

Utilização de Biomarcadores para Avaliação das Alterações Químicas, Bioquímica, Hematológicas e Histológicas em traíra, *Hoplias malabaricus* (Block, 1794), após Exposição Aguda ao Metilmercúrio e ao Cloreto de mercúrio

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Veiga de Carvalho  
Co-Orientador: Prof. Dr. Edésio José Tenório de Melo  
Campos dos Goytacazes – RJ  
Fevereiro, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia  
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

325 / 2009

Jesus, Taíse Bomfim de

Utilização de biomarcadores para avaliação das alterações químicas, bioquímicas, hematológicas e histológicas em traíra, *Hoplias malabaricus* (Block, 1794), após exposição aguda ao metilmercúrio e cloreto de mercúrio / Taíse Bomfim de Jesus. -- Campos dos Goytacazes, 2009.  
xv, 137 f. : il.

Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e Biotecnologia. Laboratório de Ciências Ambientais.

Área de concentração: Ecologia de ecossistemas

Orientador: Carvalho, Carlos Eduardo Veiga de

Bibliografia: f. 118-131

1. Monitoramento ambiental 2. Biomarcadores 3. Peixes 4. Mercúrio  
5. Ensaio agudo I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro II. Título

577.627

J58u

Utilização de Biomarcadores para Avaliação das Alterações Químicas, Bioquímica, Hematológicas e Histológicas em traíra, *Hoplias malabaricus* (Block, 1794), após Exposição Aguda ao Metilmercúrio e ao Cloreto de mercúrio

**Táise Bomfim de Jesus**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em de 16 Fevereiro de 2009  
Comissão examinadora:

---

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro (Doutor, Ciências Biológicas) - UFPR

---

Profa. Dra. Cristina Maria Magalhães de Souza (Doutora, Ciências Biológicas) - UENF

---

Prof. Dr. Antonio Aparecido Mozeto (Doutor, Geologia) UFSCar

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Veiga de Carvalho (Doutor, Geociências) - UENF (Orientador)

Dedico esta tese ao meu filho  
que ainda em formação já  
transformou a minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a cada integrante da minha família (meus pais e minhas irmãs), que sempre me apoiaram e apesar da saudade, resistiram a minha ausência nesses 4 anos.

Ao meu Orientador, Carlos Eduardo Veiga de Carvalho (para todos, Carlinhos) que apesar de não me conhecer, assumiu o risco de me orientar.

À Willian, pela dedicação, carinho, respeito e principalmente paciência nesses anos de união.

Ao grande amigo, André Machado, que apesar de sua ausência no momento, foi um grande colaborador e participou ativamente antes e durante a produção deste trabalho.

Ao meu Co-Orientador, Edésio, pelas dicas e auxílio oferecidos a mim durante as séries de tentativas e erros na confecção dos protocolos.

Aos colaboradores deste trabalho: Afonso Celso Bainy (UFSC), Ciro Alberto de Oliveira (UFPR), Juliano Zanette (UFSC), Inês Rabitto (UFPR), que me auxiliaram em novas empreitadas, originando este trabalho.

Aos homens de campo: Pedro, Willian, André, Sr. Antônio, Sr. Noel e Ivanilton, que foram bravamente reconhecidos como Doutores na arte de pescar traíra, o meu muito obrigado.

Aos colegas de laboratório: Juliana, Priscila, Gabriela, Pedro, Rafaela, Cristiane, Giovana, Amanda, Diogo, que me auxiliaram em todas as etapas do trabalho.

À todos os alunos de graduação que passaram pelo laboratório nesses 4 anos, só tenho a agradecer pois ao explicar algo para vcs, eu acabei fortalecendo o meu conhecimento.

Aos profissionais do laboratório representados por Marcelinho, Edilma e Cristiano, que sempre estão a postos para salvar os alunos do LCA, das suas trapalhadas.

Aos meus colegas de curso: Lígia, Vanessa, Marcela, Gisele, Leidi, Claudinha, Elaine, Thiago (Pedrosinha), Bruno Esteves, Aline, Gustavo, Bruno Masi, Fred Lage, Bia, Fred T., Dani, Mateuzinho, Juninho.

À todos os professores que fazem parte do corpo docente do LCA, pelo acolhimento e esclarecimento dos meus questionamentos sobre Ecologia.

Ao revisor deste material, Prof. Carlão, pela sua contribuição no documento final.

À banca examinadora, que aceitou ao meu convite, de contribuir para o enriquecimento do meu trabalho.

À CAPES, pela bolsa de doutorado, à UENF pela infra-estrutura e apoio aos alunos de pós-graduação.

À Escola Técnica de Bom Jesus e a Fazenda Barra do Pomba, Itaocara, RJ, por ter cedidos gentilmente os exemplares do trabalho.

À Guilherme do projeto Piabanha, pela infra-estrutura de coleta das espécimes. E por fim, se alguém ficou de fora me perdoe e sinta-se agradecido, nada disso seria possível sem a colaboração de todos vcs.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO I.....	viii
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO II.....	ix
LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO III.....	x
LISTA DE TABELAS CAPÍTULO I.....	xi
LISTA DE TABELAS CAPÍTULO II.....	xii
LISTA DE TABELAS CAPÍTULO III.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1.0 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
1.1 MERCÚRIO.....	16
1.2 PEIXES COMO BIOINDICADORES.....	18
1.3 DISTRIBUIÇÃO E ACUMULAÇÃO DE Hg NO ORGANISMO.....	21
1.4 BIOMARCADORES.....	23
1.5 ENSAIOS LABORATORIAIS.....	26
2.0 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	27
CAPÍTULO 1 .....	29
Acute Intraperitoneal Mercury Chloride Contamination and Distribution in Liver, Muscle and Gill of a Neotropical Fish <i>Hoplias malabaricus</i> (BLOCK, 1794).....	29
CAPÍTULO 2.....	36
Respostas Antioxidantes e Bioacumulação de Mercúrio Orgânico e Inorgânico em Traíra ( <i>Hoplias malabaricus</i> – Block, 1794) após Administração Intraperitoneal Aguda.....	36
CAPÍTULO 3.....	75
Histological and Hematological Variables in <i>Hoplias malabaricus</i> After Acute Intraperitoneal Administration of Organic and Inorganic Mercury.....	75
3.0 DISCUSSÃO GERAL.....	99
4.0 CONCLUSÃO GERAL.....	102
5.0 RECOMENDAÇÕES.....	103

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
7.0 APÊNDICE.....	119
I. Artigo Publicado: Utilização de Biomarcadores em Peixes como Ferramenta para Avaliação de Contaminação Ambiental por Mercúrio (Hg).....	116
II. Localização dos açudes de coleta dos espécimes de traíras utilizada nos experimentos.....	134
III. Níveis de significância na acumulação de Hg pelos tecidos analisados de traíras tratadas com HgCl <sub>2</sub> e traíras controle, nos diferentes tempos.....	135

## LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO I

Figure 1. Average mercury concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) in fish muscle ( <i>Hoplias malabaricus</i> ) at different times of exposure (hours).....	32
Figure 2. Average mercury concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) in fish gill ( <i>Hoplias malabaricus</i> ) at different times of exposure (hours).....	32
Figure 3. Average mercury concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) in fish liver ( <i>Hoplias malabaricus</i> ) at different times of exposure (hours).....	32



## LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO II

Figura 1. Concentrações médias de mercúrio ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em fígados de <i>H. malabaricus</i> controle e tratados com $\text{HgCl}_2$ e MeHg, respectivamente, por até 96 horas.....	49
Figura 2. Concentrações médias de mercúrio ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em cérebros de <i>H. malabaricus</i> controle e tratados com $\text{HgCl}_2$ e MeHg, respectivamente, por até 96 horas.....	50
Figura 3. Concentrações médias de mercúrio ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em rins de <i>H. malabaricus</i> controle e tratados com $\text{HgCl}_2$ e MeHg, respectivamente, por até 96 horas.....	51
Figura 4. Concentrações médias de mercúrio ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em músculo de <i>H. malabaricus</i> controle e tratados com $\text{HgCl}_2$ e MeHg, respectivamente, por até 96 horas.....	52
Figura 5. Concentrações médias de mercúrio ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em brânquias de <i>H. malabaricus</i> controle e tratados com $\text{HgCl}_2$ e MeHg, respectivamente, por até 96 horas.....	53

### LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO III

Figure 1. Cross-section of liver of *Hoplias malabaricus* stained with hematoxilin/eosin: A (control), B (trated with HgCl<sub>2</sub>), C (controle), D (trated with HgCl<sub>2</sub>) e F (trated with MeHg), Scale bar= 100 µm. E (trated with MeHg) e f (trated with MeHg), Scale bar= 20 µm.....83

Figure 2. Summary of liver damages after MeHg e HgCl<sub>2</sub> exposure and control showing the incidence of melano-macrophage center (MMCs/mm<sup>2</sup>)..... 84

Figure 3. Cross-section of kidney of *Hoplias malabaricus* stained with hematoxilin/eosin: A (control), B (trated with HgCl<sub>2</sub>) e D (trated with MeHg), Scale bar= 100 µm. C (trated with MeHg) e d (trated with MeHg).....85

Figure 4. Summary of kidney damages after MeHg e HgCl<sub>2</sub> exposure and control showing the incidence of melano-macrophage center (MMCs/mm<sup>2</sup>).... 86

## LISTA DE TABELAS CAPÍTULO I

Table 1. Number of muscle (M), gill (G) and liver (L) samples analyzed in each time exposure experiments with the average weight and standard length (with standard deviation) of the used <i>Hoplias malabaricus</i> specimens.....	31
Table 2. Average mercury concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) in muscle, gill and liver of <i>Hoplias malabaricus</i> in all the studied exposure times.....	31

