em peixes têm sido analisadas, em geral, após exposições agudas (96h). O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações fisiológicas associadas ao estresse, durante o período de exposição aguda ao cobre e o período de recuperação em água sem a presença de cobre. As alterações provocadas pelo estresse associado à transferência dos animais para os sistemas experimentais também foram avaliadas. *Prochilodus scrofa* jovens foram aclimatados durante 30 dias e posteriormente animais foram amostrados e o sangue coletado para análise de pH e hematócrito sanguíneos, cortisol, glicose e íons (Na^+ , Cl^- e K^+) plasmáticos e determinação da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase das brânquias. Os animais remanescentes foram divididos em dois grupos controle (C) e exposto ao cobre (CU) e transferidos para aquários de vidro onde permaneceram durante 4 dias. O grupo CU foi exposto ao cobre ($\text{CL}_{50-96\text{h}} = 29 \mu\text{gCu L}^{-1}$). As amostragens foram efetuadas após 1, 2, 3 e 4 dias de exposição ao cobre. Os animais sobreviventes foram então transferidos para aquários com água corrente sem cobre e amostragens foram efetuadas após 1, 2, 7, 15 e 30 dias de recuperação. Amostras de sangue foram coletadas para as mesmas análises citadas acima. A concentração de cortisol plasmático aumentou 300 a 400% nos grupos controle e expostos ao cobre em relação aos animais aclimatados e a glicose plasmática aumentou 800% somente nos animais expostos ao cobre durante o período de exposição e retornaram aos níveis dos animais aclimatados no 2º dia de recuperação. As alterações nas concentrações dos íons plasmáticos (Na^+ , Cl^- e K^+) e pH, em geral, não foram significantes em relação aos animais aclimatados, mas alterações significativas foram observadas entre os grupos controle e exposto ao cobre durante a exposição ao cobre e recuperação. A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias foi menor no grupo CU durante a exposição ao cobre e 1º dia de recuperação. O hematócrito aumentou significativamente durante a exposição ao metal, mas após o primeiro dia de recuperação retornou aos valores normais. Embora tenha ocorrido alteração nos parâmetros analisados, após o sétimo dia de transferência para água sem cobre houve uma tendência de recuperação em todos os aspectos fisiológicos. Os resultados do presente estudo mostraram que a resposta ao estresse por exposição ao cobre é complexa e que *P. scrofa* apresenta a alta susceptibilidade à manipulação evidenciando a importância de estudos que envolvem comparações com animais considerados aclimatados ou não estressados e animais de grupos controle e expostos a um dado estressor.

ABSTRACT

Copper is an essential trace-element for all live organisms however, when its concentration is high in the aquatic environment, copper is potentially toxic. Most physiological changes caused by copper in fish has been analyzed after acute exposure (96h). The aim of this study was investigate the physiological responses of *Prochilodus scrofa* to stress, during acute copper exposition (24, 48, 72 and 96 hours) and recovery period after animal transference to clean water, and the time necessary to recovery after animals transference to clean water. The changes associated to fish transference to experimental systems were also evaluated. Juveniles *Prochilodus scrofa* were acclimated during 30 days and then fish were sampled to take blood for pH, hematocrit, plasma cortisol glucose and ions (Na^+ , Cl^- e K^+) analyses and specific Na^+/K^+ -ATPase activity of gills. The remaining fish were divided in two groups: control (C) and exposed to copper (CU) and transferred to glass aquariums where was kept for 4 days. CU groups were exposed to copper (96h- $\text{CL}_{50} = 29 \mu\text{gCu L}^{-1}$). Sampling was done 1, 2, 3 and 4 days of copper exposure. Surviving fish were then transferred to aquariums with flowing water without copper and sampling was done 1, 2, 7, 15 and 30 days of recovery. Blood sampling was taken for the same analyses above cited. Plasma cortisol concentration increased 300 a 400% in control and copper exposed groups related to acclimated fish, plasma glucose increased 800% only in the copper exposed groups during the exposure period and returned to normal levels in the 2nd day of recovery. In general, the changes in plasma ion (Na^+ , Cl^- e K^+) concentrations and pH were not significant in relation to those of acclimated fish however, significant changes were found between the values of control and copper exposed groups during copper exposure and recovery period. The activity of Na^+/K^+ -ATPase of gills was lower in the CU group during the copper exposure period and on the 1st day of recovery. The hematocrit increased during metal exposure but on the 1st day of recovery reached the normal values. Although changes were found on the analyzed parameters, on the 7th days after the transference to clean water all parameters evidenced a tendency to recovery the physiological changes reaching the values of acclimated fish. The present study showed that the stress responses to copper exposure is complex and *P. scrofa* presents high susceptibility to handling evidencing the importance of comparative analyses involving acclimated and/or unstressed fish together with the controls and exposed fish to a given stressor.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Algumas alterações fisiológicas causadas por agentes estressores, (como o cobre, por exemplo), no organismo de peixes. Modificado de Hontela (1998)..... 07
- FIGURA 2.** - *Prochilodus scrofa*, Steindachner (1881). Escala em cm..... 10
- FIGURA 3.** Esquema do protocolo experimental utilizado no período de exposição em 24, 48, 72 e 96 horas para análise das alterações provocadas em *Prochilodus scrofa* pelo estresse induzido pelo cobre ($29 \mu\text{gCu.L}^{-1}$) e pela manipulação nas transferências para novos ambientes. Dos animais coletados foram obtidos sangue e brânquias para análise..... 12
- FIGURA 4.** Esquema do protocolo experimental utilizado no período de recuperação em 1, 2, 7, 15 e 30 dias para avaliar a recuperação das alterações provocadas em *Prochilodus scrofa* pelo estresse induzido pelo cobre e pela manipulação nas transferências para novos ambientes após o período de exposição (96 horas). Dos animais coletados foram obtidos sangue e brânquias para análise..... 13
- FIGURA 5.** Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) das concentrações plasmáticas de cortisol em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre..... 20
- FIGURA 6.** Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) da concentração plasmática de glicose em *P. scrofa* durante a exposição 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre. 22
- FIGURA 7.** Porcentagens dos valores médios \pm SEM (n = 6) das concentrações plasmáticas de Na⁺ (mEq.L⁻¹) em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100%). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre..... 25
- FIGURA 8.** Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) das concentrações plasmáticas de Cl⁻ em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre..... 26
- FIGURA 9.** Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) da razão Na:Cl em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre..... 27

FIGURA 10. Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) das concentrações plasmáticas de K^+ em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre..... 28

FIGURA 11. Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) de pH sanguíneo em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre..... 30

FIGURA 12. Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) do hematócrito sanguíneo (%) em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre..... 31

FIGURA 13. Variação da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase em relação às diferentes concentrações proteína, Na_2ATP e tempo de incubação. Os valores estão representados pela média \pm SEM (n = 6). * indica maior atividade da enzima..... 34

FIGURA 14 – Variação da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase em relação às diferentes concentrações de KCl, MgCl₂, NaCl e Ouabaína. Os valores estão representados pela média \pm SEM (n = 6). * indica maior atividade da enzima..... 35

FIGURA 14. Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) da atividade da enzima Na^+K^+ -ATPase em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre..... 36

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1. Valores médios \pm SEM (n = 6) das concentrações plasmáticas de cortisol em <i>P. scrofa</i> do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante o período de exposição de 96h: 1, 2, 3 e 4 dias (E ₁ , E ₂ , E ₃ e E ₄ , respectivamente) e posterior período de recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R ₁ , R ₂ , R ₇ , R ₁₅ e R ₃₀)..... | 20 |
| TABELA 2. Valores médios \pm SEM (n = 6) da concentração plasmática de glicose em <i>P. scrofa</i> do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E ₁ , E ₂ , E ₃ e E ₄ , respectivamente) e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R ₁ , R ₂ , R ₇ , R ₁₅ e R ₃₀)..... | 22 |
| TABELA 3. Valores médios \pm SEM (n = 6) das concentrações plasmáticas de íons Na ⁺ em <i>P. scrofa</i> do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante o período de exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E ₁ , E ₂ , E ₃ e E ₄ , respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R ₁ , R ₂ , R ₇ , R ₁₅ e R ₃₀)..... | 25 |
| TABELA 4. Valores médios \pm SEM (n = 6) das concentrações plasmáticas de íons Cl ⁻ em <i>P. scrofa</i> do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E ₁ , E ₂ , E ₃ e E ₄ , respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R ₁ , R ₂ , R ₇ , R ₁₅ e R ₃₀)..... | 26 |
| TABELA 5. Valores médios \pm SEM (n = 6) da razão Na:Cl em <i>P. scrofa</i> do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E ₁ , E ₂ , E ₃ e E ₄ , respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R ₁ , R ₂ , R ₇ , R ₁₅ e R ₃₀)..... | 27 |
| TABELA 6. Valores médios \pm SEM (n = 6) das concentrações plasmáticas de potássio em <i>P. scrofa</i> do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E ₁ , E ₂ , E ₃ e E ₄ , respectivamente) e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R ₁ , R ₂ , R ₇ , R ₁₅ e R ₃₀). * indica diferença estatística significativa (p<0,05) em relação ao controle no respectivo tempo..... | 27 |
| TABELA 7. Valores médios \pm SEM (n = 6) do pH sanguíneo em <i>P. scrofa</i> do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E ₁ , E ₂ , E ₃ e E ₄ , respectivamente) e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R ₁ , R ₂ , R ₇ , R ₁₅ e R ₃₀)..... | 30 |
| TABELA 8. Valores médios \pm SEM (n = 6) da porcentagem de hematócrito em <i>P. scrofa</i> do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E ₁ , E ₂ , E ₃ e E ₄ , respectivamente) e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R ₁ , R ₂ , R ₇ , R ₁₅ e R ₃₀)..... | 31 |
| TABELA 9. Valores médios \pm SEM (n = 6) da atividade da enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase em <i>P. scrofa</i> do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E ₁ , E ₂ , E ₃ e E ₄ , respectivamente) e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R ₁ , R ₂ , R ₇ , R ₁₅ e R ₃₀)..... | 36 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1.0 – Introdução..... | 01 |
| 1.1 - Contaminação do ambiente aquático..... | 01 |
| 1.2 - Cobre no ambiente aquático..... | 01 |
| 1.3 - Cobre como elemento essencial..... | 03 |
| 1.4 - Cobre nos organismos aquáticos (peixes)..... | 03 |
| 1.5 - Respostas ao estresse em peixes..... | 05 |
| 1.6 - Espécie estudada..... | 08 |
| 2.0 – Objetivo..... | 09 |
| 3.0 - Materiais e métodos..... | 10 |
| 3.1 - Protocolo experimental..... | 10 |
| 3.2 - Análises do sangue e do tecido branquial..... | 13 |
| 3.2.1 - Análise em sangue total..... | 13 |
| 3.2.2 - Análise do plasma..... | 14 |
| 3.2.2.1 - Análise da glicose no plasma..... | 14 |
| 3.2.2.2 - Análise dos íons plasmáticos..... | 14 |
| 3.2.2.3 -Análise do cortisol plasmático..... | 14 |
| 3.2.3 – Protocolo básico para análise da atividade da enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase no tecido branquial..... | 15 |
| 3.2.3.1 -Caracterização da atividade da enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase em <i>Prochilodus scrofa</i> | 16 |
| 3.2.3.2. Análise de Proteínas do tecido branquial..... | 16 |
| 3.3 - Análise estatística..... | 17 |
| 4.0 - Resultados..... | 18 |
| 4.1 - Cortisol Plasmático..... | 18 |
| 4.2 - Glicose Plasmática..... | 19 |
| 4.3 - Íons Plasmáticos..... | 21 |
| 4.4 - pH sanguíneo..... | 29 |
| 4.5 - Hematócrito..... | 29 |
| 4.6 - Caracterização da atividade da enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase em <i>Prochilodus scrofa</i> .. | 32 |
| 4.7 - Atividade da Enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase durante as 96 horas de exposição..... | 33 |
| 5.0 - Discussão..... | 37 |
| 6.0 - Conclusões..... | 46 |
| 7.0 – Referências bibliográficas..... | 47 |

1.0 - Introdução

1.1 - Contaminação do ambiente aquático

Com o processo de industrialização, a capacidade do homem para modificar o ambiente vem se tornando cada vez mais ampla e profunda. Um grande número de substâncias participa de ciclos naturais, porém a necessidade de produção industrial reprime ou acelera esses ciclos, fazendo com que um grande número dessas substâncias químicas, que antes estavam na litosfera, retornem à superfície terrestre, primeiro em forma de bens de consumo, depois tornando-se contaminante.

A consequência direta deste fato é a contaminação dos ecossistemas aquáticos, terrestres e também da atmosfera levando o homem a preocupar-se, cada vez mais, com os possíveis efeitos tóxicos desses contaminantes.

Os organismos aquáticos são os que estão mais diretamente expostos aos efeitos desses agentes tóxicos, visto que rios e lagos recebem uma elevada carga diária de esgoto sem nenhum tipo de tratamento. Os efluentes, principalmente, os industriais, despejam metais pesados como cobre, cádmio, zinco, estanho, alumínio e outros, causando desde o acúmulo de metais em seus tecidos até a morte desses organismos (Sorensen, 1991).

1.2 - Cobre no ambiente aquático

O cobre, elemento-traço essencial para o funcionamento dos seres vivos, quando em alta concentração no meio aquático, atua como um poluente. Os níveis de cobre solúveis

em água doce não contaminadas variam de 0,5 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Alabaster, 1982) aumentando para $\geq 2 \mu\text{g L}^{-1}$ em áreas urbanas (Moore e Ramamoorthy, 1984).

Como resultado do desenvolvimento industrial na região sul e sudeste, os níveis de cobre no meio aquático, que usualmente eram inferiores a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, têm aumentado nas últimas décadas podendo tornar-se um agente estressante (Mazon e Fernandes, 1999; Takasusuki *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2004)

Embora o Brasil tenha adotado (Resolução CONAMA nº 20, de 18/06/1986) as recomendações da USEPA (1984) cujo limite máximo de cobre permitido nos mananciais para a proteção da vida aquática é de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, os relatórios da CETESB (1990-2003) têm mostrado que valores tão altos quanto 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre têm sido encontrados em nossos rios em alguns períodos do ano. Além da atividade industrial, o uso de sulfato de cobre (CuSO_4) para controle da quantidade excessiva de fitoplâncton em reservatórios eutróficos e sua aplicação em aquicultura para o controle de infecções e agentes patológicos de peixes (fungos e parasitas), tem contribuído para o aumento da concentração deste metal no ambiente aquático. Nestes casos as concentrações de cobre podem variar de 300 a 2.000 $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ (Nor, 1987, Ling *et al.* 1993), o que equivale a valores até 100 vezes maior do que o recomendado pela USEPA (1984), podendo causar alterações no ecossistema aquático e promover respostas em todos os níveis de organismos aquáticos, incluindo os peixes.

1.3 - Cobre como elemento essencial

O cobre é um elemento essencial requerido por todos os organismos. Sendo classificado como metal traço ele é encontrado em todas as células em concentrações picomolares, mas pode ser potencialmente tóxico para muitos organismos (Sarkka, 1978, Grosell, 1998).

Aproximadamente 30 enzimas e glicoproteínas usam o cobre como cofator, por exemplo: catalase, amino-oxidases, citocromo-oxidase, dismutase e outras (Sorensen, 1991; Arelano, 1999). O cobre é importante também para o transporte de elétrons durante a fosforilação oxidativa (Lehninger, 1975; Bloomer e Lee, 1978; Weser, *et al.*, 1979; Moore e Ramamoorthy, 1984; Torres, *et al.*, 1987); a absorção de ferro no sistema gastrointestinal e a manutenção da mielina no sistema nervoso (Sorensen, 1991).

Um complexo mecanismo homeostático regula os níveis internos de cobre. Quando ocorre um aumento da concentração deste metal no ambiente, mecanismos de defesa, como o aumento da produção de muco e a síntese de isometalotionina são acionados para proteger o peixe contra a sua ação tóxica (Sorensen, 1991), visto que altas concentrações de cobre no meio aquático podem ser letais para os peixes (Doudoroff e Katz, 1953; Pickering e Henderson, 1966).

1.4 - Cobre nos organismos aquáticos (peixes)

A brânquia é o principal sítio de entrada de diversos agentes tóxicos para o interior dos organismos aquáticos. Em truta arco-íris pode-se notar um aumento de 10 vezes na

entrada de cobre em poucas horas de exposição e isto ocorre simultaneamente com o aparecimento desse metal no sangue (Grosell, *et al.*, 1997).

A tomada de cobre nas brânquias, provavelmente envolve os seguintes passos, segundo Campbell (1999): 1) ligação do cobre com a superfície das brânquias; 2) movimento do cobre através da membrana apical para o interior das células branquiais; 3) tráfego intracelular de cobre para a membrana basolateral e 4) movimento do cobre das células branquiais para o sangue.

In vivo, a tentativa de entender a cinética do transporte de cobre é complicada pela sua rápida remoção do plasma (Tarazoma, 1994). Esse problema parece ser resolvido quando se utilizam estudos *in vitro* com perfusão das brânquias (Perry *et al.* 1984), porém esses estudos que permitem avaliar a tomada de metais apresentam diferenças com a absorção *in vivo*, que podem ser atribuídas à deterioração do tecido branquial perfundido devido à toxicidade do metal (Spry e Wood, 1988).

Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) classificaram as lesões causadas no tecido branquial considerando o tipo e a localização das lesões e dividiu-as em três estágios progressivos. Em seguida propôs um índice na tentativa de avaliar a capacidade de restauração do tecido e suas respectivas funções após a remoção dos agentes poluidores. Edemas e conseqüentemente descolamento do epitélio da lamela secundária branquial e a ligeira proliferação celular foram considerados danos moderados do tecido branquial. A ruptura do epitélio e a fusão lamelar foram consideradas danos severos que afetam profundamente a função branquial (Takashima e Hibiya, 1995). De forma geral, muitas dessas alterações são consideradas respostas de defesa.

Alterações patológicas do tecido branquial podem ocorrer num curto espaço de tempo e, até certo ponto, podem ser reversíveis (Rand e Petrocelli, 1976, Fernandes e

Mazon, 2003). A recuperação morfológica e fisiológica de tecidos lesados, pode ser possível quando a exposição ao poluente cessa, como foi observado em tecido branquial de *Prochilodus scrofa* (Cerqueira *et al*, 2002), e essa recuperação é de grande importância, já que este órgão tem papel fundamental na manutenção do equilíbrio osmótico e iônico, além da extração e eliminação de gases para manutenção da homeostasia.

Considerando as alterações que as brânquias podem sofrer após exposição a poluentes, elas passam a ser fonte indicadora da qualidade ambiental, bem como do nível de estresse em que o animal está sendo exposto ao entrar em contato com agentes tóxicos.

As alterações provocadas no epitélio branquial por agentes tóxicos, como o cobre, podem ser causadas:

1. diretamente pela ação tóxica do metal, como a inibição de enzimas transportadoras de íons, tal como a inibição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias via interação direta do cobre com a enzima (Verbost *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996); o aumento na permeabilidade à água e íons devido ao deslocamento do cálcio das junções intercelulares (Nieboer e Richardson, 1980; Laurén e McDonald, 1985); degeneração celular; e/ou
2. indiretamente, via estimulação de respostas integradas ao estresse, principalmente via liberação de cortisol (Bury *et al.*, 1998). Alguns desses efeitos estão esquematizados na Figura 1.

1.5 - Respostas ao estresse em peixes

Podemos definir estresse como sendo a condição na qual a homeostase do

organismo do animal é perturbada, seja por fatores internos e/ou externos (Wendelaar Bonga, 1997). As respostas ao estresse em peixes são complexas e envolvem uma série de alterações fisiológicas que habilitam o animal a resistir ao efeito dos estressores (Nolan *et al.*, 1999; Nolan, 2000). O aumento nas catecolaminas e no cortisol circulantes são as primeiras respostas (respostas primárias) de duas rotas principais: BSC (Cérebro – SNA – Células cromafins) e HPI (Hipotálamo-Pituitária-Interrenal), via cérebro. A liberação de catecolaminas indica a ativação do eixo BSC e resulta em rápida mobilização de fontes de energia e aumenta a tomada de oxigênio (Barton e Iwama, 1991). O cortisol é considerado como o hormônio de estresse em peixes teleósteos, cuja síntese e liberação é coordenada pelo eixo HPI (Hipotálamo-Pituitária-Interrenal) e mediado por ACTH, α -MSH e provavelmente β -endorfina (Wendelaar Bonga, 1997; Arends *et al.*, 1999). O cortisol é responsável por mudanças no tecido branquial (Dang *et al.*, 2000b; Mazon *et al.*, 2004), pele (Nolan, 2000), e tem efeitos no balanço osmótico e iônico (Wendelaar Bonga, 1997).

O cortisol promove processos essenciais para a manutenção da homeostasia (respostas secundárias) frente aos estressores, como a mobilização de energia, reajustes na concentração de íons e por meio do aumento do número de células cloreto nas brânquias (Goss *et al.*, 1992), do aumento nos níveis de enzimas transportadoras de íons (Flik e Perry, 1989), como a enzima Na^+/K^+ -ATPase (Bury *et al.*, 1998) e/ou na síntese de metalotionina como no caso de contaminação por metais pesados (Fu *et al.*, 1990; Barton e Iwama, 1991; Redding *et al.*, 1991; Olsson *et al.*, 1999; Dang, 2000a). Esses processos parecem sugerir um possível papel protetor do cortisol contra os efeitos tóxicos dos metais pesados, (incluindo o cobre) em peixes (Bury *et al.*, 1998, Mazon *et al.*, 2004) que, por sua vez, podem levar: 1) a adaptação, se o nível do agente estressor for baixo ou atuar durante um

curto período de tempo, ou 2) a não-adaptação do animal, se permanecer em níveis muito elevados durante um longo período de tempo ou então, causar a redução da fecundidade, predisposição à doenças, etc., e até mesmo a morte com conseqüente redução da população (Pickering, 1981).

Embora existam muitas informações sobre os níveis de cortisol em peixes de água doce submetidos ao estresse (Wendelaar Bonga, 1997), raros estudos examinaram as concentrações de cortisol e as respostas fisiológicas de peixes neotropicais submetidos ao estresse por metais pesados, como o cobre.

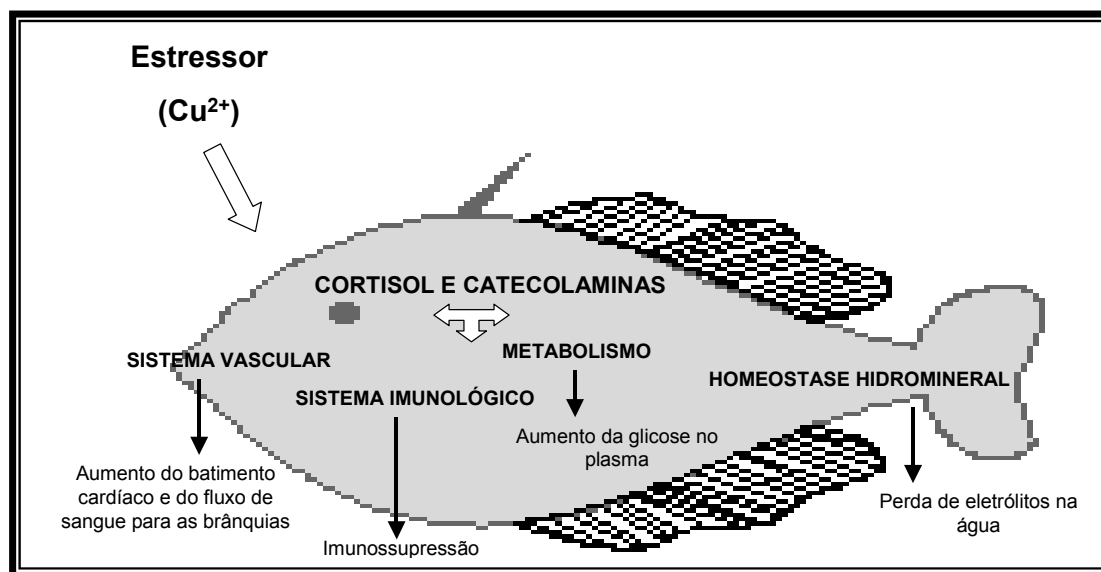


Figura 1 – Algumas alterações fisiológicas causadas por agentes estressores, (como o cobre, por exemplo), no organismo de peixes. Modificado de Hontela (1998).

1.6 - Espécie estudada

O curimatá, *Prochilodus scrofa*, espécie representativa da ictiofauna brasileira, é bastante sensível à presença de cobre no meio aquático (CL_{50} - 96 h = 29 $\mu\text{g.L}^{-1}$, Mazon e Fernandes, 1999).

A exposição aguda ao cobre induz a alterações histopatológicas nas brânquias como: proliferação celular (células pavimentosas e cloreto), hipertrofia e degeneração celular, deslocamento do epitélio das lamelas secundárias e aneurismas no sistema de células pilares (Mazon, 1997; Fernandes *et al.*, 1998; Mazon *et al.*, 1999; Mazon *et al.*, 2002) e alterações fisiológicas, como desequilíbrio iônico (redução nos níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- e aumento nos níveis de K^+) e ácido-base (Mazon, 1997) e aumento nas concentrações de glicose e lactato (Pinheiro *et al.*, 1999; Mazon, *et al.*, 2000).

2.0 – Objetivo

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do estresse ocasionado pela exposição ao cobre ($CL_{50-96h} = 29 \mu\text{gCu.L}^{-1}$, Mazon e Fernandes, 1999), e o período necessário para que a recuperação ocorra após a transferência dos animais para água sem a presença de cobre. Também foram avaliados os possíveis efeitos ocasionados pela manipulação dos animais durante os experimentos.

Para isso foram determinados, os seguintes parâmetros:

- a) pH sanguíneo e hematócrito;
- b) Concentrações plasmáticas de cortisol (indicador primário de estresse);
- c) Concentração de glicose plasmática, e íons plasmáticos tais como: Na^+ , K^+ e Cl^- (respostas fisiológicas secundárias);
- d) Atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase de tecido branquial nos animais aclimatados às condições de laboratório, nos grupos controle e em exposição ao cobre (24, 48, 72 e 96 horas) e na recuperação (1, 2, 7, 15 e 30 dias);
- e) Estresse causado pela manipulação na ausência do cobre através dos parâmetros acima mencionados.

3.0 - Materiais e métodos

Foram utilizados exemplares de *Prochilodus scrofa* (Wt = $40,0 \pm 1,25$ g) (Fig. 2), fornecidos pela Estação de Hidrobiologia e Piscicultura, Usina Furnas, Furnas, MG. Os animais foram transportados até laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparada, do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, e mantido em tanques de amianto de 1000L a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com fluxo contínuo de água (pH = $7,3 \pm 0,2$, condutividade = $8,3 \pm 0,3$ μS e dureza = $24,5 \pm 0,2$ mg L^{-1} como CaCO_3), aeração constante (100% de saturação de O_2) e alimentados com ração fornecida pela Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Furnas, durante 30 dias para aclimatação às condições do laboratório. O fotoperíodo foi controlado em 12 horas (12 dia:12 noite).

As características físicas e químicas da água utilizada nos experimentos, tais como: temperatura, pH, dureza e condutividade, foram semelhantes àquelas utilizadas na aclimatação.



Figura 2 – *Prochilodus scrofa*, Steindachner (1881). Escala em cm.

3.1 - Protocolo experimental

Após o período de aclimatação, animais ($n = 12$) foram coletados e amostras de sangue e brânquias foram obtidas para análise. Este grupo de peixes foi denominado de grupo aclimatado e não sofreu estresse de manipulação da transferência para os aquários experimentais, sendo amostrados diretamente do tanque de aclimatação. Os demais animais ($n = 450$) foram divididos

em dois grupos: grupo controle (C), que não foi exposto ao cobre e o grupo CU que foi exposto ao cobre ($CL_{50-96h} = 29 \mu\text{gCu.L}^{-1}$, Mazon e Fernandes, 1999) durante 96 horas. Ambos os grupos sofreram estresse de manipulação, ou seja, transferência para aquários de vidro. Os experimentos foram conduzidos em aquários de vidro (200 L) e, durante o período de exposição ao cobre, os animais não foram alimentados. Os aquários foram revestidos para que não houvesse contato visual dos animais com o meio externo durante o período experimental.

No período denominado de Período de Exposição foram montados 5 aquários para cada grupo (10 peixes em cada aquário) correspondendo cada aquário a um tempo de coleta: 24, 48, 72 e 96 horas (1, 2, 3 e 4 dias) para evitar o estresse de amostragem (Figura 3). Foi montado também um aquário controle e outro com cobre, nos quais os animais foram mantidos durante 96 horas. Após esse período, os animais do grupo controle e os animais sobreviventes à exposição ao cobre foram utilizados para a próxima etapa do experimento denominada de Período de Recuperação (30 dias).

Dos aquários destinados para a recuperação, tanto os animais do grupo controle quanto os do grupo exposto ao cobre foram manipulados novamente para serem transferidos, após as 96 horas, para tanques com água sem cobre, com fluxo contínuo de água e alimentação, semelhante às condições de aclimação, já descritas, para recuperação (Figura 4). Todos os experimentos foram efetuados com repetição.

As amostras foram constituídas por 6 animais dos quais foram coletados sangue e tecidos, sempre no mesmo horário (entre 9:00 h e 10:00 h), pois a secreção de cortisol em peixes, assim como em mamíferos, segue o ritmo circadiano (Wendelaar Bonga, 1997).

Das amostras de sangue total foram imediatamente medidos o pH e o hematócrito, e logo após, estas foram centrifugadas para a obtenção do plasma para análise de cortisol, glicose e íons. Para colheita de amostras de tecido branquial, os animais foram anestesiados com benzocaína 0,1% (Sigma, St Louis, USA) e as brânquias foram extraídas para determinação da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase.

EXPOSIÇÃO (96 horas)

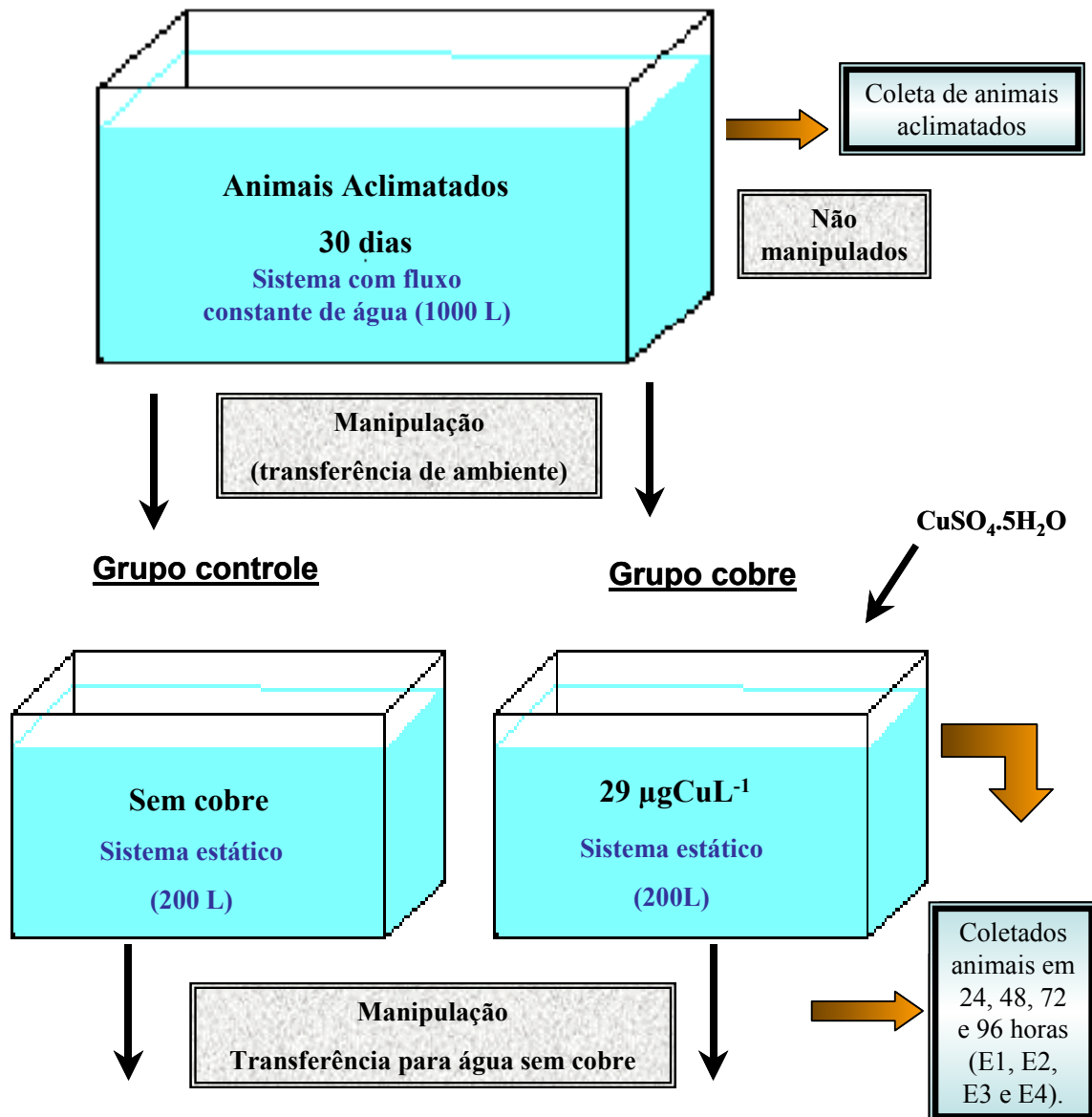


Figura 3 - Esquema do protocolo experimental utilizado no período de exposição em 24, 48, 72 e 96 horas para análise das alterações provocadas em *Prochilodus scrofa* pelo estresse induzido pelo cobre ($29 \mu\text{gCu.L}^{-1}$) e pela manipulação nas transferências para novos ambientes. Dos animais coletados foram obtidos sangue e brânquias para análise.