## LISTA DE TABELAS CAPÍTULO II

Tabela 1. Número amostral de fígados de <i>H. malabaricus</i> analisados, tratados com mercúrio orgânico e inorgânico e indivíduos controle.....	45
Tabela 2. Número amostral de tecidos de <i>H. malabaricus</i> tratados com mercúrio orgânico e inorgânico e indivíduos controle utilizados nas análises químicas.....	46
Tabela 3. Acumulação de Hg nos diferentes tecidos de <i>H. malabaricus</i> tratados com mercúrio orgânico e inorgânico e indivíduos controle.....	48
Tabela 4. Atividade das enzimas analisadas nos tecidos hepáticos de traíras controle e tratadas com mercúrio orgânico em diferentes tempos (horas).....	55
Tabela 5. Correlação das enzimas analisadas nos tecidos hepáticos de traíras tratadas com mercúrio orgânico.....	56
Tabela 6. Níveis totais das enzimas analisadas nos tecidos hepáticos de traíras controle e tratadas com mercúrio inorgânico em diferentes tempos (horas)...	57
Tabela 7. Correlação das enzimas analisadas nos tecidos hepáticos de traíra tratadas com mercúrio inorgânico.....	58

### LISTA DE TABELAS CAPÍTULO III

Table 1. Number of kidney, gill and liver samples analyzed in each time exposure experiments of the used <i>Hoplias malabaricus</i> specimens.....	80
Table 2. Number of samples analyzed in each time exposure experiments of the used <i>Hoplias malabaricus</i> specimens.....	80
Table 3. Blood pattern analyzed in each time exposure methylmercury experiments of the used <i>H. malabaricus</i> specimens.....	81
Table 4. Blood pattern analyzed in each time exposure mercury chloride experiments of the used <i>H. malabaricus</i> specimens.....	82
Table 5. Injuries observed in the liver of “traíras” treated and control .....	84
Table 6. Injuries observed in the kidney of “traíras” treated and control.....	86

## RESUMO

O ambiente aquático está exposto a processos de poluição causados pela variedade e quantidade de metais que ingressam nele. Entre estes metais destaca-se o Hg (mercúrio) que é classificado como elemento ultra-traço, ou seja, presentes no ambiente em quantidades ínfimas, desta forma suas funções biológicas no corpo do animal, assim como seus mecanismos regulatórios não são bem entendidos. As fontes antropogênicas de mercúrio incluem indústrias de cloro-alcálí, garimpagem de ouro, equipamentos elétricos, tintas, fungicidas e produtos utilizados por dentistas. O mercúrio possui uma variedade de estados físicos e químicos (elemental/inorgânico/orgânico). Com propriedades tóxicas intrínsecas a cada um destes. Para a melhor compreensão dos efeitos do mercúrio no estudo de Monitoramento Biológico, que está baseado na determinação do metal ou do seu metabólito no meio biológico, torna-se essencial o conhecimento de como a substância é absorvida pelas diferentes vias; posteriormente, de como é distribuída para os diferentes compartimentos do organismo e, finalmente, de como é eliminada. Além de ser necessário saber também se a substância se acumula ou não no organismo. Para isso, foram realizados ensaios agudos laboratoriais através da injeção intraperitoneal de cloreto de mercúrio (forma inorgânica) e metilmercúrio (forma orgânica) em peixes carnívoro da espécie *Hoplias malabaricus* conhecido comumente por traíra. Além do conhecimento toxicocinético, foram avaliadas as respostas bioquímicas, histológicas e hematológicas dos peixes tratados com a forma orgânica e inorgânica de mercúrio. A ordem de acumulação do Hg nos diferentes tecidos analisados variou com a forma química do mercúrio ao qual o animal foi submetido. Inibição enzimática da SOD foi observada em peixes tratados com ambas as formas químicas do mercúrio, porém a GR foi inibida apenas em peixes tratados com cloreto de mercúrio. As respostas histopatológicas renais e hepáticas permitiram diferenciar os animais contaminados por mercúrio orgânico e inorgânico dos animais controle. A incidência de necroses e centros de melanomacrófagos, principalmente nos rins, de peixes contaminados por mercúrio (orgânico e inorgânico) aponta para o comprometimento deste tecido. Reduções significativas (PCV, após 72 horas, de Hg, após 48 horas, de WBC, após 48 e 72 horas e dos linfócitos, após 24 e 72 horas) em alguns parâmetros sanguíneos nos indivíduos tratados com MeHg foram observadas. Em indivíduos tratados com HgCl<sub>2</sub> apenas o WBC, após 72 horas, variaram significativamente. Estes resultados reforçam a bibliografia que determina a forma química deste metal como a responsável pelos diferentes efeitos tóxicos observados.

## ABSTRACT

The aquatic environment is exposed to cases of pollution caused by variety and quantity of metals that enter it. Among these metals the mercury (Hg) is classified as ultra-trace element, or in the environment in minimal quantities, so their biological functions in the animals, as well as their regulatory mechanisms are not well understood. The anthropogenic sources of mercury include chlor-alkali industries, gold mining of gold, electrical equipment, paints, fungicides and dentists. Mercury has a range of physical and chemical (elemental / inorganic / organic). With toxic properties intrinsic to each of these. The best understanding the effects of mercury in the study of Biological Monitoring, which is based on the determination of the chemical or its metabolite in biological environment, is essential the knowledge the path of absorption by different routes, subsequent, as distributed in different compartments of the organism, as biotransformed and, finally, as eliminated. Moreover, it is necessary to know the substance accumulates in organism or not. For this reason, acute laboratory tests were performed by intraperitoneal injection of mercury chloride (HgCl<sub>2</sub>) and methylmercury (MeHg) in the carnivorous fish *Hoplias malabaricus* "Traira". In addition to toxicokinetics knowledge, the responses were evaluated biochemical, histological and hematological fish treated with the organic and inorganic form of mercury. It was observed that the different chemical forms of mercury measured in this study showed pattern of accumulation and distribution among different tissues of fish examined. Inhibition of the enzyme SOD (superoxide dismutase) was observed in fish treated with both chemical forms of mercury, but the GR (glutathion reductase) was inhibited only in fish treated with mercury chloride. Responses histopathological kidney and liver have clearly differentiated animals contaminated by organic and inorganic mercury in control animals. The incidence of necrosis and melano-macrophages centers, mainly in the kidneys of fish contaminated with mercury (organic or inorganic) points to the involvement of this tissue. Significant reduction (haematocrit after 72 hours of Hg after 48 hours of white cells after 48 and 72 hours and lymphocytes, after 24 and 72 hours) in some blood parameters in individuals treated with MeHg was observed. In subjects treated with HgCl<sub>2</sub> only the white cells, after 72 hours, varied significantly. These results reinforce the literature to determine the chemical form of metal as responsible for various toxic effects observed.

## 1.0 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O crescimento populacional verificado nas últimas décadas, acoplado ao avanço tecnológico e ao aumento na geração de produtos industriais, inclusive a manufatura de produtos químicos como fertilizantes, inseticidas e herbicidas, tem levado a economia global a uma expansão de contaminantes orgânicos e inorgânicos no ecossistema aquático. Tal fato vem contribuindo para a redução da qualidade dos compartimentos ambientais, bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas (Cajaraville *et al.*, 2000).

A Sociedade de Química demonstrou que há cerca de 10 milhões de metais mencionadas na literatura científica. Estima-se que cerca de 70 mil são de uso cotidiano, sendo que de 1000 a 2 000 novas substâncias são adicionadas a essa lista anualmente. Tendo em vista as dificuldades de estudos, apenas duas mil dessas substâncias têm seus efeitos tóxicos conhecidos, o que aumenta a dificuldade de resoluções de problemas em casos de acidentes ambientais (Mozeto & Zagatto, 2006).

No ecossistema aquático o nível de contaminação dos organismos vivos, independentemente do seu nível de complexidade biológica, sua posição nas cadeias alimentares, estreitamente dependerá da biodisponibilidade do contaminante presente no biótopo (Cairns Jr, & Van Der Schalie, 1990).

A biodisponibilidade e toxicidade do metal é fortemente ligada aos efeitos diretos e indiretos dos fatores bióticos e abióticos que determinam a reação de especiação química (complexação com diferentes ligantes inorgânicos e orgânicos dissolvidos e em fases de partículas) e o regime de exposição (Boening *et al.*, 2000).

Acessibilidade às barreiras biológicas, que separam os organismos de seu meio envolvente, membranas celulares epiteliais e estruturas biológicas como, brânquias, pele e tegumento, controlam a entrada e os processos de absorção que dependem diretamente da biodisponibilidade do contaminante.

### 1.2 Mercúrio

O mercúrio é considerado um poluente de alto risco, sendo regulado pela USEPA (United States Environmental Protection Agency). No Brasil, a Portaria 685, de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fixa os “níveis



máximos de contaminantes químicos em alimentos”, registrando para o mercúrio os valores de 0,5 mg/kg (0,5 ppm) para peixes e produtos da pesca (exceto predadores) e 1,0 mg/kg (1 ppm) para peixes predadores ([www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685\\_98.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685_98.htm)).

O conhecimento da concentração, transporte e interação do mercúrio no ambiente é necessário para prever o impacto potencial sobre os seres humanos, bem como avaliar a qualidade de vida. Além disso, este metal tem sido detectado em regiões que não apresentam fonte antrópica de contaminação (Bisinoti & Jardim, 2004).

O mercúrio encontra-se amplamente distribuído nos diversos compartimentos na natureza, porém em baixas concentrações. A conversão entre as diferentes formas é à base da distribuição do mercúrio em ciclos locais e globais e de seu enriquecimento biológico. Sejam quais forem os processos que regulam estes ciclos, o mercúrio aportado pode apresentar-se como inorgânico e/ou orgânico. Na forma inorgânica pode ser encontrado sob três diferentes estados de oxidação: o Hg elementar ( $\text{Hg}^0$ ), principalmente na forma de gás, o íon mercurioso ( $\text{Hg}^{2+}_2$ ), forma pouco estável em sistemas naturais, e o íon mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ). Na forma orgânica, o íon mercúrico apresenta-se ligado covalentemente a um radical orgânico, sendo o metilmercúrico ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) e o dimetilmercúrico ( $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ) os mais comuns (Jardim, 1988). O metilmercúrio é a forma tóxica mais relevante das espécies de Hg; não está presente em emissões atmosféricas e só pode ser produzido por atividade bacteriana através do  $\text{Hg}^{2+}$  (Kutter, 2006). Nota-se também que formas de mercúrio, orgânicas e inorgânicas, podem ter diferentes padrões de acumulação nos órgãos internos dos peixes (Leaner & Mason, 2001)

No meio ambiente, a exposição dos organismos ao mercúrio não se dá apenas através da água, mas também pode resultar da transferência materna e da cadeia alimentar (Phillips *et al.*, 1980; Driscoll *et al.*, 1994). Além disso, sempre que um organismo contaminado ocupa um nível inferior em uma cadeia trófica, seu predador absorverá aquele mercúrio orgânico, mas revelará concentrações comparativamente aumentadas (biomagnificação) (Cabana *et al.*, 1994).

O mercúrio inorgânico, ao sofrer o processo de alquilação (formação do metil ou do dimetilmercúrio, por processos biológicos ou químicos) ganha lipossolubilidade, condição indispensável para o fácil transporte através de membranas celulares, e, assim, pode se depositar nos tecidos de um organismo

(processo conhecido como bioacumulação). As espécies inorgânicas do metal (excluindo-se o mercúrio elementar) e o metilmercúrio têm capacidade de reagir com ligantes intracelulares, o que pode explicar o alto grau de acumulação desses compostos (WHO, 1989). Mais de 90% do mercúrio retido em peixes está sob a forma de metilmercúrio, o que gera altos valores de FBC (Fator de bioconcentração) (Azevedo, 2003).

Estudos que investigam a contaminação por Hg nos diferentes sistemas da biosfera são de grande interesse, existindo um amplo número de trabalhos que abordam esse tema. Tem-se conhecimento da contaminação por Hg em solos (Mailman & Bodaly, 2005; Jesus *et al.*, 2007), na água (Altindag & Yigit, 2005; Primo *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2003) nos componentes atmosféricos (Munthe *et al.*, 2003; Pirrone *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2004), em diversos organismos como vegetais: macroalgas (Coelho *et al.*, 2005); e animais, como pássaros (Saeki *et al.*, 2000), peixes (Dusek *et al.*, 2005; Storelli *et al.*, 2005; Mol *et al.*, 2001), crustáceos (Hui *et al.*, 2005; Burger *et al.*, 2002) e mamíferos, incluindo a espécie humana (Legrand *et al.*, 2005; Agusa *et al.*, 2005; Gonçalves & Gonçalves, 2004)

Para a melhor compreensão dos efeitos do mercúrio no estudo de monitoramento biológico, que está baseado na determinação da metal ou do seu metabólito no meio biológico, torna-se essencial o conhecimento de como a metal é absorvida pelas diferentes vias; de como é distribuída para os diferentes tecidos do organismo; de como é metabolizada; e, finalmente, de como é eliminada. Além de ser necessário saber também se a substância se acumula ou não no organismo (Lauwerys & Bernard 1986; Rudiger, 1999).

### 1.3 Peixes como bioindicadores

De um modo geral, a ictiofauna constitui um grupo muito sensível as modificações do ambiente em que vivem, por serem fisiologicamente mais complexos se comparados com a maioria dos outros organismos aquáticos. Esta característica os credencia como excelentes indicadores da disponibilidade do Hg presente no meio ambiente, em comparação com outros organismos como algas, moluscos e crustáceos. (Ferreira, 2004).

Por várias razões, as espécies de peixes têm atraído considerável interesse em estudos biológicos e avaliação das respostas bioquímicas aos contaminantes ambientais (Powers, 1989). Para a avaliação da qualidade dos ecossistemas

aquáticos, alguns critérios são válidos para inúmeras espécies de peixes. Peixes podem ser encontrados praticamente em todo o ecossistema aquático e desempenham um importante papel ecológico na cadeia alimentar aquática, devido à sua função como um transportador de energia a partir de níveis tróficos mais baixos para os mais elevados (Beyer, 1996).

O uso de organismos aquáticos como indicadores de dose de Hg à qual está sendo exposta uma dada população humana vem sendo utilizado em várias partes do mundo. No nordeste do Brasil, (Lacerda *et al.*, 2000; Vaisman, *et al.* 2005; Costa, 2007), em rios da Amazônia (Bastos *et al.*, 2005), na Baía de Sepetiba, SE do Brasil (Marins *et al.*, 1998), no Sul (Niencheski *et al.*, 2001) e no Litoral do Maranhão (Carvalho *et al.*, 2000).

Ao ingerir alimentos contaminados com mercúrio, pode-se ter problemas de ordem neurológica, pois o composto MeHg apresenta uma afinidade ao sistema nervoso central e suas estruturas mais evoluídas, tal como o córtex cerebral, causando problemas como distúrbios visuais, ataxia, perda de audição, deterioração mental, tremor muscular, hipertensão, distúrbios metabólicos e em casos de exposição grave, paralisia e morte. O composto ao ser ingerido por mulheres grávidas pode ocasionar problemas no feto, pois o MeHg tem a propriedade de ultrapassar a barreira da placenta e a hematoencefálica, ocasionando desta forma os mesmos efeitos antes mencionados no feto (WHO, 1991; UNEP, 2002). Os peixes coletados em mercados e centros de comercialização, também têm sido usados como forma direta de estimativa do grau de exposição da população consumidora (Morales-Aizpurúa *et al.*, 1999; Maurice-Bourgoin *et al.*, 2000; Burger & Gochfeld, 2006).

A compreensão dos efeitos tóxicos da absorção, comportamento e respostas no peixe, por conseguinte, pode ter uma alta relevância ecológica. Os critérios para utilização de um biomarcador no monitoramento ambiental são perfeitamente aceitáveis para os peixes (Stegeman *et al.*, 1992). Entre diferentes espécies de peixes, no entanto, uma variação considerável nas funções fisiológicas básicas e a capacidade de resposta aos biomarcadores ambientais no sentido de determinar a poluição, podem tornar-se evidente.

Os peixes representam a principal via de exposição dos seres humanos ao MeHg (WHO, 1991). A maior parte dos casos de intoxicação por mercúrio relatados em alguns estudos (Paradis *et al.*, 1997; Boischio & Henshel, 2000 e Santos *et al.*,

2002) são resultantes de peixes para o consumo, são devido ao metilmercúrio, porque após a entrada do mercúrio no sistema aquático, este pode facilmente ser metilado por processos biológicos já explicado anteriormente. Acidentes como o Mal de Minamata, ocorrido em 1956, foi devido ao consumo de peixes, moluscos e camarões da Baía de Minamata (Japão) que estava contaminada por mercúrio provenientes de uma indústria de cloro-álcali (Allen, 1994).

Em estudos que avaliam a presença de Hg em diversos tipos de peixes, em ambiente contaminado, observou-se que o metal se concentrava mais intensamente na medida em que as espécies ocupavam posições superiores na cadeia trófica: os peixes herbívoros apresentavam  $6,64 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ; os peixes que se alimentavam de invertebrados,  $12,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ; os onívoros,  $26,6 \text{ mg kg}^{-1}$ , e os piscívoros,  $40,2 \text{ mg kg}^{-1}$  (WHO, 1989; Boening, 2000).

A espécie utilizada nesse estudo, *Hoplias malabaricus* (Block, 1794), conhecida comumente como traíra (Figura 1), pertencente à Família Erythrinidae, é um peixe de água doce com ampla distribuição no Sul da América. Ela é considerada um bom modelo para estudo de contaminantes por via trófica, devido ao seu comportamento, fácil adaptação a condições experimentais, e a sua posição na cadeia alimentar (Costa *et al.*, 2007).

Durante a fase larval é planctófago; os alevinos, cujo comprimento varia de 50 mm até 100 mm, são principalmente insetívoros e muito vorazes, suportando menores períodos de jejum. Na fase juvenil, quando atingem em torno dos 140 mm de comprimento total, são também ictiófagos, sendo que até este comprimento ingerem grãos de areia e pedras, sugerindo que se alimentam à custa de organismos bentônicos. Na fase adulta, a partir de 200 mm de comprimento padrão, *H. malabaricus* é um peixe predominantemente ictiófago (Paiva, 1974; Bistoni *et al.*, 1995, Gomes, 2007).

É um peixe sedentário, e em decorrência desses hábitos sedentários, sua frequência alimentar é bastante variável, podendo apresentar grande resistência aos períodos de jejum, independentemente de estarem em fase reprodutiva (ao contrário da maioria dos peixes). Desenvolve seu ciclo de vida inteiro dentro de uma área geográfica relativamente pequena, com uma resistência privilegiada é capaz de afrontar variações climáticas e resistir a ambientes pouco oxigenados (Fernandes *et al.*, 1993), além de apresentarem grande período ( $\pm 240$  dias) com privação de alimento (Rios *et al.*, 2005).



Figura 1. *Hoplias malabaricus* (Block, 1794), espécie utilizada no presente estudo ([www.pescabrasil.com.br/especies/traira.gif](http://www.pescabrasil.com.br/especies/traira.gif)).

A espécie tem como características corpo cilíndrico, dentição bem desenvolvida, e hábito alimentar carnívoro, sendo considerada topo de cadeia. Daí a sua importância em estudos de contaminação ambiental, pois através do processo de biomagnificação há um acúmulo de mercúrio em seus tecidos. Esta espécie já é utilizada em outros ensaios laboratoriais com eficiência (Mela *et al.*, 2007, Rabitto *et al.*, 2004; Tanann *et al.*, 2006).