RECUPERAÇÃO (30 dias)

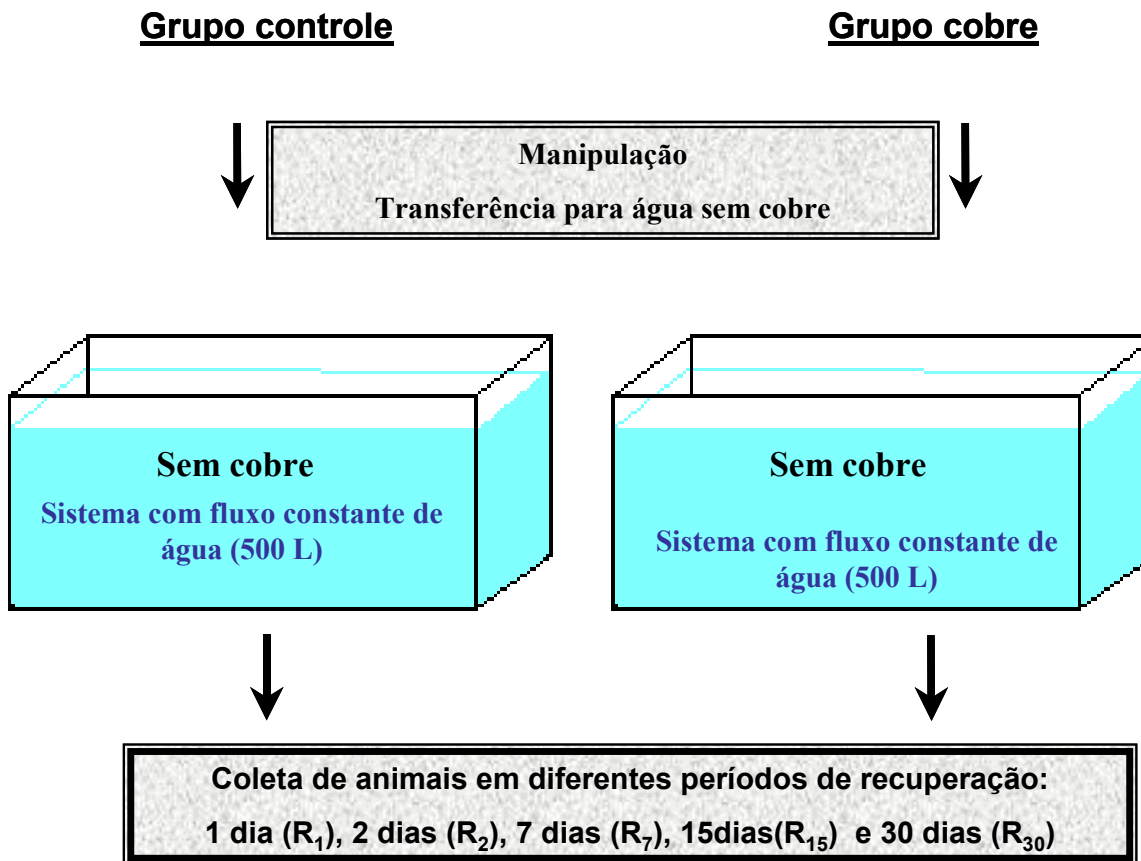


Figura 4 - Esquema do protocolo experimental utilizado no período de recuperação em 1, 2, 7, 15 e 30 dias para avaliar a recuperação das alterações provocadas em *Prochilodus scrofa* pelo estresse induzido pelo cobre e pela manipulação nas transferências para novos ambientes após o período de exposição (96 horas). Dos animais coletados foram obtidos sangue e brânquias para análise.

3.2 - Análises do sangue e do tecido branquial

3.2.1 - Análise em sangue total

Imediatamente após a coleta, o pH do sangue foi mensurado em pHmetro QUIMIS, uma alíquota foi utilizada para a determinação do hematócrito. O hematócrito foi feito em um tubo capilar heparinizado de 75mm, selado em uma das extremidades e centrifugado por 5 minutos a

12000 g em uma centrífuga de microhematócrito FANEM, mod. 207/N. Um cartão padronizado foi utilizado para se estimar a porcentagem das partes sólida (eritrócitos e leucócitos) e líquida (plasma).

O sangue remanescente foi centrifugado em centrífuga refrigerada HERMLE Z 323 K a 6.000 g por 5 minutos a 5 °C, para obtenção do plasma.

3.2.2 - Análise do plasma

O plasma foi dividido em alíquotas, congelado e mantido a -80°C para posterior análise das concentrações de glicose, cortisol, Na⁺, K⁺ e Cl⁻.

3.2.2.1 - Análise da glicose no plasma

A glicose plasmática foi analisada pelo método da glicose-oxidase, utilizando Kit. Labtest nº 34 (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais, Brasil). O método consiste na oxidação da glicose com formação de peróxido de hidrogênio e posterior de antipirilquinonimina, cuja cor avermelhada é proporcional à concentração de glicose da amostra. A leitura da absorbância, em 490 nm, foi realizada em um leitor de microplacas Microplate Reader MRX – Dynex;

3.2.2.2 - Análise dos íons plasmáticos

As concentrações dos íons Na⁺ e K⁺ plasmáticos foram determinadas em um espectrofotômetro de chama ZEISS, mod. M4Q2, após diluição apropriada (1:100).

A concentração plasmática de íons Cl⁻ foi determinada utilizando-se o kit Sigma nº 461-3 com leitura em 460 nm em um leitor de microplacas, Microplate Reader MRX – Dinex.

3.2.2.3 -Análise do cortisol plasmático

A concentração plasmática de cortisol foi determinada pelo método ELISA, utilizando-se para isso o Kit CORTISOL ELISA DSL-10-2000 ACTIVE (Diagnostic Systems Laboratories,

Inc., USA). O procedimento segue o princípio do imunoenensaio enzimático, onde existe a competição entre um antígeno não marcado e um antígeno marcado com enzima por um número fixo de sítios de ligação no anticorpo. A quantidade de antígeno marcado com a enzima ligada ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração da substância sendo analisada não marcada presente na amostra. O material não ligado foi removido por decantação e lavagem dos poços da microplaca. A leitura foi feita em 450 nm em um leitor de microplacas, Microplate Reader MRX - Dynex.

3.2.3 – Análise da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase no tecido branquial

A atividade da Na^+/K^+ -ATPase foi determinada pelo método descrito por Quabius (1997) e adaptado para leitura em microplaca (Nolan, 2000).

Neste ensaio o tecido branquial foi homogeneizado em tampão SI (Sacarose 300mM; Imidazol 30mM; pH 7,4) e centrifugado em centrífuga refrigerada HERMLE Z 323 K a 10.000g por 5 minutos a 5°C. O sobrenadante foi separado e a quantidade de proteína foi determinada pelo método descrito por Lowry (1951). Ao sobrenadante foi adicionada saponina 0,2mg/mL para otimizar a acessibilidade ao substrato.

O sobrenadante de cada amostra foi pipetado em seis poços de uma microplaca, sendo que cada amostra apresentava aproximadamente $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de proteína conforme o protocolo original. Em cada poço foi adicionado 100 μL da mistura de reação contendo NaCl; MgCl_2 ; Na_2EDTA ; Imidazol e Na_2ATP (Sigma A-5394) em pH 7,4. Nos três primeiros poços (tréplica) foi adicionado KCl (meio A) e nos três últimos, foi adicionado ouabaína (Sigma O - 3125) (meio B). As concentrações de cada reagente utilizado neste ensaio para as brânquias de *P. scrofa* foram otimizadas em testes preliminares (ver item 3.2.3.1). A placa de reação foi a incubada a 25°C, no escuro.

A reação foi interrompida adicionando-se 200 μL de uma mistura 1:1 de TCA 8,6% (Ácido Tricloro Acético) e reagente de cor (0,66 mM H_2SO_4 + 9,2 mM de molibdato de amônia + 0,33

mM FeSO₄ · 7 H₂O), e a leitura foi realizada em um leitor de microplacas (MRX – Dynex) em 595 nm (Declan, 2000). A quantidade de Pi foi estimada nos meios que continham KCl e nos meios que continham ouabaína. A diferença entre os meios A e B indicam a atividade dessa enzima, sendo expressa em $\mu\text{M Pi} \cdot \text{mg proteína} \cdot \text{hr}^{-1}$.

3.2.3.1 -Caracterização cinética da atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase em *Prochilodus scrofa*

Para otimização da atividade de Na⁺/K⁺-ATPase em *P. scrofa*, das condições descritas anteriormente foram ensaiados cada um dos fatores cinéticos.

Foram ensaiadas as diferentes concentrações de NaCl (10, 25, 50, 100, 200, 250 e 300mM); MgCl₂ (3, 5, 8, 16, 24, 48 e 60mM); Na₂ATP (1, 2, 3, 5 e 10mM), KCl (5, 9, 13, 18, 25, 50, 70 e 80mM) e ouabaína (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3mM), bem como o tempo de incubação das amostras (10, 20, 30, 45 e 60 minutos) para reação da enzima com o substrato. As concentrações de proteína do sobrenadante também foram ensaiadas variando concentrações de 2 a 10 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. O pH dos meios utilizados foi mantido em 7,4 conforme o protocolo original

As condições ótimas determinadas nestes ensaios foram utilizadas para quantificar a ATPase de *Prochilodus scrofa*, em função da exposição ao metal Cu²⁺ e a sua recuperação.

3.2.3.2. Análise de Proteínas do tecido branquial

A concentração das proteínas totais do tecido branquial foi determinada usando-se o método descrito por método de Lowry (1951), utilizando como padrão protéico a albumina sérica bovina. As concentrações foram determinadas em um espectrofotômetro SPECTRONIC GENESYS 5 na absorvância de 660 nm.

3.3 - Análise estatística

Os dados obtidos estão apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) e a análise estatística foi efetuada utilizando-se o programa INSTAT versão 3.0 para Windows.

O teste específico para análise dos dados foi determinado levando-se em consideração o coeficiente de variância (CV) que corresponde ao Desvio Padrão dividido pela Média multiplicado por 100. Para valores de CV $< 20\%$ foi aplicado um teste paramétrico e para valores de CV $> 20\%$ foi aplicado um teste não paramétrico.

Baseado neste critério, o teste paramétrico foi utilizado na análise estatística dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- , e do pH, já o teste não paramétrico foi utilizado na análise da glicose, do cortisol e da enzima Na^+/K^+ -ATPase.

Foram comparados os grupos expostos e não expostos ao cobre individualmente (por exemplo: controle E_1 x contaminado E_1 ; controle E_2 x contaminado E_2 ; controle R_1 x contaminado R_1 e assim por diante) utilizando-se o teste paramétrico denominado teste “t” não pareado e o teste não paramétrico de Mann-Whitney, conforme o critério descrito anteriormente.

O grupo de animais aclimatados foi comparado com os grupos dos animais expostos e não expostos ao cobre, utilizando-se para isso a ANOVA One-way (paramétrico) com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer ou o teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico) com pós-teste de múltiplas comparações de Dunn, baseado no coeficiente de variância (CV).

Para os testes realizados, foram considerados como sendo significativos os valores de $p < 0,05$.

4.0 – Resultados:

Nenhuma morte foi observada nos animais do grupo controle (C) durante o período experimental, já no grupo exposto ao cobre (CU), aproximadamente 35% dos animais morreram durante as primeiras 24 horas de exposição e 10% durante as 24 horas posteriores (segundo dia de exposição). Nenhum animal morreu durante o período de recuperação, tanto aqueles do grupo controle quanto os que foram expostos ao cobre.

Foi observado, porém não quantificado, um aumento na frequência respiratória dos animais do grupo CU, bem como uma mudança do comportamento desses animais, que passavam a nadar na superfície da água, principalmente após as primeiras 12 horas de exposição. Embora não quantificado observou-se um aumento na produção de muco nos animais expostos ao cobre, porém nenhuma dessas alterações foram observadas durante o período de recuperação.

4.1 - Cortisol Plasmático

Os valores médios da concentração de cortisol expressos em ng.mL^{-1} no plasma de *P.scrofa* e suas respectivas porcentagens estão dispostos na Tabela 1 e Figura 5, respectivamente. Durante todo o período de exposição, os valores da concentração de cortisol do grupo controle (C) mostraram um aumento significativo ($p < 0,05$), de aproximadamente 300%, em relação aos animais aclimatados ($100\% = 43,26 \pm 5,76 \text{ ng.mL}^{-1}$) nos dias 1, 2 e 3 (24, 48 e 72 horas) e aproximadamente 200% no 4º dia (96h) do período de exposição. Os animais do grupo exposto ao cobre (CU) apresentaram aumentos de até 400% em 48 horas (2 dias) de exposição. Durante o período de recuperação, a concentração de cortisol de ambos os grupos retornou ao valor semelhante àquele do grupo de animais aclimatados.

Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle (C) e o grupo exposto ao cobre (CU), embora em 2 dias de exposição, o aumento nas concentrações de cortisol chegou a 32% em relação ao grupo controle deste mesmo período.

Durante o período de recuperação, a concentração de cortisol do grupo CU foi significativamente maior em relação ao grupo controle no primeiro dia e no último dia do experimento. Nos demais dias (2, 7 e 15 dias) não houve diferenças significativas nos valores de cortisol plasmático entre o grupo C, CU e aclimatado.

4.2 - Glicose Plasmática

As concentrações plasmáticas de glicose expressas em mg.dL^{-1} estão apresentadas na Tabela 2 e Figura 6. As concentrações plasmáticas de glicose do grupo exposto ao cobre apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos animais aclimatados ($100\% = 19,54 \pm 2,31 \text{ mg.dL}^{-1}$) e grupo controle. No primeiro dia (24h) de exposição ao cobre houve um aumento de 900%, nos dias que se seguiram houve uma tendência de queda que se manteve até o final do 4º dia (96h) no qual foi determinada uma elevação de 300% em relação àquela do grupo de animais aclimatados. No primeiro dia de recuperação, os valores da concentração de glicose do grupo exposto ao cobre foram ainda significativamente maiores que aqueles determinados nos animais do grupo aclimatado ao laboratório e ao grupo controle. No 7º e 15º dia do período de recuperação, houve uma queda na concentração plasmática de glicose em relação aos controles dos respectivos períodos.

A concentração de glicose plasmática dos animais do grupo controle não foi alterada durante o período de exposição, em relação aos animais do grupo aclimatado, porém mostrou um aumento significativo no primeiro e no segundo dia do período de recuperação (Tabela 2 e Figura 6).

Tabela 1 – Valores médios \pm SEM (n = 6) das concentrações plasmáticas de cortisol em *P. scrofa* do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante o período de exposição de 96h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) e posterior período de recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀). * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle no respectivo tempo.

| PERÍODO EXPERIMENTAL | CONTROLE (grupo C) (ng.mL ⁻¹) | COBRE (grupo CU) (ng.mL ⁻¹) |
|----------------------|--|--|
| E ₁ | 127,29 \pm 11,10 | 138,34 \pm 5,02 |
| E ₂ | 125,40 \pm 8,36 | 177,23 \pm 25,10 |
| E ₃ | 132,08 \pm 8,02 | 131,85 \pm 12,73 |
| E ₄ | 89,65 \pm 12,18 | 102,69 \pm 13,44 |
| R ₁ | 39,46 \pm 4,52 | 98,56 \pm 10,01* |
| R ₂ | 44,46 \pm 5,24 | 46,35 \pm 7,65 |
| R ₇ | 69,05 \pm 7,77 | 58,31 \pm 8,35 |
| R ₁₅ | 50,54 \pm 9,78 | 44,06 \pm 6,25 |
| R ₃₀ | 35,90 \pm 5,23 | 62,40 \pm 2,25* |
| Aclimatado | 43,26 \pm 5,76 | |

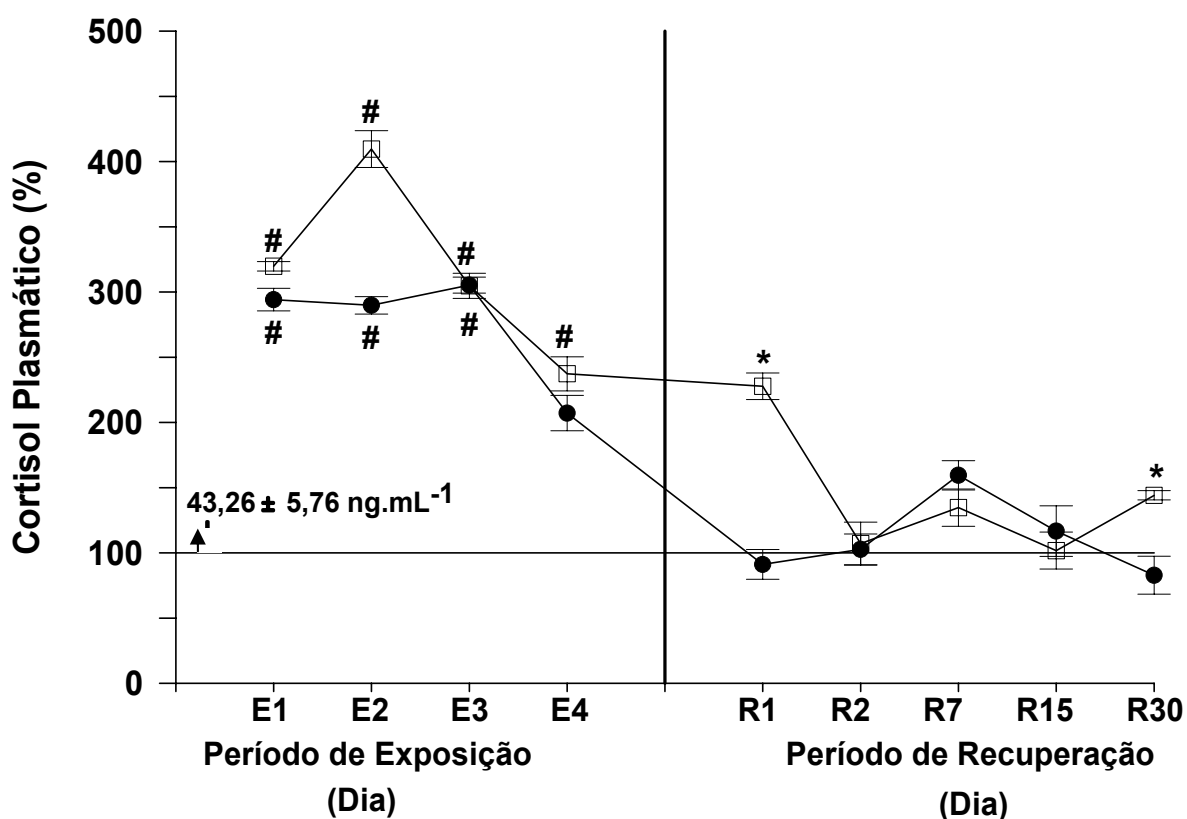


Figura 5 – Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) das concentrações plasmáticas de cortisol em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre. O símbolo # indica diferença estatística significativa em relação aos animais aclimatados ($p < 0,05$); * indica diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

4.3 - Íons Plasmáticos

Os animais do grupo controle (3 dias do período de exposição – E₁, E₂ e E₃) e os que foram expostos ao cobre (1º dia de exposição – E₁) apresentaram aumentos significativos nas concentrações de Na⁺ plasmático em relação ao grupo de animais aclimatados (100% = 127,71 ± 1,58 mEq.L⁻¹) (Tabela 3, Figura 7). No 4º dia e durante o período de recuperação, os valores da concentração de Na⁺ foram semelhantes àqueles apresentados pelo grupo de animais aclimatados, com exceção do 30º dia de recuperação no qual houve uma queda significativa na concentração de Na⁺ plasmático nos animais do grupo que foi exposto ao cobre.