#### 1.4 Distribuição e acumulação de Hg no organismo

A distribuição de Hg nos órgãos dos peixes resulta da ação e interação entre três fatores ecotoxicológicos: (i) condição de exposição, a importância da rota de entrada (água/ingestão da presa) e formas químicas do metal (mercúrio inorgânico, Hg(II)/MeHg); (ii) características físico-químicas de biótopos (água e compartimento do sedimento), que afetam a especiação química do mercúrio, bioacumulação e também funções fisiológicas e bioquímicas do organismo; (iii) propriedades estruturais e funcionais dos órgãos dos peixes, que a depender das suas barreiras biológicas o mecanismo de excreção/depuração do peixe será afetado (Régine *et al.*, 2006).

A parede intestinal do peixe é uma barreira eficaz à absorção de cloreto de mercúrio, mercúrio inorgânico, porém é facilmente permeável ao MeHg, forma orgânica, que é acumulada principalmente no tecido muscular. Esta acumulação pode chegar a cerca de 50% da dose ingerida (WHO, 1989). A barreira cerebral, em peixes, é mais resistente para metilmercúrio (Wobeser 1975a; Wester & Canton

1992), que pode ser atribuído à capacidade regenerativa do tecido neural de peixes teleósteos ao contrário dos mamíferos (Zupanc & Ott, 1999).

O  $\text{Hg}^0$ , mercúrio metálico é solúvel em lipídios, o que lhe permite atravessar membranas celulares. Uma vez dentro da célula, o mercúrio metálico pode ser oxidado a mercúrio inorgânico. A sua absorção no intestino é mínima assim como a absorção por via cutânea, pois formam grandes moléculas que dificultam sua absorção por este órgão (Hammond & Beliles, 1980). O vapor de mercúrio se oxida rapidamente a  $\text{Hg}^{2+}$  nos eritrócitos e depois se difunde pelos tecidos (com maior afinidade pelo cérebro), por ação da catalase que decompõe o peróxido de hidrogênio (via primária da oxidação do vapor de mercúrio nos eritrócitos e demais tecidos), porém pode permanecer como  $\text{Hg}^0$  no sangue durante um tempo curto mas suficiente para atravessar a barreira hematoencefálica. A passagem através das membranas celulares é facilitada por sua maior lipossolubilidade e pela ausência de cargas elétricas (Español, 2001).

No caso do  $\text{Hg}^{2+}$ , a exposição pode ocorrer por oxidação do  $\text{Hg}^0$ , desmetilação do MeHg ou diretamente ao  $\text{HgCl}_2$ . Uma vez no sangue, o mercúrio inorgânico tem distribuição igual entre células e plasma. No plasma ele se une a albumina. Esta forma química de mercúrio é menos difundida pelas membranas celulares que o mercúrio metálico e tende a ter uma afinidade por camadas epiteliais, incluindo as brânquias e rim (Ribeiro *et al.*, 2000) e baixa afinidade pelo cérebro (Friberg, 1956; Lorenzon *et al.*, 1984). Sua presença em órgãos específicos dos organismos induz a síntese de proteínas chamadas de metalotioneínas, que formam complexos com o  $\text{H}^+$ , dificultando sua ação tóxica (Español, 2001).

Os compostos orgânicos, como o MeHg (metilmercúrio) são altamente solúveis em lipídios, possibilitando alta difusão deste metal através das membranas celulares. Cerca de 90% desta forma orgânica de mercúrio é transportado pelas células vermelhas do sangue. Uma vez dentro da célula, o MeHg é lentamente metabolizado em  $\text{Hg}^{2+}$  (Español, 2001). É amplamente distribuído em concentrações elevadas sendo relatados em brânquias, fígado, rim, baço, sangue e cérebro (McKim *et al.*, 1976).

O Hg, uma vez absorvido pelo peixe, é transportado pelo sangue até um tecido de acumulação, como o fígado, onde também ocorre acumulação ou transformação (Penteado & Vaz, 2001). Se ocorrer transformação pelo fígado, pode

ser excretado pela bile, ou pode voltar para o sangue para possível excreção pelos rins ou, por fim, armazenado no tecido adiposo.

## 1.5 Biomarcadores

Os biomarcadores são comumente usados como indicadores bioquímicos, fisiológicos, e histológicos de exposição à xenobióticos ou de efeitos de contaminantes químicos (Huggett *et al.*, 1992). Leonzio & Fossi (1993) ampliaram a definição (e, conseqüentemente, o uso de biomarcadores) proposta pela *National Academy of Sciences*, definindo o que propuseram chamar de biomarcadores ecotoxicológicos, como variações bioquímicas, celulares, fisiológicas e/ou comportamentais que possam ser medidas em amostras de tecidos ou fluidos orgânicos, em organismos ou populações, que possam evidenciar exposição ou efeitos de um ou mais poluentes químicos ou radiações. Mais recentemente, Decaprio (1997) definiu biomarcador como um indicador biológico que evidencia efeito resultante de exposição a um estressor, que pode ser interpretado como, evento adaptativo não patogênico ou com séria alteração de um evento funcional, dependendo da toxicocinética e do mecanismo de ação do estressor.

Existem biomarcadores moleculares, celulares e ao nível do animal. As duas características mais importantes dos biomarcadores são: a) permitem identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos; b) possibilitam a mensuração de efeitos sub-letais. Esta última característica permite pôr em prática ação remediadora ou, melhor ainda, ações preventivas. Daí a importância e o interesse atual de incorporação da análise de biomarcadores em programas de avaliação da contaminação ambiental.

O mercúrio e seus compostos são ativos quimicamente e, dependendo da concentração atingida no tecido animal, pode desnaturar proteínas e inativar enzimas e alterar a atividade celular tanto pela indução de genes específicos como pela transmissão ou influência de sinais de controle da expressão gênica (Koropatnick & Zalups, 1997). Podem, ainda, modificar as membranas celulares com prejuízo de suas funções, causando a morte celular e a destruição de qualquer tecido com o qual entrem em contato.

Assim, a determinação de parâmetros biológicos selecionados, como histologia, bioquímica e fisiologia, que são conhecidos por variar em resposta aos

efeitos tóxicos dos compostos mercuriais, vêm sendo constantemente recomendadas para avaliar o estado de saúde ambiental de ecossistemas aquáticos.

A bioquímica toxicológica tem por objetivo a compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento do dano, com ou sem, morte celular, induzido por xenobióticos. Quando as células são expostas a um estímulo nocivo e sua capacidade de se adaptar ao mesmo tempo é ultrapassada, estabelece-se uma condição fisiologicamente alterada. A depender da severidade e da duração do estímulo as células danificadas podem progredir até um estágio chamado de “ponto de não retorno” (Marzella & Trump, 1991).

Alguns desses processos envolvem o estresse oxidativo celular, consequência da vida oxidativa, que ocorre quando a produção de moléculas pró-oxidantes (ERO) é maior que a velocidade de neutralização (Sies, 1991). ERO, ou melhor, radical livre pode ser definido como qualquer átomo ou molécula que possua elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo (Freeman & Crapo, 1982) como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ), podendo ser formado *in vivo* durante o metabolismo celular e, também, quando o organismo é exposto a uma série de estímulos como, radiação ionizante e biotransformação de xenobióticos (Comporti, 1989).

Para proteger as células da toxicidade gerada por radicais livres, o organismo possui um sistema antioxidante. As formas de defesa antioxidantes contra esses radicais incluem as formas enzimáticas e não-enzimáticas. As formas de defesa enzimáticas são: catalase (CAT), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase dependente de selênio (Se-GPx), glutathione peroxidase selênio independente (GPx), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) e a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (Hermes-Lima *et al.*, 1998; Zaccaron da Silva *et al.*, 2005). As formas não enzimáticas de defesa antioxidante incluem: glutathione reduzida (GSH), ácido ascórbico, ácido úrico, vitaminas C, E,  $\beta$  – caroteno, polifenóis e bilirrubinas (Zanette *et al.*, 2006).

Outros biomarcadores podem ser ainda destacados, pois permitem a obtenção de uma resposta global desses animais aos efeitos da contaminação. Entre eles estão os parâmetros hematológicos, neuromusculares, genotóxicos, reprodutivos, endócrinos, fisiohistopatológicos e morfológicos. Fatores de resistência ao estresse ambiental e a uma variedade de condições desfavoráveis como baixas temperaturas, condições oxidativas, anoxia e condições desfavoráveis de salinidade,



bem como resistência a altos níveis de poluentes como metais pesados, podem ser verificados em diversas espécies de peixes. Esta resistência é conferida por um grupo de proteínas que são induzidas nas condições citadas anteriormente (Stegeman *et al.*, 1992; Peakall & Walker, 1994).

Os parâmetros hematológicos são considerados indicadores fisiohistopatológicos do corpo inteiro e conseqüentemente é um importante diagnóstico do status estrutural e funcional do peixe exposto à substância tóxica (Adhikari *et al.*, 2004).

A ausência de estudos sobre a caracterização de células sanguíneas e outros valores hematológicos em diferentes espécies de peixes, provavelmente seja a maior barreira para se usar esta ferramenta na investigação do efeito de contaminantes em peixes (Mela, 2004), assim como a escassez de métodos padronizados, diferenças entre sexo e idade, qualidade da água e métodos de captura, podem ser variáveis que dificultam a interpretação dos dados. Por esta razão, é difícil comparar resultados com diferentes espécies e diferentes estudos (Klinger *et al.*, 1996).

O conhecimento dos constituintes sanguíneos é de fundamental importância na condição fisiológica e fisiopatológica dos animais, devido às variações nos parâmetros sanguíneos provenientes da indução por poluentes ou outros fatores ambientais (Ishikawa, *et al.*, 2007; Ranzani-Paiva, *et al.*, 1997). Parâmetros sanguíneos como: hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular, concentração de hemoglobina corpuscular podem em situações específicas ser usado como biomarcadores dos efeitos do tóxico em peixes (Van der Oost *et al.*, 2003).