Comparando-se os grupos C e CU, observou-se que a redução na concentração de Na⁺ plasmático não foi significativa nas primeiras 24 horas (1 dia) de exposição. (1 dia). Nos dias seguintes, houve uma tendência à diminuição da concentração de Na⁺ plasmático em relação aos valores apresentados pelo grupo controle, sendo que esta foi significativa no 4º dia (96h) de exposição.

Durante o período de recuperação, a concentração plasmática de íons Na⁺ no grupo CU ainda se manteve significativamente menor que a do grupo controle, porém a partir do segundo dia de recuperação, os valores da concentração plasmática de Na⁺ foram semelhantes àqueles do grupo controle e do grupo dos animais aclimatados (Tabela 3, Figura 7).

A Figura 8 e a Tabela 4 mostram as variações nas concentrações plasmáticas do íon cloreto (Cl⁻). Não houve diferença significativa nas concentrações plasmáticas de íons Cl⁻ nos animais do grupo controle e exposto ao cobre em relação aos animais aclimatados (100% = 136,06 ± 3,71 mEq.L⁻¹), com exceção da concentração do íon Cl⁻ que foi significativamente mais alto no 3º dia do período de exposição. Durante o período de recuperação, as variações nas concentrações plasmáticas de íons Cl⁻ não

Tabela 2 – Valores médios \pm SEM (n = 6) da concentração plasmática de glicose em *P. scrofa* do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀). * indica diferença estatística significativa (p<0,05) em relação ao controle no respectivo tempo.

| PERÍODO EXPERIMENTAL | CONTROLE (grupo C) (mg.dL ⁻¹) | COBRE (grupo CU) (mg.dL ⁻¹) |
|----------------------|--|--|
| E ₁ | 26,96 \pm 3,53 | 171,66 \pm 12,64* |
| E ₂ | 17,67 \pm 1,72 | 119,71 \pm 15,10* |
| E ₃ | 16,03 \pm 2,90 | 69,09 \pm 7,58* |
| E ₄ | 28,35 \pm 3,55 | 65,36 \pm 5,81* |
| R ₁ | 50,42 \pm 3,74 | 87,78 \pm 10,54* |
| R ₂ | 41,25 \pm 3,40 | 44,83 \pm 5,25 |
| R ₇ | 35,79 \pm 4,72 | 20,61 \pm 2,04* |
| R ₁₅ | 24,94 \pm 2,28 | 16,70 \pm 2,16* |
| R ₃₀ | 8,75 \pm 1,38 | 11,61 \pm 0,96 |
| Aclimatado | 19,54 \pm 2,31 | |

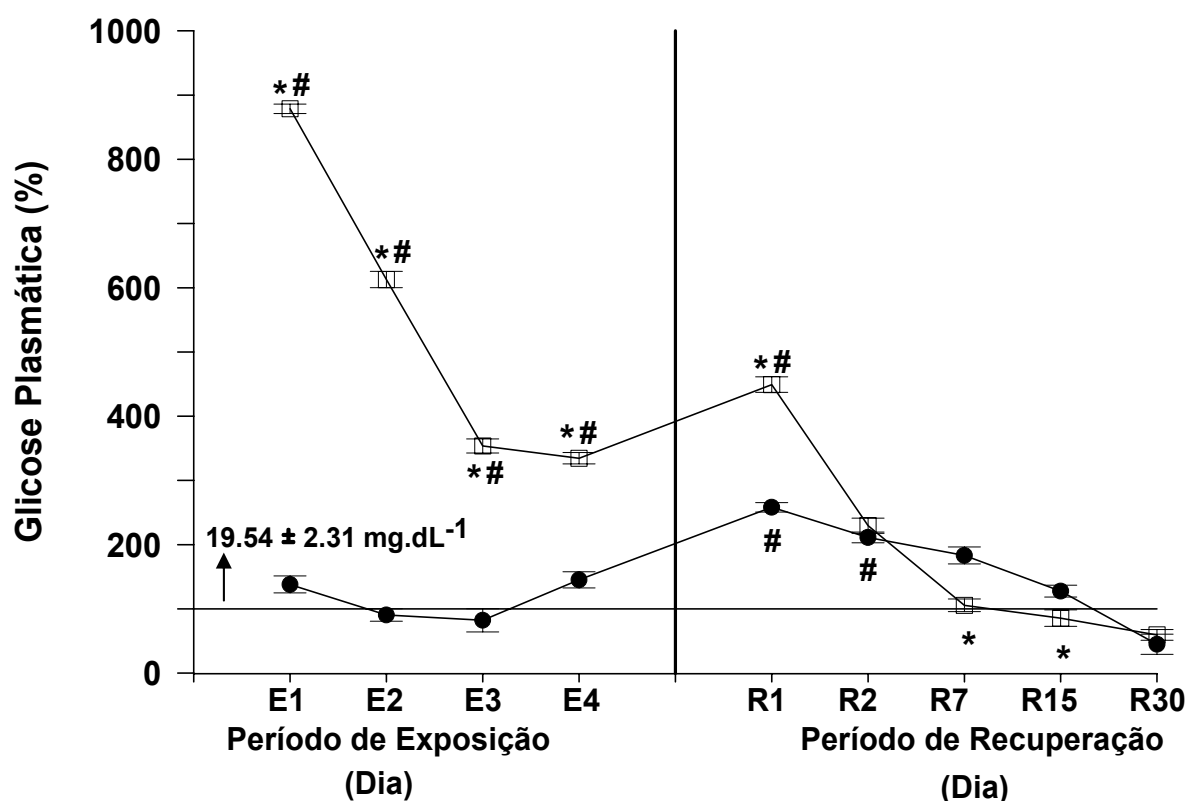


Figura 6 – Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) da concentração plasmática de glicose em *P. scrofa* durante a exposição 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100%). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre. O símbolo # indica diferença estatística significativa em relação aos animais aclimatados (p<0,05); * indica diferença estatística significativa em relação ao controle (p<0,05).

foram maiores do que 10% em relação aos animais do grupo aclimatado (não significativas).

Alterações significativas nas concentração de íons Cl^- foram observadas apenas 4^o dia de exposição ao cobre e 1^o e 15^o dia do período de recuperação, enquanto nos demais períodos, assim como para o íon Na^+ , as alterações não foram significativas.

Embora tenha havido variações tanto nos valores de Na^+ quanto de Cl^- , quando a razão Na:Cl (Figura 9, Tabela 4) foi analisada não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle, exposto ao cobre e aclimatados ($100\% = 0,98 \pm 0,03$).

Durante o período de exposição os valores da concentração plasmática de K^+ nos animais dos grupos C e CU variaram em torno de 10% em relação ao grupo de animais aclimatados ($100\% = 4,33 \pm 0,19 \text{ mEq.L}^{-1}$), variações estas que não foram consideradas significativas (Tabela 6). Entretanto, durante o período de recuperação observou-se que a concentração plasmática de K^+ no grupo de animais que foi exposto ao cobre diminuiu significativamente, ($p < 0,05$) no 30^o dia de recuperação.

Comparando-se as concentrações plasmáticas de íons K^+ em *P. scrofa* do grupo controle e do grupo exposto ao cobre observou-se a mesma tendência apresentada pelo íon cloreto, um sutil aumento de 4% em relação ao controle nas primeiras 24 horas de exposição ao metal e uma tendência à queda nos tempos seguintes, chegando a 8% em 72 horas de exposição (Figura 10). Essa diminuição foi estatisticamente significativa ao final das 96 horas (4 dias) do período de exposição.

Durante o período de recuperação os valores da concentração de K^+ plasmático do grupo exposto ao cobre mantiveram-se abaixo daqueles obtidos no grupo controle até o sétimo dia de recuperação, sendo significativa ($p < 0,05$) somente no primeiro dia (Tabela 6, figura 10). No décimo quinto dia foi registrado um aumento significativo nos

valores de potássio em relação ao grupo controle e, no trigésimo dia, os valores foram significativamente menores.

Tabela 3 – Valores médios \pm SEM (n = 6) das concentrações plasmáticas de íons Na^+ em *P. scrofa* do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante o período de exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E_1 , E_2 , E_3 e E_4 , respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R_1 , R_2 , R_7 , R_{15} e R_{30}). * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle no respectivo tempo.

| PERÍODO EXPERIMENTAL | CONTROLE (grupo C) (mEq.L⁻¹) | COBRE (grupo CU) (mEq.L⁻¹) |
|---------------------------------|--|--|
| E_1 | 155,00 \pm 10,16 | 152,16 \pm 11,14 |
| E_2 | 145,00 \pm 4,55 | 137,83 \pm 7,69 |
| E_3 | 157,66 \pm 7,47 | 143,00 \pm 10,18 |
| E_4 | 138,50 \pm 2,89 | 126,73 \pm 5,06* |
| R_1 | 133,53 \pm 2,82 | 121,00 \pm 2,26* |
| R_2 | 130,46 \pm 2,01 | 125,83 \pm 1,18 |
| R_7 | 129,22 \pm 2,74 | 126,62 \pm 1,91 |
| R_{15} | 127,83 \pm 1,91 | 134,33 \pm 2,63 |
| R_{30} | 111,33 \pm 5,91 | 99,28 \pm 3,84 |
| Aclimatado | 127,71 \pm 1,58 | |

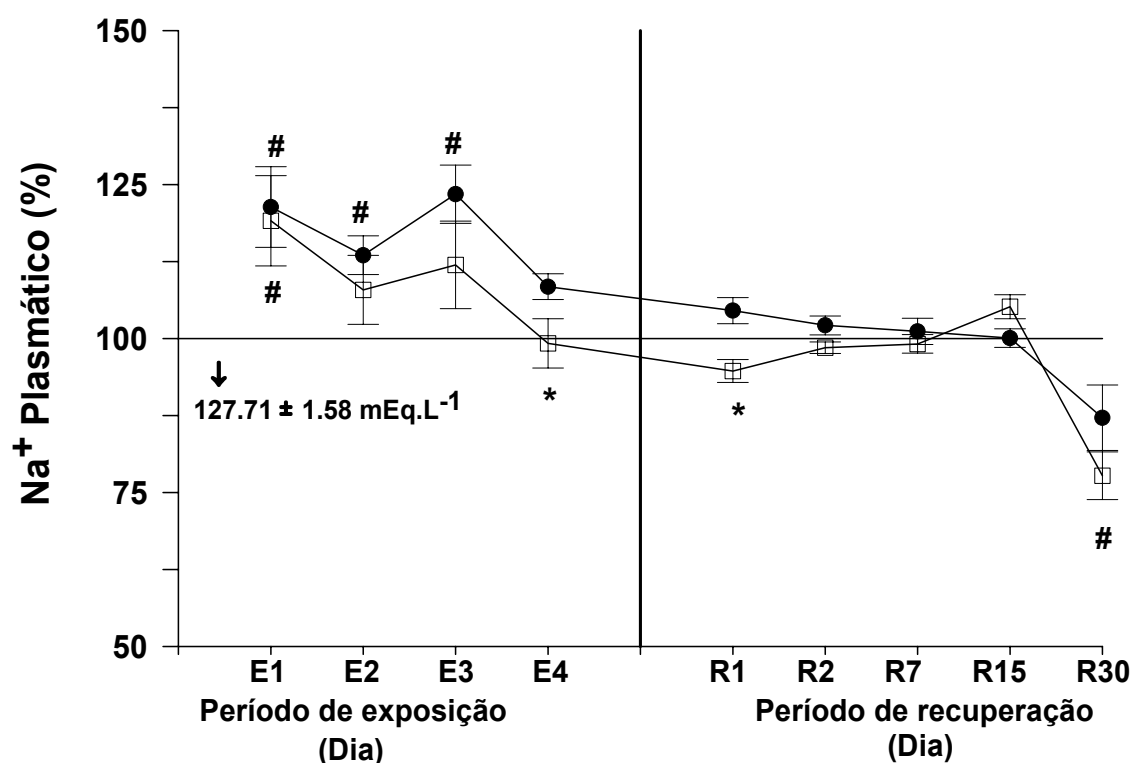


Figura 7 – Porcentagens dos valores médios \pm SEM (n = 6) das concentrações plasmáticas de Na^+ (mEq.L⁻¹) em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E_1 , E_2 , E_3 e E_4 , respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R_1 , R_2 , R_7 , R_{15} e R_{30}) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre. O símbolo # indica diferença estatística significativa em relação aos animais aclimatados ($p < 0,05$); * indica diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Valores médios \pm SEM ($n = 6$) das concentrações plasmáticas de íons Cl^- em *P. scrofa* do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E_1 , E_2 , E_3 e E_4 , respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R_1 , R_2 , R_7 , R_{15} e R_{30}). * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle no respectivo tempo.

| PERÍODO EXPERIMENTAL | CONTROLE (grupo C) (mEq.L⁻¹) | COBRE (grupo CU) (mEq.L⁻¹) |
|---------------------------------|--|--|
| E₁ | 129,86 \pm 7,72 | 150,85 \pm 6,39 |
| E₂ | 146,80 \pm 4,21 | 140,25 \pm 6,80 |
| E₃ | 170,90 \pm 9,08 | 158,48 \pm 4,34 |
| E₄ | 135,60 \pm 5,54 | 117,16 \pm 5,84* |
| R₁ | 156,10 \pm 4,10 | 139,94 \pm 4,22* |
| R₂ | 145,71 \pm 6,31 | 131,90 \pm 8,04 |
| R₇ | 122,56 \pm 8,89 | 135,25 \pm 6,99 |
| R₁₅ | 146,03 \pm 5,62 | 126,58 \pm 5,46* |
| R₃₀ | 147,61 \pm 8,21 | 142,47 \pm 7,52 |
| Aclimatado | 136,06 \pm 3,71 | |

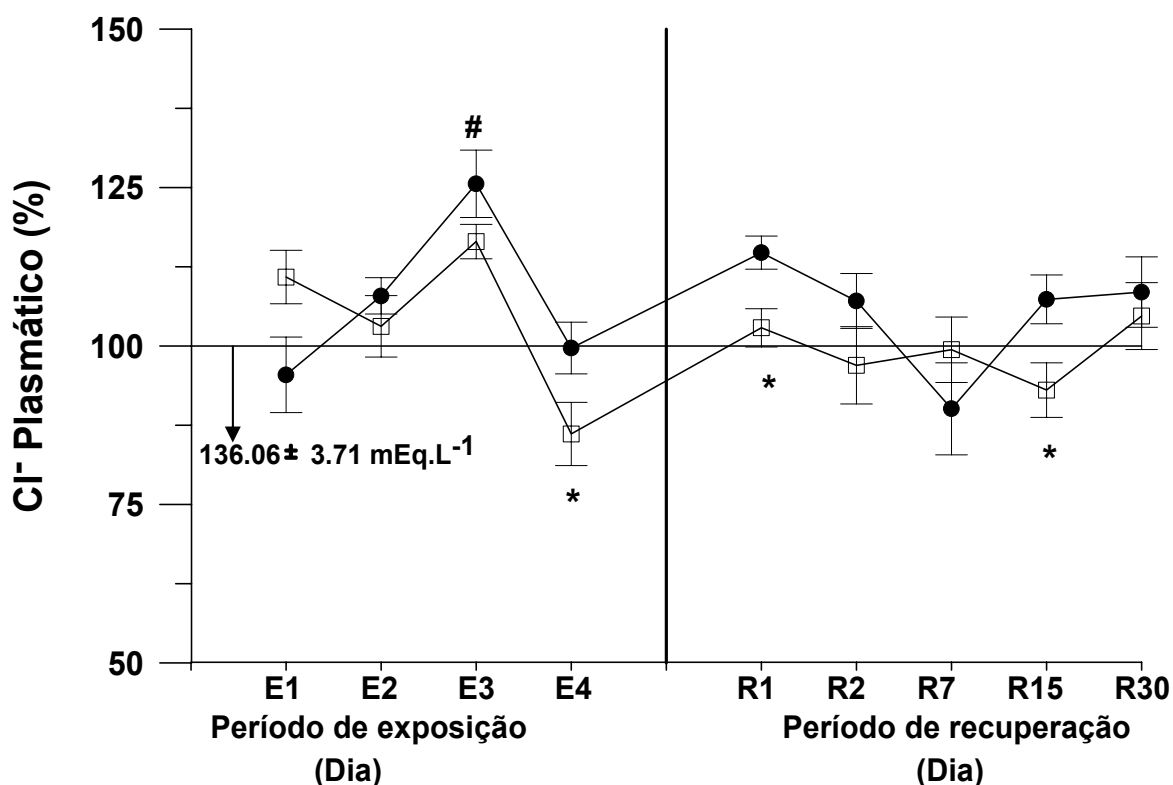


Figura 8 – Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) das concentrações plasmáticas de Cl^- em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E_1 , E_2 , E_3 e E_4 , respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R_1 , R_2 , R_7 , R_{15} e R_{30}) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre. O símbolo # indica diferença estatística significativa em relação aos animais aclimatados ($p < 0,05$); * indica diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Valores médios \pm SEM (n = 6) da razão Na:Cl em *P. scrofa* do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀). * indica diferença estatística significativa (p<0,05) em relação ao controle no respectivo tempo.

| PERÍODO EXPERIMENTAL | CONTROLE (grupo C) | COBRE (grupo CU) |
|-----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| E ₁ | 1,21 \pm 0,10 | 1,01 \pm 0,08 |
| E ₂ | 0,99 \pm 0,03 | 0,98 \pm 0,05 |
| E ₃ | 0,93 \pm 0,06 | 0,90 \pm 0,05 |
| E ₄ | 1,04 \pm 0,04 | 1,15 \pm 0,05 |
| R ₁ | 0,91 \pm 0,04 | 0,95 \pm 0,06 |
| R ₂ | 0,96 \pm 0,05 | 1,13 \pm 0,09 |
| R ₇ | 1,13 \pm 0,08 | 0,99 \pm 0,06 |
| R ₁₅ | 0,93 \pm 0,04 | 1,07 \pm 0,05 |
| R ₃₀ | 0,83 \pm 0,06 | 0,82 \pm 0,07 |
| Aclimatado | 0,98 \pm 0,03 | |

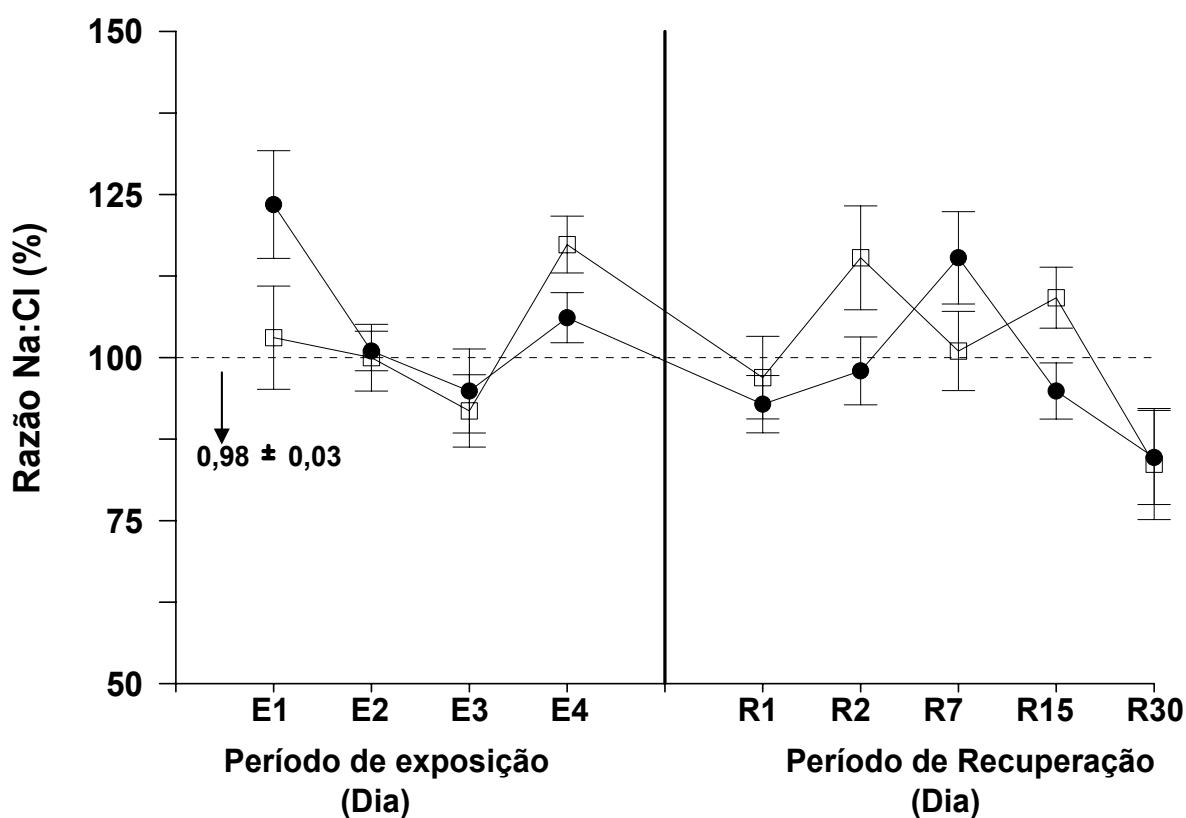


Figura 9 – Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) da razão Na:Cl em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre. O símbolo # indica diferença estatística significativa em relação aos animais aclimatados (p<0,05); * indica diferença estatística significativa em relação ao controle (p<0,05).

Tabela 6 – Valores médios \pm SEM (n = 6) das concentrações plasmáticas de potássio em *P. scrofa* do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀). * indica diferença estatística significativa (p<0,05) em relação ao controle no respectivo tempo.

| PERÍODO EXPERIMENTAL | CONTROLE (grupo C) (mEq.L⁻¹) | COBRE (grupo CU) (mEq.L⁻¹) |
|-----------------------------|--|--|
| E ₁ | 4,96 \pm 0,27 | 5,15 \pm 0,23 |
| E ₂ | 5,21 \pm 0,18 | 4,9 \pm 0,20 |
| E ₃ | 4,76 \pm 0,24 | 4,36 \pm 0,22 |
| E ₄ | 5,05 \pm 0,18 | 4,39 \pm 0,23* |
| R ₁ | 5,14 \pm 0,25 | 4,30 \pm 0,23* |
| R ₂ | 4,99 \pm 0,24 | 4,47 \pm 0,16 |
| R ₇ | 5,20 \pm 0,28 | 4,94 \pm 0,14 |
| R ₁₅ | 4,50 \pm 0,25 | 5,28 \pm 0,24* |
| R ₃₀ | 4,20 \pm 0,22 | 3,60 \pm 0,16* |
| Aclimatado | 4,68 \pm 0,17 | |

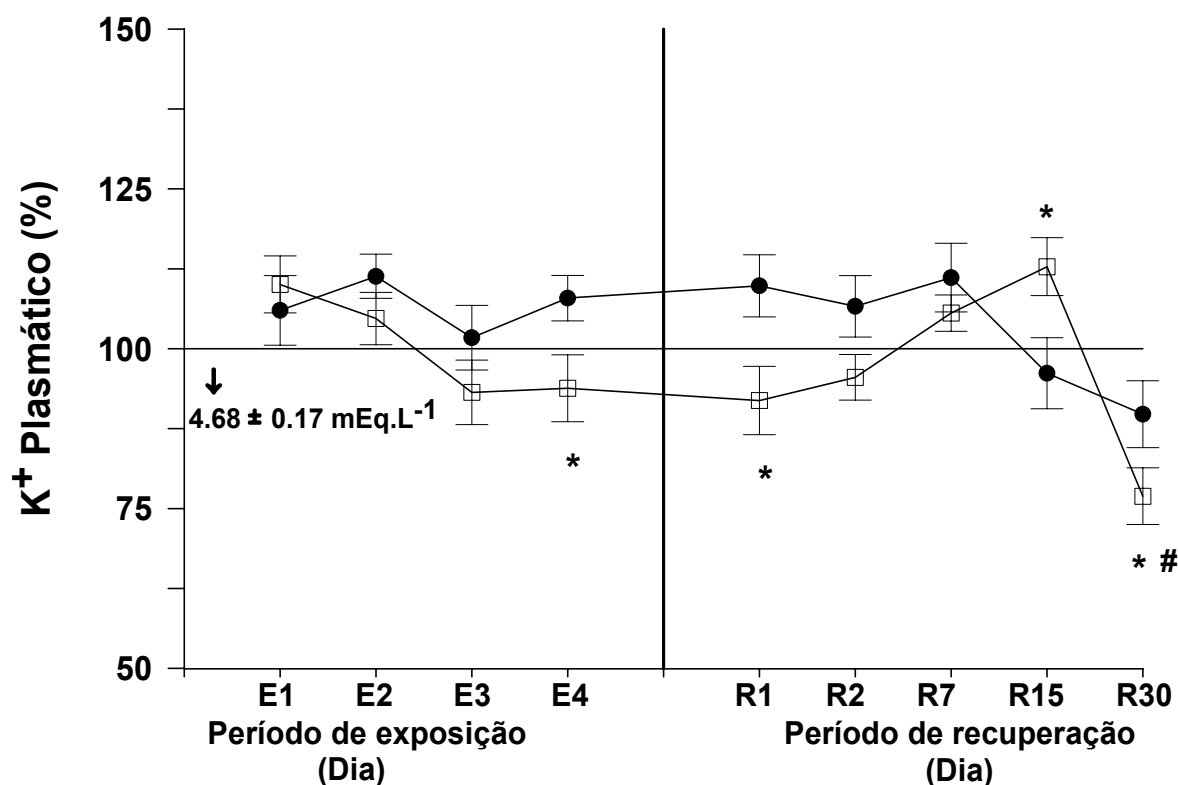


Figura 10 – Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) das concentrações plasmáticas de K⁺ em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100%). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre. O símbolo # indica diferença estatística significativa em relação aos animais aclimatados (p<0,05); * indica diferença estatística significativa em relação ao controle (p<0,05).

4.4 - pH sanguíneo

A tabela 7 e a Figura 11 expressam, respectivamente os valores médios (\pm SEM) e a % em relação aos animais aclimatados das variações de pH sanguíneo em *P. scrofa* nos períodos de exposição ao cobre e posterior recuperação.

No período de exposição, os valores de pH sanguíneo dos animais permaneceram abaixo daqueles apresentados pelo grupo de animais aclimatados ($100\% = 7,96 \pm 0,032$), porém somente os valores de pH do grupo controle em 24 e 96 horas se mostraram significativos. Durante o período de recuperação observou-se a mesma tendência até o segundo dia de recuperação ($p < 0,05$).

Comparando-se os valores de pH sanguíneo, no período de exposição, dos animais do grupo controle e exposto ao cobre (período de exposição) observou-se que o pH sanguíneo dos animais expostos ao cobre foi maior do que os valores dos animais do grupo controle, embora não significativo ($p \geq 0,05$).

Durante o período de recuperação (R_1 e R_2) os valores de pH dos grupos experimentais, controle e exposto ao cobre, foram significativamente menores ($p < 0,05$) quando comparados aos valores dos animais aclimatados. Nos demais períodos observou-se uma tendência à estabilidade.

4.5 - Hematócrito

Os valores de hematócrito de *P. scrofa* do grupo controle não mostraram diferenças significativas em relação aos animais do grupo aclimatado ($100\% = 39 \pm 0,86\%$) (Tabela 8, Figura 12). Entretanto, o hematócrito foi significativamente maior ($p < 0,05$) no 2º e 4º dias nos animais do grupo exposto ao cobre e 1º dia de recuperação (Tabela 8, figura 12). No décimo quinto e trigésimo dia do período de recuperação,

Tabela 7 – Valores médios \pm SEM ($n = 6$) do pH sanguíneo em *P. scrofa* do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E_1 , E_2 , E_3 e E_4 , respectivamente) e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R_1 , R_2 , R_7 , R_{15} e R_{30}). * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle no respectivo tempo.

| PERÍODO EXPERIMENTAL | CONTROLE (grupo C) | COBRE (grupo CU) |
|---------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| E₁ | 7,52 \pm 0,05 | 7,64 \pm 0,05 |
| E₂ | 7,65 \pm 0,04 | 7,82 \pm 0,04 |
| E₃ | 7,75 \pm 0,03 | 7,81 \pm 0,02 |
| E₄ | 7,34 \pm 0,03 | 7,58 \pm 0,02 |
| R₁ | 7,30 \pm 0,02 | 7,44 \pm 0,03* |
| R₂ | 7,64 \pm 0,10 | 7,65 \pm 0,12 |
| R₇ | 8,08 \pm 0,03 | 7,70 \pm 0,12* |
| R₁₅ | 8,12 \pm 0,06 | 7,96 \pm 0,05 |
| R₃₀ | 8,05 \pm 0,04 | 8,12 \pm 0,03 |
| Aclimatado | 7,96 \pm 0,032 | |

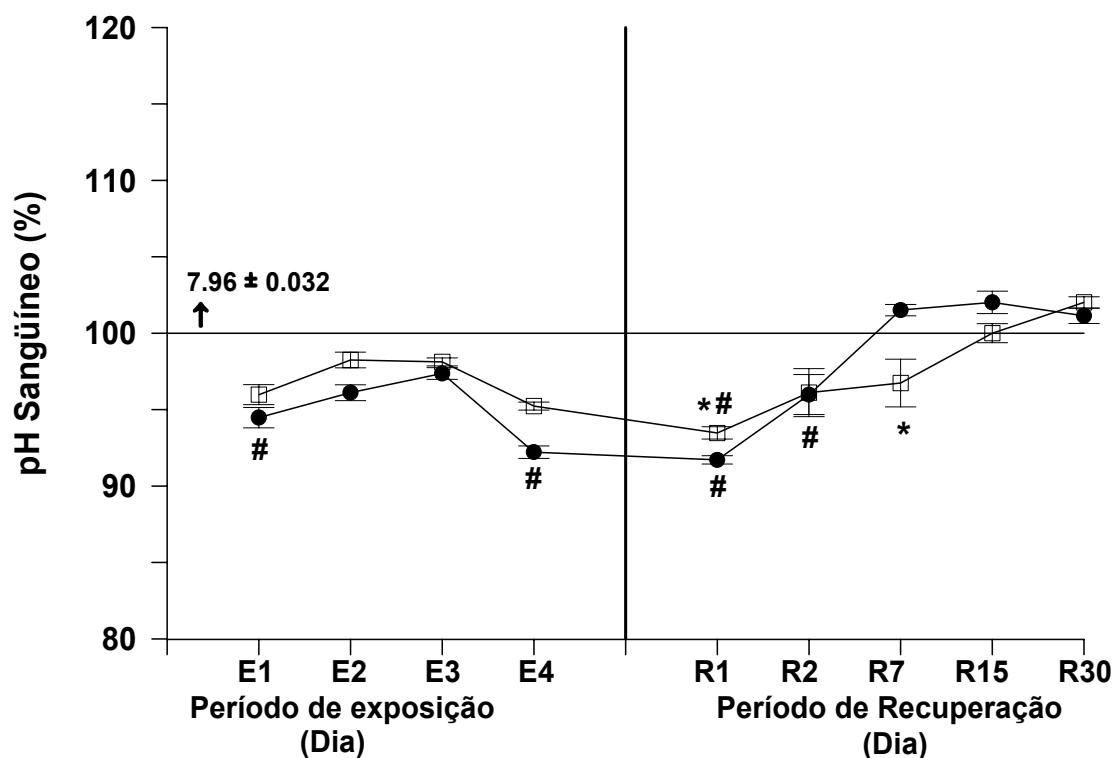


Figura 11 – Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) de pH sanguíneo em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E_1 , E_2 , E_3 e E_4 , respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R_1 , R_2 , R_7 , R_{15} e R_{30}) em relação às condições de aclimação (linha 100%). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre. O símbolo # indica diferença estatística significativa em relação aos animais aclimatados ($p < 0,05$); * indica diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Valores médios \pm SEM (n = 6) da porcentagem de hematócrito em *P. scrofa* do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀). * indica diferença estatística significativa (p<0,05) em relação ao controle no respectivo tempo.