Alterações hematológicas em peixes tratados com mercúrio foram observadas nas seguintes espécies: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Ishikawa *et al.*, 2007), *Hoplias malabaricus* (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2006), *Tilapia mossambica* (Peters, 1852) (Menezes & Quasim, 1984), *Channa punctatus* (Bloch, 1793) (Sastry & Sharma, 1980), *Cyenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844) (Shakoori *et al.*, 1994), *Oreochromis aureus* (Steindachner, 1864) (Allen, 1994). Desta forma, as mudanças hematológicas dos peixes podem ser considerados indicadores da contaminação de mercúrio no sistema aquático.

O exame histopatológico é reconhecido cada vez mais como uma ferramenta valiosa para a avaliação do campo do impacto de poluentes ambientais em peixes (Heath, 1995; Teh *et al.*, 1997). Lesões específicas que ocorrem nos órgãos de

peixes expostos às substâncias tóxicas sob condições de laboratório ajudam a identificar biomarcadores de exposição.

Muitos autores estudaram os efeitos histopatológicos do mercúrio nos peixes expostos ao mercúrio inorgânico e metil mercúrio na água em tecidos como fígado, rins, em brânquias e no epitélio olfatório (Filenko *et al.*, 1989; Skak & Baatrup, 1993; Handy & Penrice, 1993; Allen, 1994; Banerjee & Bhattacharya, 1994; Oliveira Ribeiro *et al.*, 1995, 1996; Oliveira Ribeiro & Torres, 1995; Jagoe *et al.*, 1996a; Samson & Shenker, 2000).

A exposição aos metais pode conseqüentemente causar as mudanças histológicas no fígado. De acordo com Hinton & Laurén (1990), o fígado é um órgão detoxificador essencial para o metabolismo e a excreção de substâncias tóxicas dentro do corpo. Bruslé *et al.*, (1996), afirmam que estudos com histologia de fígado de peixes poderiam servir como um modelo para estudar as interações entre fatores ambientais e estruturas hepáticas e suas funções. O efeito prejudicial da poluição do metal pesado na histologia do fígado de peixes pode, entretanto, depender da duração da exposição (crônica ou aguda) e nível de concentração do metal específico.

## 1.6 Ensaio Laboratoriais

Os experimentos laboratoriais e os estudos de campo são utilizados como ferramenta na avaliação da ação tóxica de contaminantes. Esta avaliação é também chamada de biomonitoramento. Os experimentos laboratoriais são utilizados para a obtenção de dados e padronização de metodologias e permitem prever e/ou avaliar efeitos de um contaminante químico, em determinada concentração ou dosagem, em determinada espécie. Em contrapartida, estudos no campo possibilitam o acompanhamento dos efeitos obtidos diretamente do local que está sendo analisado. Entretanto, apesar de serem gerados dados complementares, é importante esclarecer que estes dados obtidos em condições experimentais não podem ser intimamente relacionados com o ambiente natural.

Os ensaios laboratoriais cooperam no fornecimento de uma base de dados que venha a ajudar a entender os fatores que estão interferindo na saúde dos organismos e/ou alterando as condições do próprio ambiente, permitindo o estudo dos efeitos tóxicos de determinados contaminantes químicos de forma isolada ou

associados, minimizando a influência de diferentes variáveis ambientais. Dessa forma, tanto estudos de campo como as utilizações de bioensaios contribuem com importantes informações para os estudos em toxicologia ambiental, sendo ferramentas interessantes nos diagnósticos de áreas impactadas.

Em ensaios de laboratório, os métodos de exposição de peixes ao mercúrio são geralmente por via hídrica (quando o mercúrio se encontra dissolvidos na água) (Walczak *et al.*, 1986; Nepomuceno *et al.*, 1997; Rouleau *et al.*, 1999; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2005; Mela *et al.*, 2007), através de injeção intraperitoneal (Schultz *et al.*, 1996, 1997; Perottoni *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2007) com o mercúrio que está tendo sua toxicidade avaliada ou por via trófica (Skak & Baatrup, 1993; Boudou & Ribeyre, 1985; Oliveira Ribeiro *et al.*, 1999, 2006; Drevinick *et al.*, 2006) nos quais os animais pesquisados são alimentados com rações preparadas com uma forma química do mercúrio, ou ainda, são oferecidos aos animais pesquisados outros animais que fazem parte do seu cardápio alimentar, porém estes são tratados com quantidades conhecidas de mercúrio.

Desta forma, é importante esclarecer que o tipo e o tempo de tratamento a que o animal é submetido, além da concentração do contaminante químico devem constar nos dados gerados pelos ensaios laboratoriais.

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar a distribuição e acúmulo do metilmercúrio e cloreto de mercúrio em traíra (*Hoplias malabaricus*), após exposição aguda, via injeção intraperitoneal, visando conhecer os possíveis órgãos alvo e o potencial tóxico deste metal em fígados, brânquias, rins, cérebro e músculos das espécies tratadas e não tratadas com mercúrio, utilizando os biomarcadores como ferramenta de estudo.

## 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a ordem de acumulação do mercúrio total nos tecidos de exemplares de traíras, a partir da exposição aguda, via injeção intraperitoneal, à forma orgânica ( $\text{HgCl}_2$ ) e inorgânica (MeHg) do mercúrio.
- Elucidar alterações hematológicas significativas de células e componentes do sangue em exemplares de traíras, após exposição aguda via injeção intraperitoneal de  $\text{HgCl}_2$  e MeHg.
- Avaliar a existência de estresse oxidativo gerado pela exposição aguda, via injeção intraperitoneal, à  $\text{HgCl}_2$  e MeHg, no tecido hepático de traíras através da quantificação de enzimas antioxidantes.
- Qualificar e quantificar, através de análises histopatológicas, as possíveis lesões hepáticas, branquiais e renais nas traíras, ocasionadas da exposição aguda, via injeção intraperitoneal, à forma orgânica ( $\text{HgCl}_2$ ) e inorgânica (MeHg) do mercúrio, utilizando a técnica da microscopia de luz.

## CAPÍTULO I.

Acute Intraperitoneal Mercury Chloride Contamination and Distribution in Liver, Muscle and Gill of a Neotropical Fish *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794).

Revista: Brazilian Archives Biology Technology  
Submetido em: 28/11/2008

# Acute Intraperitoneal Mercury Chloride Contamination and Distribution in Liver, Muscle and Gill of a Neotropical Fish *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794).

Taise Bomfim de Jesus <sup>1\*</sup>, Priscila Gontijo Aguiar de Almeida <sup>1</sup>, Cristiane dos Santos Vergílio<sup>1</sup>, André Luiz dos Santos Machado<sup>1</sup> e Carlos Eduardo Veiga de Carvalho<sup>1</sup>

*1-Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Ciências Ambientais, Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes-RJ, 28015-602, Brasil. Tel/fax: 55- 22- 27261472. [taisebj@hotmail.com](mailto:taisebj@hotmail.com)*

**ABSTRACT-** *The present study deals with the distribution of mercuric chloride in muscle, liver and gills of Hoplias malabaricus contaminated through intraperitoneal injection for a period of 24, 48, 72 and 96 hours was investigated. The liver, gill and muscle were analyzed for mercury content by an ICP/AES (Varian Liberty II) with vapor generating accessory (VGA 77). Both studied tissues presented the same contamination pattern, increasing concentrations in 12 and 24 hours of exposure with a decrease in Hg concentration with 72 hours and a new increase in Hg concentrations with 96 hours of exposure. The Hg concentrations in contaminated organisms were always higher than the control although only for liver samples the difference was statistically significant. Liver samples always presented higher Hg contents when compared with gill and muscle samples.*

**KEY WORDS:** *Inorganic mercury, liver, acute effects, intraperitoneal contamination*

## INTRODUCTION

Aquatic carnivores located at the top of the food web represent an important pathway between mercury pollution and human health due to the capacity of these organisms to concentrate and biomagnificate Hg in its tissues and the high consumption of this species by human populations (Pfeiffer *et al.*, 1989, 1991; Malm *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 2002).

Investigations on uptake and accumulation of xenobiotics, including heavy metals, are essential in helping to understand the effects these chemicals have on specific organ/tissue systems in fish (Heath, 1995). The experimental studies in laboratory using monospecific models allows the use of lower biological levels of organization and can monitor a large number of parameters, providing a better understanding of ecotoxicological mechanisms (Boudou & Ribeyre, 1997).

Metal distribution studies in fishes after water exposure or oral dosing are less accurate due to the metal concentration is not entirely absorbed by the organism, but part of it is externally adsorbed to the gills or intestinal lumen, which may be more

rapidly eliminated than the excretion of an absorbed dose (Glynn, 1991). Therefore, the biological half-life calculations after water or oral dosing are probably biased downward because a significant portion of the eliminated metal is probably not internally absorbed. Consequently, intravascular injection is a more accurate method to characterize the persistence of these compounds in fishes, and also to improve the understanding of mercury distribution inside the organism (Schultz *et al.*, 1996).

Although in the literature studies have already described mercury distribution, speciation and its effects in temperate fish species, data on tropical species as well as its toxic effects are scarce (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002).

The present study objectives are to determinate mercury (HgCl<sub>2</sub>) concentrations and distribution along muscular, gill and hepatic tissues of *Hoplias malabaricus*, after acute exposition through intraperitoneal injection in 24, 48, 72 and 96 hours.

## MATERIALS E METHODS

*Hoplias malabaricus* specimens were collected, between July and October 2006, in lakes located at

Itaocara municipality, northwest of Rio de Janeiro State (21°40'44''S e 42° 04' 53'' W). The lakes are located within a forested area with very little influence of anthropogenic and point sources of pollutants, no agricultural activities were placed in the surroundings and in the lake catchment.