| PERÍODO EXPERIMENTAL | CONTROLE (grupo C) (%) | COBRE (grupo CU) (%) |
|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| E ₁ | 41,20 \pm 1,24 | 45,20 \pm 0,80* |
| E ₂ | 41,40 \pm 0,60 | 46,00 \pm 0,89* |
| E ₃ | 39,00 \pm 0,63 | 43,00 \pm 0,63* |
| E ₄ | 42,72 \pm 1,09 | 49,81 \pm 1,32* |
| R ₁ | 44,50 \pm 2,02 | 50,25 \pm 1,30* |
| R ₂ | 36,90 \pm 1,77 | 39,63 \pm 1,15 |
| R ₇ | 41,22 \pm 1,51 | 42,85 \pm 1,20 |
| R ₁₅ | 37,90 \pm 1,33 | 33,66 \pm 1,08* |
| R ₃₀ | 36,62 \pm 2,23 | 33,46 \pm 0,91 |
| Aclimatado | 39,00 \pm 0,86 | |

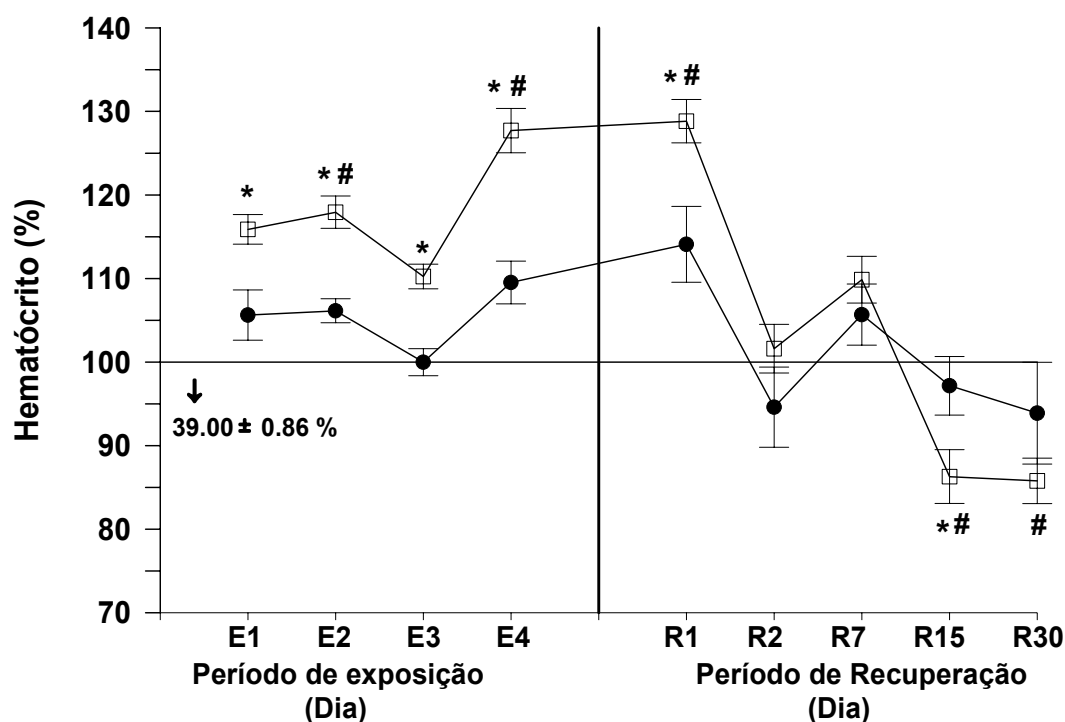


Figura 12 – Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) do hematócrito sanguíneo (%) em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E₁, E₂, E₃ e E₄, respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R₁, R₂, R₇, R₁₅ e R₃₀) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre. O símbolo # indica diferença estatística significativa em relação aos animais aclimatados (p<0,05); * indica diferença estatística significativa em relação ao controle (p<0,05).

observou-se uma queda significativa nos valores de hematócrito dos animais que foram expostos ao metal.

Durante os 4 dias (96h) de exposição ao cobre o hematócrito dos animais do grupo exposto ao cobre foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação aos animais do grupo controle (Tabela 8, Figura 12). Durante o período de recuperação, o hematócrito dos animais do grupo exposto ao cobre foi maior ($p < 0,05$) que o do grupo controle apenas no primeiro dia.

Nos últimos 15 dias de recuperação houve uma queda nos valores de hematócrito dos animais do grupo exposto ao cobre em relação aos animais do grupo controle, porém foi considerada significativa apenas no décimo quinto dia de recuperação.

4.6 -Caracterização cinética da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase em *Prochilodus scrofa*

As figuras 13 e 14 mostram as alterações na atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase ($\mu\text{MPi} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$) no tecido branquial de *P. scrofa*. em função das variações nas concentrações dos reagentes da técnica descrita em Quarbius (1997), tais como: proteína, ATP, KCl, MgCl_2 , NaCl, Ouabaína e também o tempo de incubação.

A concentração ótima de proteína foi de $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. O Na_2ATP registrou uma melhor atividade com 3mM, a ouabaína com 2,5 mM e o NaCl com 100 mM. O tempo de incubação do sobrenadante de tecido branquial que apresentou a melhor atividade foi de 45 minutos.

Variando-se o KCl, a concentração em que se obteve a melhor atividade foi de 10 mM, já para o MgCl_2 a melhor atividade foi em 8 mM.

A partir destas informações foi preparado o tampão de incubação com as concentrações de reagentes determinadas acima para determinação das atividades da

enzima Na⁺/K⁺-ATPase em animais expostos ao cobre e em recuperação em água sem cobre, bem como dos respectivos grupos controle.

4.7 - Atividade da Enzima Na⁺/K⁺-ATPase durante as 96 horas de exposição

A atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase branquial não apresentou diferenças significativas do grupo exposto ao cobre e do grupo controle em relação aos animais aclimatados (100% = 0,25 ± 0,039 μMPi.mg proteína⁻¹.h⁻¹) tanto no período de exposição ao cobre como no período de recuperação (Tabela 9, Figura 15).

Analisando-se os valores da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase do grupo controle em relação ao que foi exposto ao cobre, foi observada uma diminuição significativa na atividade da enzima durante o 1^o, 3^o e 4^o dia (24, 72 e 96h) de exposição ao cobre (Tabela 9, Figura 15).

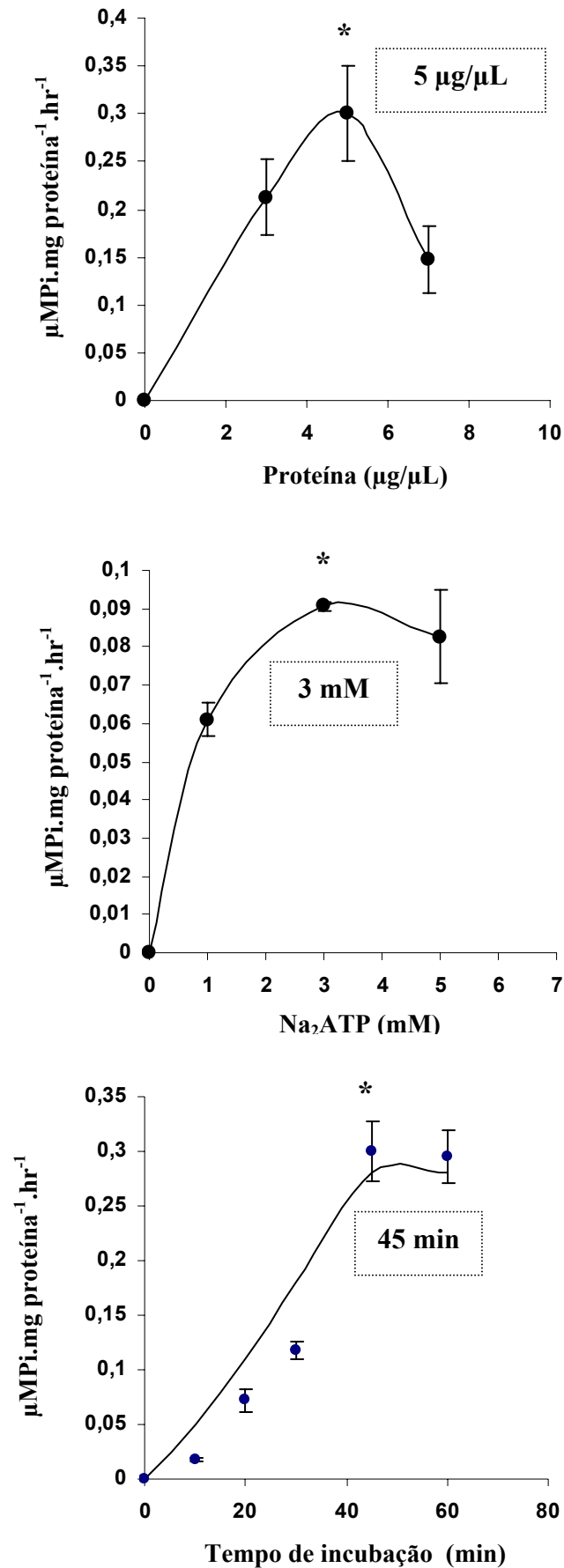


Figura 13 – Variação da atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase em relação às diferentes concentrações proteína, Na₂ATP e tempo de incubação. Os valores estão representados pela média ± SEM (n = 6). * indica maior atividade da enzima.

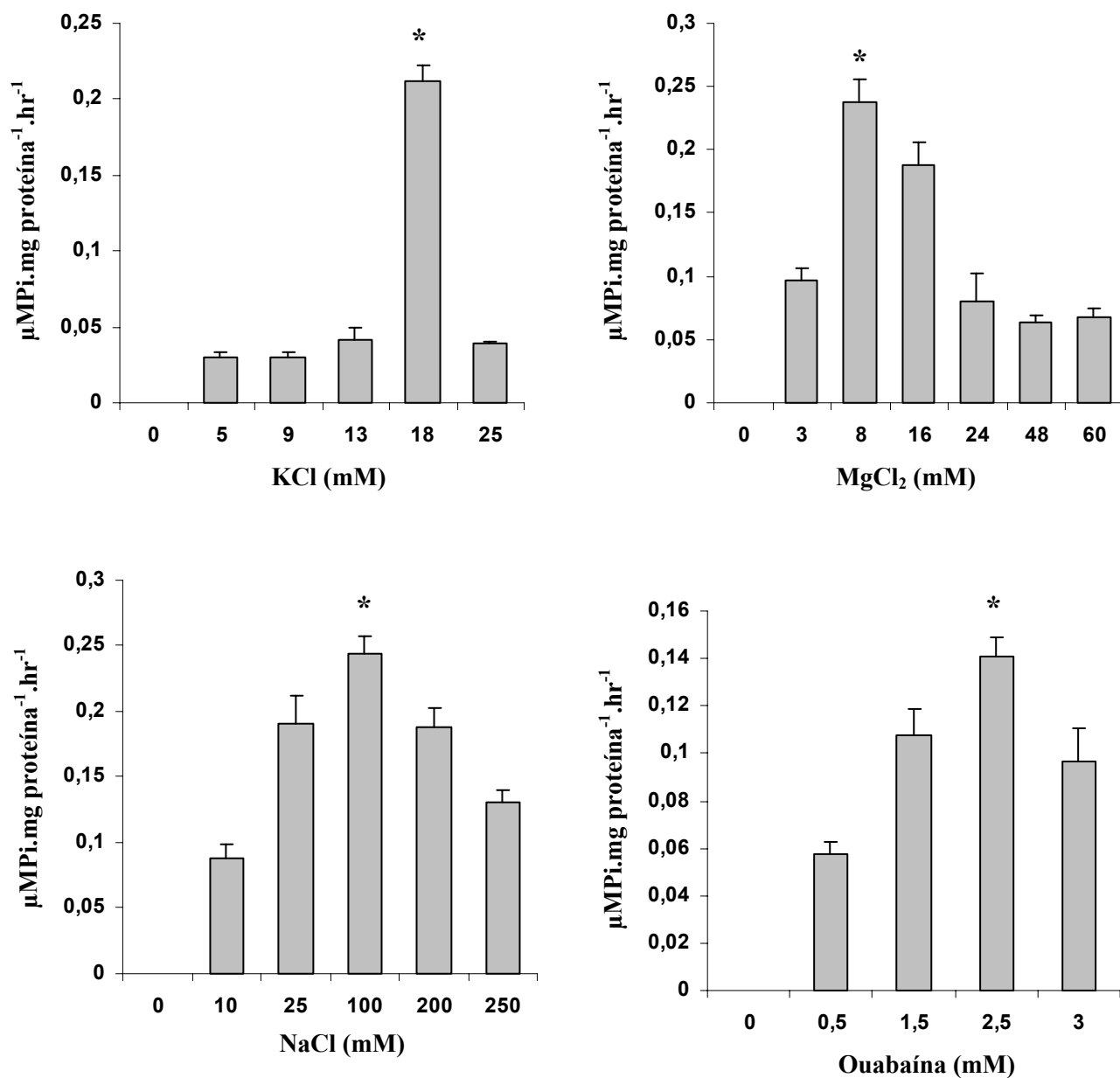


Figura 14 – Variação da atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase em relação às diferentes concentrações de KCl, MgCl₂, NaCl e Ouabaína. Os valores estão representados pela média ± SEM (n = 6). * indica maior atividade da enzima.

Tabela 9 – Valores médios \pm SEM (n = 6) da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase em *P. scrofa* do grupo controle (C) e do grupo exposto ao cobre (CU) durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E_1 , E_2 , E_3 e E_4 , respectivamente) e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R_1 , R_2 , R_7 , R_{15} e R_{30}). * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle no respectivo tempo.

| PERÍODO EXPERIMENTAL | CONTROLE (grupo C) ($\mu\text{MPi} \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$) | COBRE (grupo CU) ($\mu\text{MPi} \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$) |
|-------------------------|--|--|
| E_1 | $0,174 \pm 0,007$ | $0,117 \pm 0,014^*$ |
| E_2 | $0,179 \pm 0,015$ | $0,202 \pm 0,017$ |
| E_3 | $0,229 \pm 0,017$ | $0,133 \pm 0,017^*$ |
| E_4 | $0,240 \pm 0,035$ | $0,143 \pm 0,012^*$ |
| R_1 | $0,270 \pm 0,041$ | $0,256 \pm 0,042$ |
| R_2 | $0,286 \pm 0,048$ | $0,251 \pm 0,043$ |
| R_7 | $0,281 \pm 0,038$ | $0,260 \pm 0,033$ |
| R_{15} | $0,233 \pm 0,063$ | $0,159 \pm 0,021$ |
| R_{30} | $0,298 \pm 0,064$ | $0,273 \pm 0,055$ |
| Aclimatado | $0,25 \pm 0,039$ | |

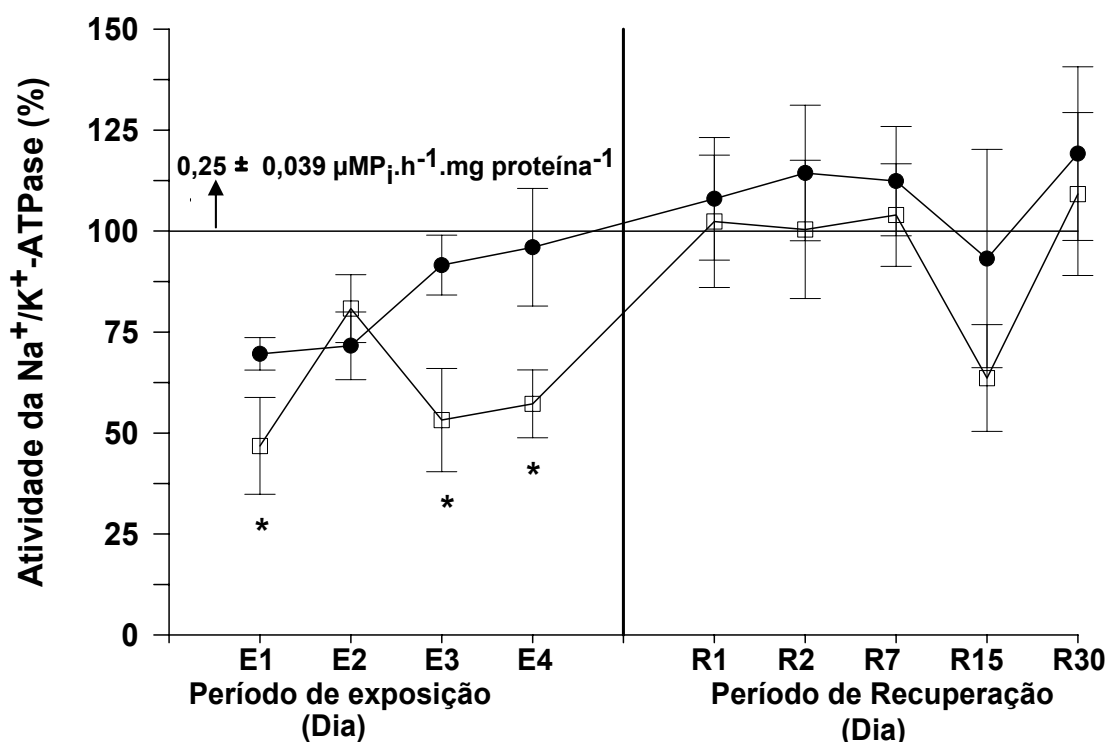


Figura 15 – Porcentagens dos valores médios (\pm SEM) da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase em *P. scrofa* durante a exposição de 96 h: 1, 2, 3 e 4 dias (E_1 , E_2 , E_3 e E_4 , respectivamente) ao cobre e posterior recuperação: 1, 2, 7, 15, 30 dias (R_1 , R_2 , R_7 , R_{15} e R_{30}) em relação às condições de aclimação (linha 100 %). ● representa o grupo controle e □ o grupo exposto ao cobre. O símbolo # indica diferença estatística significativa em relação aos animais aclimatados ($p < 0,05$); * indica diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

5.0 - Discussão

O presente estudo confirma e amplia os estudos anteriores (Mazon e Fernandes, 1999; Mazon *et al.*, 2000, 2002a, b; Cerqueira *et al.*, 2002; Takasusuki *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2004) sobre a susceptibilidade de *P. scrofa* ao cobre. Além disso, os resultados evidenciam claramente as alterações fisiológicas que ocorrem na fase inicial de exposição ao cobre (24-48 h), a denominada “fase de choque” (McDonald *et al.*, 1991), que é um período crítico caracterizado pela maioria das mortes dos peixes. Animais jovens, como os que foram utilizados no presente estudo, são aparentemente mais sensíveis ao cobre, devido a demanda energética maior para o crescimento e alta eficiência na absorção ligada a uma imaturidade no sistema de excreção (Kamunde *et al.*, 2002). Uma segunda razão, geralmente aceita para explicar a mortalidade maior na fase de choque, é que nesta fase pode ter ocorrido uma concentração maior de íons Cu^{2+} livres na água dos aquários no início da exposição, visto que com o tempo, a concentração desse íon poderia ter diminuído, devido à ligação com as paredes do aquário, ou com o muco produzido pelos animais ou ainda pela entrada do cobre nos organismos dos animais. Essa explicação é apenas especulativa visto que não foram realizadas medidas periódicas nas águas dos aquários-testes para evitar que essa manipulação fosse mais um fator estressante para os animais. A proporção massa de peixe/água nos aquários foi muito pequena para mostrar significativa redução do cobre livre na água dos aquários como já foi demonstrada por Mazon (1997).