After the sampling the specimens were transported to the lab in plastic bags. In the lab the wounded and sick specimens were discarded in order to use only health specimens in the experiment. The organisms then were placed in aquariums with continuous water flux for seven days in order to acclimatize them. Table 1 present the number, the average weight and standard length (with the standard deviation) of the specimens used in the experiment in each of the exposure times.

**Table 1.** Number of muscle (M), gill (G) and liver (L) samples analyzed in each time exposure experiments with the average weight and standard length (with standard deviation) of the used *Hoplias malabaricus* specimens.

Time(h)	M	L	G	Weight(g)	Length(cm)
24	8	8	8	99 ± 34	21 ± 2,3
48	8	6	8	93 ± 17	21 ± 1,4
72	8	6	7	87 ± 23	20 ± 1,8
96	8	4	4	116 ± 11	23 ± 2,1

The mercury chloride solution was prepared diluting 0,015g of HgCl<sub>2</sub> in 0.5 mL of 4 N HCl and completed to 250 mL with PBS (*Phosphate Buffer Solution*). This solution was used in the acute intraperitoneal contamination experiment. The concentration used was established according with a previous study developed with trophic contamination with the same fish species (Ribeiro *et al.*, 2006).

The volume of mercury chloride solution that was injected in to the peritoneal cavity of the studied fishes was 0.1mL with 6 µg of Hg. After the injection of the Hg solution the fishes were placed in the aquariums and in the intervals of 24, 48, 72 and 96 hours the specimens were measured, weighted and necropsy in order to remove liver, muscular and gill tissue samples. During all time intervals control samples were also collected from fishes that received an injection of 0.1 mL containing only PBS.

Aliquots of approximately 1,000g (w.w.) of liver, gills and muscle samples were submitted to strong acid digestion in triplicate following a modified version of the methodology described by Bastos *et al.*, (1998). All Hg determinations were done in a Varian ICP-AES (model Liberty II) with cold

vapor generating accessory (VGA 77). In order to verify possible contamination of the extracts chemical blanks were prepared and analyzed for each group of 10 samples.

The precision of the methodology was tested through the analysis of certified reference material – DORM 1 – supplied by the “Marine Analytical Chemical Standards Programs”, Canada. The recovery of the certified value was 98.92%.

In order to verify the differences among the Hg concentrations in the distinct tissues along all the exposure times an ANOVA (Main effects), with significance level of 95% (p < 0.05) was used. A Student T Test was also used to compare the Hg concentrations among the contaminated studied tissues. The statistical software used was Statistic for Windows version 6.

## RESULTS AND DISCUSSION

The average Hg concentration measured in liver was always higher (744 µg.kg<sup>-1</sup>) than the concentrations measured in gills (339 µg.kg<sup>-1</sup>) and muscle (68 µg.kg<sup>-1</sup>), and a significant difference (p = 2.2 x 10<sup>-5</sup>) was observed between the studied tissues. Similar results were obtained by Skak & Baatrup (1993), working with trout contaminated with mercury chloride in its diet, with higher Hg concentrations in kidney, followed by lower levels in liver and muscle. The higher concentration of total Hg observed in liver and gill when compared with muscle is probably due to the fact that muscle could act as a storage site of Hg, and, therefore, not expressing recent contamination. On the other hand, liver as the main pathway after intestinal absorption presents Hg concentrations that probably reflects recent contamination (Foster *et al.*, 2000) (Table 2).

**Table 2.** Average mercury concentrations (µg.kg<sup>-1</sup>) in muscle, gill and liver of *Hoplias malabaricus* in all the studied exposure times.

E.T.*	Liver	Gill	Muscle
Control	127±24	54±13	57±5
24	370±156	276 ± 108	58±6.4
48	714±248	267 ± 27	90±13.9
72	633±235	284 ± 78	57±13.4
96	1260±753	529 ± 273	68±12.0
Average**	744±379	339 ± 126	68±15.3

\*Exposure time in hours; \*\* Average calculated without the control concentrations.

Concerning the Hg concentration in muscle of the organisms injected with the Hg solution, initially Hg concentrations increased in the first 48 hours of contamination (58 µg.kg<sup>-1</sup> and 90 µg.kg<sup>-1</sup>).

After 72 hours a decrease in Hg concentrations in this tissue was observed ( $53.3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and in the 96 hours of exposure another increase in Hg concentrations was again observed ( $68.8 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (Fig 1).

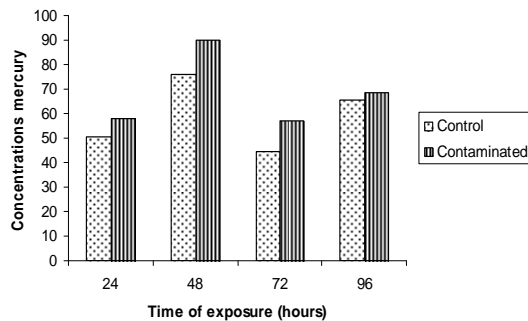


Figure 1. Average mercury concentrations ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) in fish muscle (*Hoplias malabaricus*) at different times of exposure (hours).

No significant difference was observed ( $p=0.56$ ) when Hg concentrations from contaminated and control muscle samples were compared. This observation is probably related with the fact that muscular tissue functions as a storage area, therefore its concentrations not only reflects the recent contamination but also past ones.

The Hg concentration results in gills (Figure 2) showed a more homogeneous pattern of Hg in the control samples (the average was  $54.4 \pm 13.7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) as well as in the first three periods of exposure (24, 48 and 72 hours) (the average was  $276 \pm 8.4$ ). After 96 hours of exposure the gills showed Hg concentrations 3 times higher than the previous time of exposure and 10 times higher when compared to average concentrations of the control. When comparing the gills Hg concentration of the contaminated specimens among the distinct exposure times a significant difference ( $p=0.004293$ ) was observed. A significant difference was also observed when Hg concentrations in the control and contaminated samples were compared ( $p = 5.79 \times 10^{-7}$ ).

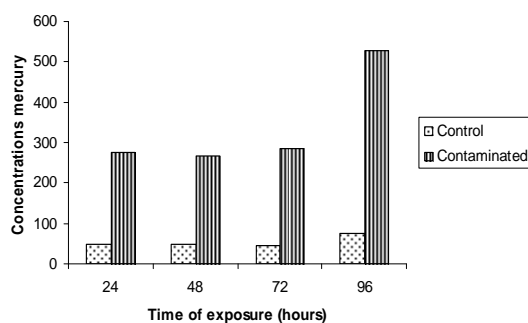


Figure 2. Average mercury concentrations ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) in fish gill (*Hoplias malabaricus*) at different times of exposure (hours).

Mercury distribution in liver of contaminated specimens follows the same pattern described for muscle, although the observed concentrations were higher. Therefore an increase of Hg concentrations until 48 hours after the contamination was observed ( $370 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  in 24 hours;  $714 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  in 48 hours) with a decrease in concentrations after 72 hours of exposure ( $633 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and a second increase in Hg concentrations after 96 hours of exposition time ( $1,260 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , Figure 3). A significant difference was observed when the concentrations of Hg in liver samples of contaminated samples were compared with the control ( $p= 2.7 \times 10^{-5}$ ).

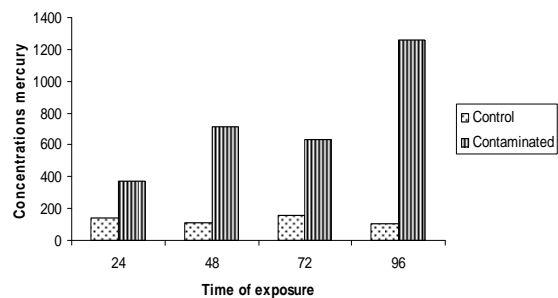


Figure 3. Average mercury concentrations ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) in fish liver (*Hoplias malabaricus*) at different times of exposure (hours).

The high affinity of Mercury with liver is probably due to the high blood flux during low activity period that drives the Hg towards this organ, increasing the mercury concentrations. On the other hand the muscular tissue did not present affinity with inorganic mercury form, although this tissue is the main storage site of the organic mercury forms (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 1996; Olson *et al.*, 1978; WHO, 1990).

The average Hg observed concentration in liver and muscle of the studied fishes differed significantly ( $p = 2.2 \times 10^{-5}$ ). The average values were found in  $744 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  and  $68 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectively (Table 2).

The average Hg concentrations obtained in the present study in the contaminated organs followed the present sequence: Liver>Gill>Muscle. According to Régine *et al.*, (2006) in a study developed with carnivorous fish from the Amazon region the concentrations in the organs followed a distinct trend Liver>Muscle>Intestine>Stomach>Gill. In other studies with temperate



fishes (rainbow trout; catfish; carp and *Ictalurus melas*) exposed to HgCl<sub>2</sub> in contaminated water kidney and gills presented the highest concentrations followed by liver and muscle (Walczak *et al.*, 1986; Yediler e Jacobs, 1995; Elia *et al.*, 2000; Elia *et al.*, 2003). In other study using contamination by food the Hg distribution was the following: Kidney>Liver> Gill>Muscle (Skak & Baatrup, 1993). Therefore, the intraperitoneal experiment results seem to follow the same trend observed by the diet contaminated studies.

Similar results were obtained by Liao *et al.*, (2005) with higher Hg concentrations observed in liver followed by kidney and muscle. In both studies (present and Liao *et al.*, 2005) the Hg concentrations observed in all the analyzed tissues were a consequence of the exposure time and the injected concentration.

Schultz & Newman (1997), observed the same trend as the present study, after the first administration of inorganic Hg to channel catfish, most of the Hg eventually becomes concentrated in the liver with only trace quantities accumulating in skeletal muscle.