Como já nas primeiras 24 horas de exposição ocorreu a maioria das mortes (aproximadamente 35%), nossos resultados podem representar uma seleção de indivíduos resistentes, que foram capazes de sobreviver à exposição ao cobre.

Alterações comportamentais são as primeiras a ocorrerem quando os animais detectam a presença de metais na água (Sorensen, 1991). O comportamento de *P. scrofa* expostos ao cobre de nadar na superfície da água e o aumento da frequência respiratória sugere que a função respiratória foi afetada, pois essas respostas indicam a necessidade maior de oxigênio. A elevada produção de muco é uma resposta comum quando os peixes são expostos a maioria dos poluentes (Mallatt, 1985), e, em geral, serve para proteger as superfícies epidermais como brânquias e pele (Lewis e Lewis, 1971). Além disso, o muco contém cargas negativas que podem atrair os íons cobre e, em seguida liberá-los durante a eliminação de água pelo opérculo, no ciclo respiratório. A camada de muco pode também aumentar a barreira água-sangue para difusão do cobre, porém esse sistema de defesa pode acarretar em prejuízo da função respiratória, já que também pode dificultar a difusão de gases (O_2 e CO_2) (Hinton e Laurén, 1990).

A natureza das respostas de *P. scrofa* durante todo o experimento revelaram alta influência de distúrbios físicos, principalmente a manipulação, o que dificultou o entendimento da real natureza das respostas integradas ao estresse frente a exposição ao cobre. Não podemos deixar de considerar o possível estresse provocado pelo confinamento nos aquários de vidro, bem como a amônia, nitrito da água dos aquários que podem ter sido alterados durante o período de exposição ao cobre. Entretanto, como já analisado por Mazon (dados não publicados), fatores como amônia, nitrito não foram alterados durante os experimentos de exposição ao cobre (96h) provavelmente devido a relação massa de peixe/L de água. Os animais do grupo aclimatado foram utilizados como “controle” para o fator estresse já que eles não sofreram manipulação de transferência para diferentes ambientes.

As alterações nos níveis de cortisol plasmático não evidenciaram claramente que o íon cobre foi um estressor agudo, pois os peixes de ambos os grupos (controle e cobre) apresentaram aumento nos níveis de cortisol. Nesse caso a manipulação do animal pode ter sido o fator principal de estresse nesses animais. A resposta ao estresse promovida pela exposição ao cobre em *P. scrofa* ficou evidenciada pelo aumento da concentração de glicose na circulação sanguínea, resposta esta que não foi observada nos peixes do grupo controle. Em *Salmo trutta* submetida a estresse, observou-se que os valores de glicose sanguínea não foram correlacionados com os de cortisol (Flodmark, *et al.*, 2002) como o que ocorreu com *P. scrofa* do grupo controle em relação aos animais expostos ao cobre. Em peixes, o aumento da glicose plasmática é uma resposta comum ao estresse, podendo muitas vezes ser considerada como indicador de estresse (Hattingh, 1976).

A hiperglicemia relacionada ao estresse foi reportada em muitos teleósteos e é aceita como sendo o principal efeito imediato da liberação de catecolaminas para suprir o aumento na demanda de energia para as atividades metabólicas associadas ao estresse em peixes (Barton e Iwama, 1991) como as alterações nas funções respiratórias e cardiovasculares (Randall e Perry, 1992). A glicogenólise é o principal processo metabólico induzido pelas catecolaminas para a liberação de glicose hepática em curtos períodos de estresse (Vijayan *et al.*, 1994; van Raaij *et al.*, 1996, Fabbri *et al.*, 1998; Mommsen *et al.*, 1999). A gliconeogênese também pode ser responsável pelo aumento da glicose plasmática, principalmente quando o glicogênio hepático foi exaurido (Janssens e Waterman, 1988). A manutenção dos altos níveis de glicose plasmática durante todo o período de exposição ao cobre e nos dois primeiros dias de recuperação em água sem cobre no grupo CU pode ter sido resultado da gliconeogênese induzida ou mediada pelos altos níveis de cortisol registrados. A redução significativa nos níveis de glicose nos animais do grupo CU em

relação aos do grupo controle, no sétimo e no décimo quinto dia de recuperação, pode ser atribuída a redução dos estoques de glicogênio hepático que foi utilizado durante os períodos de estresse para manutenção da demanda de energia (Quarbius, *et al.* 2000).

A elevação dos níveis de cortisol é o principal indicador de estresse em peixes e ocorre como resposta para uma grande variedade de estressores, incluindo poluentes (Wendelaar Bonga, 1997, Mommsen *et al.*, 1999). Na exposição aguda a um agente estressor, os níveis de cortisol aumentam e retornam aos níveis do grupo controle depois de poucas horas (Nolan, 2000) ou dias (Arends *et al.*, 1999). O aumento significativo nos níveis de cortisol em *P.scrofa* de ambos os grupos, controle e exposto ao cobre, indicaram que o aumento do cortisol não foi somente em decorrência da exposição ao cobre, mas também pela manipulação na transferência dos animais para as novas condições: tanques de aclimação (fluxo constante de água) para exposição (sistema estático) e deste para tanques de recuperação (fluxo constante de água).

Entretanto, a ausência de aumento do cortisol plasmático nos peixes do grupo controle, quando ambos os grupos foram transferidos para os tanques de recuperação (água sem cobre), revelaram uma resposta integrativa ao estresse complexa nesta espécie, tornando difícil uma explicação clara, já que a transferência para água sem cobre também implicou em manipulação e novas condições de permanência (sistema com fluxo constante de água). O período de tempo entre as exposições a estressores tem implicações nas respostas ao estresse, podendo tornar-se acumulativas ou ocorrer habituação ou compensação (Schreck, 2000). Esta pode ser a provável explicação da não alteração dos valores de cortisol dos animais do grupo controle que sofreram manipulação semelhante àquela que foi submetida os animais do grupo cobre, sugerindo que tenha havido um processo de habituação ou compensação como proposto por Schreck (2000). Já, os altos

níveis de cortisol no plasma dos peixes do grupo CU no primeiro dia do período de recuperação pode ser explicado pela maior susceptibilidade dos animais para a manipulação visto que ficaram expostos ao cobre durante 96 horas. Não havendo mais cobre na água, a redução na concentração do cortisol plasmático foi o esperado, ou seja, no segundo dia após a transferência para água sem cobre, os valores retornaram para aqueles semelhantes aos do grupo de animais aclimatados, evidenciando uma tendência a recuperação do estresse (Nolan, 2000; Dang, 2000a).

Algumas das respostas fisiológicas ao estresse causado pelo cobre e/ou manipulação (transferência dos peixes para novas condições) observadas no presente estudo revelaram alguma discrepância com a maioria dos resultados relatados na literatura, principalmente aqueles relacionados à perda de íons (Flik e Perry, 1989, McDonald e Milligan, 1997).

O aumento no hematócrito tem sido observado freqüentemente em peixes submetidos a agentes estressores (Heath, 1995) e é freqüentemente atribuído à liberação de catecolaminas que induz o aumento no volume do eritrócito e aumento na afinidade O₂-Hb (Soivio e Nikinmaa, 1981). Dethloff *et al.* (1999) não encontraram alterações no hematócrito de truta arco-íris após exposição ao cobre, zinco e na mistura zinco-cobre, todos em concentrações subletais. Outros estudos mostraram que a exposição ao cobre cuja concentração foi de até 27 $\mu\text{gCu}^{2+} \text{ L}^{-1}$, não alteraram o hematócrito e a glicose; somente concentrações acima de 30 $\mu\text{gCu}^{2+} \text{ L}^{-1}$ foram capazes de induzir alterações significativas (Christensen *et al.*, 1972; Mckim, 1970). O aumento no hematócrito tem sido relatado como sendo uma resposta transitória restrita a minutos ou horas (Casillas e Smith, 1977) sendo que muitos outros fatores podem influenciar nas mudanças do hematócrito. No caso de *P. scrofa*, o aumento no hematócrito dos peixes do grupo CU, durante todo o período de exposição e também no primeiro dia da recuperação pode ser, a princípio, atribuído à

liberação de catecolaminas, mas a manutenção da alta porcentagem de hematócrito por um longo período de tempo sugere a possibilidade de aumento no número de eritrócitos circulantes como já foi descrito em estudos anteriores efetuados com *P. scrofa* expostos ao cobre (Mazon *et al.* 2002b; Cerqueira *et al.*, 2002). Embora os efeitos no sangue estejam associados com a desintegração dos eritrócitos e, na maioria das espécies sensíveis a danos no sistema hematopoiético (Svobodová *et al.*, 1994), as alterações nas variáveis sanguíneas de *P. scrofa* durante a exposição ao cobre sugerem uma resposta compensatória para o aumento na capacidade de transporte de oxigênio (Mazon *et al.*, 2002b; Cerqueira *et al.*, 2002).

Muitos estressores alteram as funções branquiais e resultam em distúrbios hidromineral e ácido-base (Barton *et al.*, 2002). Em peixes de água doce, o aumento na perfusão das lamelas secundárias das brânquias favorece a tomada de oxigênio, e é atribuída ao aumento das catecolaminas circulantes no plasma. O aumento da perfusão das lamelas secundárias é acompanhado por um aumento na permeabilidade das membranas e favorece o ganho de água a partir do ambiente e a perda de íons Na^+ e Cl^- para o ambiente (McDonald e Milligan, 1997). O cobre, por sua vez, altera o epitélio branquial (Fernandes e Mazon, 2004) e inibe a atividade da Na^+/K^+ -ATPase (Li *et al.*, 1996) o que pode potencializar os efeitos da liberação de catecolaminas.

Em nossos experimentos os distúrbios hidromineral e ácido-base foram encontrados em ambos os grupos (controle e exposto ao cobre), entretanto a magnitude e a duração das respostas foram diferentes. Em períodos curtos de exposição, os efeitos fisiológicos são os primeiros a ocorrerem, mas somente em 96 horas de exposição ao íon Cu^{2+} , *P. scrofa* apresentou uma alteração significativa nas concentrações de íons plasmáticos o que também foi observado por Cerqueira *et al.* (2002). Essa tendência

iniciou-se após 48 horas de exposição. Altos níveis de catecolaminas podem explicar os aumentos nos níveis de K^+ plasmáticos nas primeiras 24 horas em relação ao grupo de animais aclimatados, já que elas (CAs) tendem a alterar a permeabilidade das membranas dos eritrócitos, proporcionando a perda de íons destas células para o plasma (Evans, 1993). O aumento significativo no Na^+ plasmático sem mudanças no Cl^- plasmático nos animais do grupo controle, exceto no terceiro dia do período de exposição, comparado com o grupo de peixes aclimatados, pode ser explicado pelos efeitos dos elevados níveis de cortisol alterando, nas brânquias a permeabilidade das membranas e/ou as funções específicas de cada tipo celular respectivamente, (Wendelaar Bonga, 1997, Arends *et al.*, 1999, Laiz-Carrión *et al.*, 2003) ou o efeito direto do cobre na estrutura branquial (Mazon *et al.* 2002a,b, Cerqueira *et al.*, 2002), porém essa explicação não explica totalmente as diferenças no balanço hidromineral em ambos os grupos. Muitos estudos evidenciaram que o cortisol aumenta o número de células de cloreto (Laurent e Perry, 1990; Mazon *et al.*, 2004), as unidades de Na^+/K^+ -ATPase no sistema tubular e na membrana basolateral das células de cloreto (Dang *et al.*, 2000b) e a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (Flik e Perry, 1989). Além disso, Laurent e Perry (1990) também demonstraram que existe uma positiva correlação entre a superfície apical das células de cloreto e o influxo de Na^+ e Cl^- nas brânquias. A exposição aos metais pesados está associada à perda de íons, principalmente Na^+ e Cl^- (Arellano, 1999), decorrentes de respostas bioquímicas provocadas quando o cobre entra em contato com as células dos tecidos branquiais, por exemplo inibindo o influxo transcelular de Na^+ e estimulando o efluxo paracelular deste mesmo íon através das junções do tipo “tight” (Laurén e McDonald, 1985). A inibição de enzima Na^+/K^+ -ATPase também é um importante fator a ser considerado durante o período em que animal está exposto ao metal.

Entretanto, nenhuma mudança significativa nas concentrações de Na^+ plasmático foram observadas nos peixes do grupo exposto ao cobre, exceto no primeiro dia de exposição em relação aos animais do grupo aclimatado. A redução no Na^+ e Cl^- plasmático nos peixes expostos ao cobre em relação aos do grupo controle, que ocorreu juntamente com a redução significativa da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase, pode indicar que a ação direta do cobre nas membranas branquiais tem efeito preponderante em relação a possível ação do cortisol nas células de cloreto.

Embora após 96 horas de exposição ao cobre e no primeiro dia de recuperação tenham ocorrido reduções significativas nos valores de Na^+ e Cl^- , a razão Na:Cl não foi alterada, como foi também observado por Pelgrom, *et al.* (1995) em *Oreochromis mossambicus* expostos ao cobre.

A redução nos valores de pH nos grupos controle e expostos ao cobre em relação aos animais do grupo aclimatado durante o período de exposição pode estar relacionada com o aumento do metabolismo requerido para manter a homeostase interna (Wendelaar Bonga, 1997) acarretando em uma acidose metabólica reduzindo o pH. A alteração na regulação ácido-base pode permanecer mais do que 4 dias e foi sugerido que o cobre pode interferir com o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e/ou anidrase carbônica, porque induz o aumento da PCO_2 (Wang, 1998). A interferência no trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ juntamente com a possível inibição do trocador $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ apical (Laurén e McDonald, 1985) pode ser uma explicação para as alterações nos valores de pH, mas esse fato deveria ter sido acompanhado de mudanças nas razões Na:Cl, as quais não ocorreram em *P. scrofa*, no presente estudo.

Como não houve alteração na razão Na:Cl, mas ocorreu alteração no pH, esse fato pode ser atribuído ao efeito direto do cobre induzindo a dificuldade na eliminação de

amônia (Grosell *et al.*, 2002) ou pelo efeito do cortisol que em altos níveis podem atuar no metabolismo de proteínas aumentando seus níveis (van der Boon, *et al.*, 1991).

A técnica utilizada para análise da enzima Na^+/K^+ -ATPase mostrou-se simples e eficiente para demonstrar a ação direta do cobre, embora os resultados obtidos por essa técnica tenham apresentado valores até 10 vezes menores que os resultados obtidos por outros autores (Siegler, *et al.*, 1996; Johnson, *et al.*, 1993), porém essas técnicas são muito complexas e de alto custo e têm sido utilizadas principalmente em peixes marinhos, nos quais a atividade dessa enzima é mais alta. Mesmo com a otimização da técnica utilizada no presente estudo a atividade da Na^+/K^+ -ATPase em *P. scrofa*, manteve-se baixa. A diminuição da atividade de enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias de *P. scrofa* durante todo o período de exposição ao cobre corrobora com os resultados obtidos com mamíferos (Li *et al.*, 1996) e outras espécies de teleósteos (Pelgrom, 1995; Mazon *et al.*, 2004) quando expostos ao cobre. Seria esperado que o aumento dos níveis de cortisol plasmático aumentasse a atividade da enzima contrapondo o efeito direto do cobre sobre a mesma. Entretanto, altos níveis de cortisol aceleram o ciclo celular e induzem apoptose das células de cloreto (Nolan, 2000), o que pode ter ocorrido com os animais do grupo controle, uma vez que não houve aumento na atividade de enzima. No grupo exposto ao cobre, os valores determinados para a atividade da Na^+/K^+ -ATPase está provavelmente associada a ação do cobre diretamente sobre a enzima e/ou células de cloreto, contudo não deve ser descartada a hipótese de aumento da apoptose dessas células.

6.0 - Conclusões:

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- a) *P. scrofa* apresenta alta sensibilidade ao manuseio inerente ao estudo experimental o que pode influenciar as respostas geradas pela exposição ao cobre.
- b) O aumento do cortisol e glicose plasmática podem ser indicadores de estresse nessa espécie, porém o agente estressor indutor dessas respostas é difícil de ser identificado.
- c) o cobre é um agente inibidor da Na^+/K^+ -ATPase no tecido branquial.
- d) As alterações fisiológicas em resposta a exposição ao cobre podem ser restauradas após transferência para água sem a presença de cobre em aproximadamente 7 dias de recuperação.

Referências bibliográficas

- Alabaster, J.S., 1982. Water Quality Criteria for Freshwater Fish. 2^a ed. Butterworths, p. 361.
- Arellano, J. M., Storch, V., Sarasquete, C. 1999 Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the senegales sole, *Solea senegalensis*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 44, 62-72.
- Arends, R. J., Mancera, J. M., Muñoz, J. L., Wendelaar Bonga, S. E. and Flik, G., 1999. The stress responses of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. J Endocrinol. 163, 149-157.
- Barton, B. A. and Iwama, G. K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual Rev. Fish Dis. 1, 3-26.
- Barton, B. A., Morgan, J. D., Vijayan, M.M., 2002. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. In: Adams, S. M. (Ed.), Biological indicators of Aquatic Ecosystem stress. Amer. Fish. Soc, Bethesda, USA, pp. 111-148.
- Bloomer, L.C., Lee, G.R., 1978. Normal hepatic copper metabolism. In: Metals and the liver. Powell L.W. (Ed.), New York: Marcel Dekker, p. 179-239.
- Bury, N.R.; Li, J.; Lock, R. A. C. E Wendelaar Bonga, S.E., 1998. Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells *in vitro*. Aquat. Toxicol. 40, 193-202.
- Campbell, H. A., Handy, R. D., Nimmo, O. M., 1999. Copper uptake kinetics across the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) measured using an improved isolated perfused head technique. Aquat. Toxicol. 46,177-190.
- Carbonell, G., Tarazona, J. V., 1994. Toxicokinetics of copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 29,213-221.
- Carvalho, C. S., Araújo, H. S. S. and Fernandes, M. N., 2004. Metallothionein in the liver of the neotropical fish, *Prochilodus scrofa* exposed to copper in two water pHs at 20 °C. Comp. Biochem., Physiol.B. 137, 225-234.
- Casillas, E. and Smith, L. S., 1977. Effect of stress on blood coagulation and hematology in rainbow trout *Salmo gairdneri*. J.Fish Biol. 10, 481-491.
- 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. Safety. 52, 83-89.

CETESB, 1996-2003. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo. CETESB, São Paulo, Brasil.

Christensen, G. M., McKim, J. M., Brungs, W. A., Hunt, E. P., 1972. Changes in the blood of the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*) (Lesueur) following short and long exposure to copper(II). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23, 417-427.

Dang, Z., 2000a. Adaptative stress responses in fish gill. Tese de Doutorado – Universidade Católica de Nijmegen, Holanda.

Dang, Z., Lock, R. A. C., Flik, G. and Wendelaar Bonga, S. E., 2000b. Na⁺/K⁺-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *J. Exp. Biol.* 203, 370-387.

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

Doudoroff, P., Katz, M., 1953. Critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components to fish II. The metals as salts. *Sewage ind. Wastes* 25, p. 802-839. In: *Biochemistry*. Lehninger, A.L. (Ed.), New york: Worth.

Evans, D. H., 1993. *The Physiology of Fishes*. CRC Press, USA, p. 251-278.

Fabbri, E., Capuzzo, A. and Moon, T. W., 1998. The role of catecholamines in the regulation of fish metabolism: an overview. *Comp. Biochem. Physiol.C.* 120, 177-192.

Fernandes, M. N. and Mazon, A. F., 2003. Environmental Pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Adaptations*, Science Publishers, Enfield, USA, pp. 203-231.

Flik, G. and Perry, S. F., 1989. Cortisol stimulates whole-body calcium uptake and the branchial calcium pump in freshwater rainbow trout. *J. Endocrinol.*, 120, 75-82.

Flodmark, L. E. W., Urke, H. A., Halleraker, J. H., Arnekleiv, J. V., Vollestad, L. A., Poleo, A. B. S., 2002. Cortisol and glucose responses in juvenile brown trout subjected to a fluctuating flow regime in an artificial stream. *J. Fish Biol.* 60, 238-248.

Fu, H.; Steinebach, O.M.; van der Harmer, C.J.A.; Balm, P.H.M. e Lock., R.A.C., 1990. Involvement of cortisol and metallothionein-like proteins in the physiological responses of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to sublethal cadmium stress. *Aquat. Toxicol.* 16, 257-270.

Grosell, M.H., Hogstrand, C. M., Wood, C. M., 1997. Cu uptake and turnover in both Cu-acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 38, 257-276.

- Grosell, M.H., Hogstrand, C. M., Wood, C. M., 1998. Renal Cu and Na excretion and hepatic Cu metabolism in both Cu acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 40, 275-291.
- Grosell, M., Nielsen, C., Bianchini, A., 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute and silver exposure in freshwater animals. *Comp. Biochem. Physiol. (Part C)*, 133, 287-303.
- Hattingh, J., 1976. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater fish *Labeo capensis* (Smith). *J. Fish Biol.* 10, 191-195.
- Heath, A. G., 1995 *Water pollution and fish Physiology*. CRC Press, Boca Raton, USA
- Hinton, D. E. and Laurén, D. J., 1990. Integrative histopatological approaches to detecting effects of environmental stressor on fishes. In: Adams, S. M. (Ed.), *Biological Indicators of Stress in Fish*. American Fisheries Society Symposium 8, Bethesda, pp. 51-56.
- Hontela, A., 1998. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: *in vivo* and *in vitro* assessment. *Environ. Toxicol Chem.* 17, 44-48.
- Iwama, G. K., McGeer, J. C. and Bernier, N. J., 1992. The effects of stock and rearing density on the stress response in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *ICES Mar. Sc. Symp.* 194, 67-83.
- Janssens, P. A. and Waterman, J., 1988. Hormonal regulation of gluconeogenesis and glycogenolysis in carp (*Cyprinus carpio*) liver pieces cultured in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.A.* 91, 451-455.
- Johnson, S. L., Ewing, R. D., Lichatowich, J. A., 1993. Characterization of gill (Na⁺K)-Activated Adenosine Triphosphatase from Chinook Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *J. Exp. Zool.* 345-354.
- Kamunde, C., Grosell, M., Higgs, D., Wood, C. M., 2002. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. *J. Exp. Biol.* 205, 279-290.
- Laiz-Carrion, R., del rio, M. P. M., Miguez, J. M., Mancera, J. M. and Soengas, J. L., 2003. Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*. *J. Exp. Zool.* 298A, 105-118.
- Laurén, D.J. e McDonald, D. G., 1985. Effects of copper on branquial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Comp. Physiol.* 13, 635-644.
- Laurent, P. and Perry, S. F., 1990. Effects of cortisol on gill cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.* 259, 429-442.

- Lewis S. D. and Lewis, W. M., 1971. The effect of zinc and copper on the osmolality of blood serum of the channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, and golden shiner, *Notemigonus crysoleucas* Mitchell. Trans. Am. Fish. Soc. 100, 639-643.
- Li, J., Lock, R. A. C., Klaren, P. H. M., Swarts, H. G. P. Schuurmans Stekhoven, F. M. A. H. and Wendelaar Bonga, S. E., 1996. Kinetics of copper inhibition of Na^+/K^+ -ATPase. Toxicol. Lett. 87, 31-38.
- Ling, K. H., Sin, Y. M. And Lam, T. J., 1993. Effect of copper sulphate on ichthyophthiriasis (white spot disease) in goldfish (*Carassius auratus*). Aquaculture. 118, 23-35.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-276.
- Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Can. J. Fish. Aquat. Sc. 42, 630-648.
- Mazon, A.F., 1997. Efeito dos íons cobre curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). Dissertação de mestrado PPG-ERN/ UFSCar, São Carlos SP, p. 163.
- Mazon, A. F. and Fernandes, M. N., 1999. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). Bull. Environ. Cont. Toxicol. 63, 797-804.
- Mazon, A. F., Pinheiro, G. H. D. and Fernandes, M. N., 2000. Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e potencial risco a biodiversidade: estudo da toxicidade do cobre em curimatá, *P. scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae). In: Espindola, E. L. G., Paschoal, C. M. R. B., Rocha, O., Bohrer, M. B. C. and Oliveira Neto, A. L. (Eds.), Ecotoxicologia. Perspectivas para o século XXI. RiMa, São Carlos, SP, Brazil, pp. 327-340.
- Mazon, A. F., Cerqueira, C. C. C., Fernandes, M. N., 2002a. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. Environ. Res. 88A, 52-63.
- Mazon, A.F., Monteiro, E. A. S., Pinheiro, G.H.D., Fernandes, M.N., 2002b. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. Braz. J. Biol. 63, 621-631.
- Mazon, A. F, Nolan, D. T., Lock, R. A. C., Fernandes, M. N. and Wendelaar Bonga, S.E., 2004. A short-term *in vitro* gill culture system to study the effects of toxic (copper) and non-toxic (cortisol) stressors on the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Toxicol *In Vitro*, no prelo.

- McDonald D.G., Wood, C.M., Rhem, R.G., Mueller, M.E., Mount, D.R., Bergman, H.L., 1991. Nature and time course of acclimation to aluminum in juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). I. Physiology. *Can. J. Fish. Sci.* 48, 2006-2015.
- McDonald, D. G., Goldstein, M. D. and Mitton, C., 1993. Responses of hatchery-reared brook trout, lake trout & splake to transport stress. *Trans. Am. Fish Soc.* 122, 1127-1138.
- McDonald, G. and Milligan, L., 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In Iwama, G. K., Pickering, A. D., Sumpter, J. P. and Schreck, C. B. (Eds.), *Fish stress and Health in aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 119-144.
- McKim, J. M., Christensen, G. M., Brungs, W. A., Hunt, E. P., 1970. Changes in the blood of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) after short-term and long term exposure to copper. *J. Fish. Res. B. Can.* 27, 1883-1889.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M. and Moon, T. W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fisheries.* 9, 211-268.
- Nolan, D.T., 2000. Skin responses of fish to stressor. Ph D thesis, Katholitic University of Nijmegen, Nijmegen, Netherlands.
- Neiboer, E., e Richardson, D. H. S., 1980. The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. (Ser. B)* 1, 3-26.
- Nolan, D. T., Op't Veld, R. L. J. M., Balm, P. H. M. and Wendelaar Bonga, S. E., 1999. Ambient salinity modulates the stress response of the tilapia, *Oreochromis niloticus*, (Peters) to net confinement. *Aquaculture.* 177, 297-309.
- Moore J.W.; Ramamoorthy, S., 1984. *Heavy Metals in Natural Waters*. Springer, Berlin, pp. 77-79.
- Nor, Y. N., 1987. Ecotoxicity of copper to aquatic biota. *A. Re. Environ. Res.* 43, 274-282.
- Pelgrom, S. M. G. J., lock, R. A. C., Balm, P. H. M. and Wendelaar Bonga, S. E., 1995. Integrated physiological responses of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. *Aquat. Toxicol.* 32, 303-320.
- Olsson, P.E.; Hyllner, S.J.; Zafarullah, M.; Anderson, T. e Gedamu, L., 1990. Differences in metallothionein gene expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes and the RTH-149 cell line. *Biochim. Biophys. Acta*, 1049, 78-82.
- Perry, S. F., Davie, P.S., Daxboeck, C., Ellis, A. G., Smith, D. G., 1984. Perfusion methods for the study of gill physiology. In: Hoar, W.S., Randall, D. J. (Eds.), *Fish Physiology*. Vol XB. Academic Press, London, pp. 325-388.

- Pickering, Q.H., Henderson, P., 1966. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warm water fishes. *Air Water Pollut. Int. J.* 10, p. 453-463.
- Pinheiro, G.H., Mazon, A.F., Fernandes, M.N., 1999. Análise das concentrações de glicose e lactato em *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae) após exposição aguda ao íon cobre. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 13, São Carlos. Resumos. São Carlos: UFSCar. p. 324.
- Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd, R. (Eds.) Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. The University Press, Cambridge. p. 339-352.
- Pottinguer, T. G., Pickering, A. D. and Hurley, M. A., 1992. Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 103, 275-289.
- Quabius, E. S., Balm, P. H. M. and Wendelaar Bonga, S. E., 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis niloticus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 472-482.
- Quabius, E. S., Nolan, D. T., Allin, C. J., Wendelaar Bonga, 2000. Influence of dietary exposure to polychlorinated biphenyl 126 and nutritional state on stress response in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol Chem.* 17, Vol. 19, 44-48.
- Rand G.M., Petrocelli S.R., 1976. *Fundamentals of Aquatic Toxicology - Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation NY USA.
- Randall, D. J. and Perry, S. F., 1992. Catecholamines. In: Hoar, W. S. and Randall, D. J. (Eds.) *Fish Physiology*. Academic Press, New York, USA, vol. 12B, pp. 255-300.
- Redding, J.; Patino, R. e Schreck, C.B., 1991. Cortisol effects on plasma electrolytes and thyroid hormones during smoltification in coho salmon, *Oncorhynchus Kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81, 373-382.
- RESOLUÇÕES CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasília – DF/92. 1984 a 1991.
- Ruane, N. M., Wendelaar Bonga, S. E. and Balm, P. H. M., 1999. Differences between rainbow trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiology performance during confinement. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 210-219.
- Sarkka, J., Hatulla, M. L., Passivirta, J., e Janatuinen, J., 1978. Mercury and chlorinated hydrocarbons in food chain of lake Pajinne, Finland. *Holarctic Ecol.* 1, 326-332.

Schreck, C. B., 2000. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: Moberg, G. P. and Mench, J. A. (Eds.), *The Biology of Animal Stress. Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CABI Publishing, Oxon, U.K., pp. 147-158.

Siegler, L., D'Cotta, H., Paulin, L., Baglinière, J. L., Prunet, P. 1996. Biopse et mesure de l'activité Na⁺/K⁺ ATPasique branchiale: validité et impact sur le developement du smolt de saumon atlantique (*Salmo salar* L.). *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 340, 43-55.

Soivio, A. and Nikinmaa, M., 1981. The swelling of erythrocytes in relation to the oxygen affinity of the blood of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. In: Pickering, A.D. (ed.), *Stress and fish*. Academic Press, London, pp. 101-119.

Sörensen, E. M., 1991. *Metal Poisoning in fish*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Spry, D.J., Wood, C. M., 1988. Zinc influx across the isolated, perfused head preparation of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in hard and soft water. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45, 2206-2215.

Svobodová, Z., Vykusová, B. and Máchová, J., 1994. The effects of pollutants on selected haematological and biochemical parameters in fish. In: Müller, R. & Lloyd, R. (Eds.), *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Fishing News Books, London.

Takashima F., Hibiya T. 1995. *An atlas of fish histology. Normal and pathological features*. Second edition. Kodansha Ltd - Tokyo- Japan.

Takasusuki, J., Araujo, M. R. R. and Fernandes, M. N., 2004. Effect of Water pH on Copper Toxicity in the Neotropical Fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodondidae). *Bull. Environ. Cont. Toxicol.* in press.

Torres, P., Tort, L., Flos, R., 1987. Acute toxicity of copper to mediterranean dogfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 86, p. 169-177.

USEPA, 1984. *Ambient Water Quality Criteria for Copper* (United States Environmental Agency), Washington, D.C.

van der Bonn, J., van den Thillart, G. E. E. J. M., Addink, A. D. F., 1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A, 47-53.

van Raaij, M. T. M., van den Thillart, G. E. E. J. M., Hallemeesch, M., Balm, P. H. M. and Steffens, A. B., 1996. Effect of arterially infused catecholamines and insulin on plasma glucose and free acids in carp. *Am.J. Physiol.*, 268, R1163-R1170.

Vijayan, M.M., Pereira, C., Moon T.W., 1994. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. *Comp. Biochem. Physiol.* C 108, 321-329.

Verbost, P.M.; Salah El-Deen, M.A.; Pelt, P.; Bijvelds, M.J.C., Wendelaar Bonga, S.E. 1996. Effects of Zn^{2+} on Ca^{2+} uptake by mitochondria and endoplasmic reticulum in permeabilized tilapia gill cells. *Fish Physiol. Biochem.* 15, p. 299-305.

Wedemeyer, G. A., 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 35-71.

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

Woodward, C. C. and Strange, R. J., 1987. Physiological stress responses in wild and hatchery-reared rainbowtrout. *Trans. Am. Fish. Sc.* 116, 574-579.

Weser, U., Schubofz, L.M., Younes, M., 1979. Chemistry of copper proteins and enzymes. In: *Copper in the Environment II. Health Effects*. Nriagu, J. O. (Ed.), New York: Wiley, pp. 197-232.