The Hg distribution in fish results from the metal movement inside the organism, starting by the distinct absorption routes (e.g. gills, skin, food ingestion) reaching the blood and internal organs, and, only after following one of this pathways, this metal could be deposited in muscle tissue (storage) or can be eliminated by the kidneys or bile. Apparently, mercury distribution took approximately 24 hours in most agencies, except the head, where the peaks of radioactivity in an experimental situation are only achieved in two or three days (HSDB, 2000). This feature was important to determine the first time the exposure of fish to the metal in the experiment in question.

The increasing observed values of Hg in muscle and liver in the first exposures times (24h and 48h) of the studied fishes are probably due to the high mercury availability in the blood after the injection in the peritoneal cavity. The release of detoxification enzymes that act in the elimination/detoxification process is the probable cause for the decrease in the mercury concentrations at the 72h of exposure. Variations in the concentrations of Hg in both the liver and in the muscle are common when animals are subjected to a single dose of the contaminant. Schultz *et al.*, (1996) had already observed a decrease in Hg concentrations in the muscle after 24 hours of exposure in a study developed with inorganic Hg intravascular administration in fish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque, 1818) for 12, 24,

48 and 72 hours. This behavior would normally be interpreted as the result of excretion of the metals from the animal.

Another possibility for that reduction may be associated with the release of metallothionein, an enzyme that is responsible for the elimination of that element from the body. According to Caurant *et al.*, (1996) the presence of this enzyme in the liver and kidney function is related to the disposal of contaminants.

Part of Hg eliminated by the bile in the intestine suffers enterohepatic cycle and is probably reabsorbed into the blood, this process is surely responsible for the decrease in the mercury elimination rate and in the increase in its accumulation, and it also could explain the second rise in concentrations observed in the 96 hours exposure (WHO, 1990). Although Oliveira *et al.*, (1996), studying the effect of the exposure of inorganic mercury in the diet of *Trichomycterus zonatus* in successive daily doses, observed a continuous growth of the concentration of metal with the time of exposure, with no decrease in any of the exposure times.

**RESUMO-** *O presente estudo teve como objetivo determinar a bioacumulação de mercúrio em diferentes tecidos de peixes da espécie, Hoplias malabaricus, contaminados por mercúrio inorgânico (HgCl<sub>2</sub>) através de injeção intraperitoneal por um período de 24, 48, 72 e 96 horas. As concentrações de mercúrio acumuladas no fígado, brânquia e músculo foram determinadas com o auxílio do equipamento ICP/AES (Varian Liberty II) com geração de vapor (VGA 77). Todos os tecidos estudados apresentaram o mesmo padrão contaminação, aumentando a sua concentração em 24 horas de exposição com uma diminuição na concentração de Hg após 72 horas de experimento e um novo aumento das concentrações de Hg após 96 horas de exposição. As concentrações de Hg em organismos contaminados eram sistematicamente superiores ao controle, embora apenas nas amostras de fígado a diferença fosse estatisticamente significativa. As amostras de fígado apresentaram maiores teores de Hg quando comparadas com amostras de brânquias e músculo.*

**Palavras-chave:** mercúrio inorgânico, fígado, efeito agudo, contaminação intraperitoneal.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Anderson, H. A., Hanrahan, L. P., Smith, A., Drahein, L., Kanarek, M., Olsen, J. (2004), The role of sport-fish consumption advisories in mercury risk communication: a 1998-1999 12-state survey of women age 18-45. *Environ. Research*, **95**, 315-324
- Azevedo, F. A. (2003), *Toxicologia do Mercúrio*. Ed. Rima, São Paulo
- Baatrup, E. (1991), Structural and functional effects of heavy metal on the nervous systems including CNS organs of fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, **100**, 253-257
- Bastos, W.R., Malm, O., Pfeiffer, W.C., Cleary, D. (1998), Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brazil. *Cienc. Cult.*, **50**, 255-260
- Berlin, M. (1986), Mercury. In: *Handbook on the Toxicology of Metals*, ed. Berlin, M. Elsevier, Amsterdam
- Boudou, A. & Ribeyre, F. (1985), Experimental study of trophic contamination of salmo gairdneri two mercury compounds HgCl<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub>HgCl – analysis at the organism and organ level. *Water Air Soil Pollut.*, **26**, 137–148
- Caurant, F., Navarro, M., Amiard, J.C. (1996), Mercury in pilot whales: possible limits to the detoxification process. *Sci. Total Environ.*, **186**, 95-104
- Drevnick, P.E., Sandheinrich, M.B., Oris, J.T. (2006), Increased ovarian follicular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to dietary methylmercury. *Aquat. Toxicol.*, **79**, 49–54
- Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dorr, A.J.M., Mantilacci, L. (2003), Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **55**, 162-167
- Elia, A.C., Dorr, A.J.M., Mantilacci, L., Taticchi, M.I., Galarini, R. (2000), Effects of mercury on glutathione and glutathione-dependent enzymes in catfish (*Ictalurus melas*). In: *Trace elements- their distribution and effects in the environment: Trace metals in the environment*, ed. Market, B. & Friesa, K. vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam
- Foster, E.P., Drake, D.L. & Didomenico, G. (2000), Seasonal changes and tissue distribution of mercury in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from Dorena Reservoir, Oregon. *Archiv. of Environ. Contamin. and Toxicol.*, **38**:78-82
- Gochefeld, M. (2003), Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **56**, 174-179
- HSDB – Hazardous Substances Data Bank. (2000), Mercury. In: *Tomes Cps System. Toxicology, occupational medicine and environmental series*. Englewood: Micromedex. CD-ROM
- Jensen, S. & Jernelov, A. (1969), Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature*, **223**, 753–754
- Julshammn, K., Ringdal, O., Braikkan, O.R. (1982), Mercury concentration in liver and muscle of cod (*Cadus morinua*) as an evidence of migration between waters with different levels of mercury. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **29**, 544-549
- Kamps, L.R., Carr, R. & Miller, H. (1972). Total mercury-monomethylmercury content of several species of fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **8**, 273–279
- Liao, C.Y., Zhou, Q.F., Shi, J.J.B. & Fu, G.B., Jiang (2005), Mercury Accumulation and Distribution in Medaka after the Exposure to Sublethal Levels of Methylmercury. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **75**, 584–591
- Malm, O., Branches, F.J., Akagi, H., Castro, M.B., Pfeiffer, W.C., Harada, M., Bastos, W.R., Kato, H. (1995), Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajos river basin, Brazil. *Sci. Total Environ.*, **175**, 141-50
- Oliveira Ribeiro, C.A., Belger, L., Pelletier, E., Rouleau, C. (2002), Histopathological Evidence of Inorganic Mercury and Methyl-Mercury Toxicity in the Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Research.*, **90**, 217-225
- Oliveira Ribeiro, C.A., Filipack Neto, F., Mela, M., Silva, P.H., Randi, M.A.F., Costa, J.R.A., Pelletier, E. (2006), Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead and tributyltin chloride. *Environ. Research.*, **29**, 101:74-80
- Oliveira Ribeiro, C.A., Guimarães, J.R., Pfeiffer, W.C. (1996), Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **34**, 190-195
- Oliveira Ribeiro, C.A., Rouleau, C., Pelletier, E., Audet, C., Tjalve, H. (1999), Distribution kinetics of dietary methylmercury in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Science Technol.*, **33**, 902-907
- Oliveira Ribeiro, C.A., Schatzmann, M., Silva de Assis, H.C., Silva, P.H., Pelletier, E. (2002), Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). *Ecotoxicology Environmental Safety.*, **51**, 61-167
- Oliveira M, Santos AM, Pacheco M (2004), Glutathione protects heavy metal-induced inhibition of hepatic microsomal ethoxyresorufin O-deethylase activity in *Dicentrarchus labrax* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **58**, 379–385
- Olson, K.K., Squibb, K.S., Cousins, R.J. (1978), Tissue uptake, subcellular distribution, and metabolism of CH<sub>3</sub>HgCl by rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish. Research Board Can.*, **35**, 381-390
- Pfeiffer, W.C., Lacerda, L.D., Malm, O., Souza, C.M.M., Silveira, E.G., Bastos, W.R. (1989), Mercury concentrations in inland waters of gold mining areas in Rondônia, Brazil. *The Science of Total Environ.*, **87/88**, 233-240
- Pfeiffer, W.C., Malm, O., Souza, C.M.M., Lacerda, L.D., Silveira, E.G., Bastos, W.R. (1991), Mercury in the Madeira River ecosystem, Rondônia, Brazil. *Forest Ecol. and Manag.*, **38**, 239–245

- Régine, M.B., Gilles, D., Yannick, D., Boudou, A. (2006), Mercury distribution in fish organs and food regimes: Significant relationships from twelve species collected in French Guiana (Amazonian basin). *Sci. Total. Environ.*, **368**, 262–270
- Rudd, H.L. (1970), *Chemicals in the environment*. California Medicine, **113**, 27–32
- Santos, L.S., Muller, R.C., Sarkis, J.E. (2000), Evaluation of total mercury concentration in fish consumed in the municipality of Itaituba. Tapajós River basin, para, Brazil. *Sci. Total. Environ.*, **16**, 1-8
- Schultz, R.I., Newman, C.M. (1997), Methylmercury Toxicokinetics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and largemouth bass (*Micropterus Salmoides*) after intravascular administration. *Environ. Toxicol. and Chem.* **16**:(5), 990–996.
- Schultz, R.I., Peters, L.E., Newman, C.M. (1996), Toxicokinetics and disposition of inorganic mercury and cadmium in channel catfish after intravascular administration. *Toxicol. and Applied Pharm.*, **140**, 39-50
- Skak, C., Baatrup, E. (1993), Quantitative and histochemical demonstration of mercury deposits in the inner-ear of trout, salmo-trutta, exposed to dietary methylmercury and dissolved mercuric-chloride. *Aquat. Toxicol.*, **25**, 55-70
- Sorensen, E. (1991), *Mercury*. CRC Press, Boca Raton, FL
- Spry, D.J., Wiener, J. (1991), Metal bioavailability and toxicity to fish in low alkalinity lakes: a critical review. *Environ. Pollut.*, **71**, 243–304
- Walczak, B.Z., Hammer, U.T., Huang, P.M. (1986), Ecophysiology and mercury accumulation of rainbow trout (*Salmo gairdnerri*) when exposed to mercury in various concentrations of chloride. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **43**, 710 – 714
- WHO. (1990), World Health Organization. Environmental Health Criteria 101. *Methylmercury*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Yediler, A., Jacobs, J. (1995), Synergistic effects of temperature, oxygen and water flow on the accumulation and tissue distribution of mercury in carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, **31**, 4437- 4453

## CAPÍTULO II

Respostas Antioxidantes e Bioacumulação de Mercúrio Orgânico e Inorgânico em Traíra (*Hoplias malabaricus* – Block, 1794) após Administração Intraperitoneal Aguda.

## Respostas Antioxidantes e Bioacumulação de Mercúrio Orgânico e Inorgânico em Traíra (*Hoplias malabaricus* – Block, 1794) após Administração Intraperitoneal Aguda.

Taise Bomfim de Jesus<sup>1</sup>, Juliana dos Santos Colombi<sup>1</sup>, Juliano Zannette<sup>2</sup>, Afonso Celso Dias Bainy<sup>2</sup>, Carlos Eduardo Veiga de Carvalho<sup>1</sup>.

1-Laboratório de Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Norte Fluminense

2- Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC, Florianópolis, SC.

taisebj@hotmail.com

### Resumo

Visando um maior entendimento sobre a distribuição e acumulação do mercúrio em peixes e ainda compreender quais as possíveis enzimas antioxidantes envolvidas na ação do Hg no organismo, foi utilizado ensaios laboratoriais de exposição aguda (24, 48, 72, 96 e 120 horas) de traíra (*Hoplias malabaricus*) após injeção intraperitoneal de 0,1mL contendo doses de 0,75 µg (MeHg) e 75 µg (HgCl<sub>2</sub>). Fígado, rim, brânquia, músculo e cérebro dos indivíduos tratados com mercúrio e de indivíduos controle (não tratados) foram analisados quimicamente. Para a análise enzimática, apenas o fígado foi utilizado. A ordem de acumulação de Hg foi diferenciada para forma orgânica (Cérebro>Rim>Fígado>Músculo>Brânquia) e inorgânica (Fígado> Brânquia > Cérebro >Músculo >Rim). Diferenças significativas (p<0,05) nas concentrações médias de mercúrio foram observadas em tecidos dos indivíduos controle em relação aos tecidos dos indivíduos tratados com HgCl<sub>2</sub> e MeHg, evidenciando o processo de acumulação deste metal. Apenas a SOD apresentou redução significativa (p<0,002) na sua atividade após 72 horas de exposição em indivíduos tratados com MeHg. Já em indivíduos tratados com HgCl<sub>2</sub>, além da SOD (p=0,003), a GR (p=0,016) também apresentou redução significativa de atividade ambas após 120 horas de exposição. Com base nos resultados apresentados foi possível concluir que o fígado, em indivíduos tratados intraperitonealmente com HgCl<sub>2</sub>, é um tecido mais suscetível a acumulação de Hg, principalmente nas primeiras horas de exposição a este metal. Em contrapartida, em indivíduos tratados com MeHg, o cérebro e os rins foram os tecidos que apresentaram as maiores concentrações de mercúrio, corroborando com a literatura que afirma que a depender da forma química do metal a qual os indivíduos foram expostos, haverá diferença no seu padrão de acumulação pelos tecidos. Em relação às respostas enzimáticas no tecido hepático dos peixes, a inibição da atividade da SOD está relacionada ao mercúrio independentemente da sua forma química.

Responses Antioxidant and Bioaccumulation the Mercury Organic and Inorganic in "traíra" (*Hoplias malabaricus* – Block, 1794) after Acute Intraperitoneal Administration.

## Abstract

The objective of the present work have aimed to better understanding of the distribution and accumulation of mercury in fish and still understand what the possible antioxidant enzymes involved in the action of Hg in the fish, was used laboratory tests of acute exposure (24, 48, 72, 96 and 120 hours) Trairão (*Hoplias malabaricus*) after intraperitoneal injection of 0.1 mL containing dose of 0.75 µg (MeHg) and 75 µg (HgCl<sub>2</sub>). Liver, kidney, gill, muscle and brain of individuals treated with mercury and controls (not treated) were analyzed chemically. For enzyme analysis, only the liver was used. The order of accumulation of Hg was differentiated to form organic (brain> kidney> liver> muscle> gill) and inorganic (liver> gill> brain> muscle> kidney). Significant differences ( $p < 0.05$ ) in average concentrations of mercury were found in tissues of control subjects in relation to the tissues of individuals treated with MeHg and HgCl<sub>2</sub>, suggesting the process of accumulation of this metal. Only SOD showed significant reduction ( $p < 0.002$ ) in its activity after 72 hours of exposure in fish treated with MeHg. Already in fish treated with HgCl<sub>2</sub>, in addition to SOD ( $p = 0.003$ ), the GR ( $p = 0.016$ ) also showed significant reduction of activity after 120 hours of exposure. Based on the presented results could conclude that the liver, in fish treated intraperitoneal with HgCl<sub>2</sub>, a tissue is more susceptible to accumulation of Hg, especially in the early hours of exposure to this metal. In contrast, in fish treated with MeHg, the brain and kidneys are the tissues that showed the highest concentrations of mercury, corroborating with the literature that states that depend on the chemical form of the metal to which individuals were exposed, there will be difference in their pattern of accumulation by tissues. For answers enzyme in liver tissue of fish, the inhibition activity of SOD is related to mercury irrespective of their chemical form.

## 1.Introdução

O ambiente aquático é particularmente vulnerável a efeitos tóxicos de poluentes, desde o considerável aumento do uso de contaminantes químicos nas indústrias, agricultura, e urbanização (Sen & Semiz, 2007). No grupo dos contaminantes químicos está inserido o mercúrio (Hg), que é largamente conhecido fisiologicamente pela sua alta toxicidade quando encontrado em áreas metabólicas ativas, até mesmo em baixas concentrações (Elia *et al.*, 2003). Devido a essa toxicidade e sua capacidade de biomagnificação ao longo da cadeia trófica, o mercúrio possui alto risco ecotoxicológico para organismos aquáticos (Pelletier, 1995). Além disso, as diferentes formas químicas presentes no sistema aquático, mercúrio inorgânico ou metilmercúrio, têm distintas propriedades físico-químicas e capacidade de bioacumulação, variando consideravelmente de acordo com fatores ambientais e modelos biológicos (Stein *et al.*, 1996; Morel *et al.*, 1998).

Esse metal é bem conhecido por causar um estress oxidativo através da produção de  $H_2O_2$ , induzindo a diminuição dos níveis de glutathione (GSH), e causar a peroxidação lipídica (Stohs & Bagchi, 1995). A diminuição de GSH pode reduzir a habilidade da célula de destruir radicais livres e espécies reativas de oxigênio, mas em geral, aumenta o potencial oxidativo da célula.

Assim, a GSH e enzimas associadas tem o papel de proteger a célula. De fato, a conjugação da GSH com o contaminante químico, seja espontânea ou catalizada pela GSH-S-transferase (GST), diminui a atividade do xenobionte e torna essas moléculas mais solúveis na água, e eles podem ser mais facilmente eliminados (Boylard & Chasseaud, 1969).

Sistemas antioxidantes incluindo enzimas como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e glutathione-S-transferase, estão localizadas em diferentes compartimentos celulares. Essas enzimas são encontradas normalmente em todos os tecidos de vertebrados, mas em geral, tem alta atividade no fígado, maior órgão de entrada de xenobióticos e transformações enzimáticas de radicais livres (Zakharov & Clarke, 1993;

Lemaire *et al.*, 1994). Algumas dessas enzimas podem constituir bons bioindicadores moleculares para o estress oxidativo e podem também indicar a magnitude da resposta em populações cronicamente expostas ao mercúrio (Livingstone *et al.*, 1993).

A traíra (*Hoplias malabaricus*) tem sido utilizada em diversos ensaios toxicológicos em laboratório, por ser um animal topo de cadeia, está presente em grande parte dos rios brasileiros e ser de grande resistência física (Mella *et al.*, 2007).

A variação nos níveis de GSH e de enzimas associadas com a exposição de mercúrio tem sido estudada, mas as respostas foram largamente variáveis dependendo da espécie analisada, tempo de exposição e concentração do metal (Chatterjee & Bhattacharya, 1984; Heisinger & Scott, 1985; Di Simplicio & Leonzio, 1989; Maracine & Segner, 1998; Canesi *et al.*, 1999; Elia *et al.*, 2000; Elia *et al.*, 2003).

A análise da assimilação de metais nos diferentes tecidos pode contribuir, aliado a parâmetros bioquímicos, no aperfeiçoamento de metodologias de bioindicação de poluição aquática em áreas reconhecidamente poluídas ou não.

Este trabalho reporta a distribuição e acúmulo do mercúrio orgânico e inorgânico em fígado, rins, músculo, brânquias e cérebro de traíra (*Hoplias malabaricus*) após injeção intraperitoneal, o efeito toxicológico agudo e a quantificação da atividade enzimática antioxidantes presentes no fígado após o ensaio agudo com Hg.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Coleta

Espécimes de *Hoplias malabaricus* foram coletadas, entre os meses de julho de 2007 e julho de 2008, em açudes, localizados no município de Itaocara, noroeste do Estado Rio de Janeiro (21°40'44''S e 42° 04' 53'' W) (Apêndice I).



Os Açudes são localizados dentro de uma fazenda particular que tem a pecuária como atividade econômica sem registros de atividades de agricultura neste local.

Após a coleta os espécimes foram transportados para o laboratório da Universidade Estadual do Norte Fluminense- UENF (Campos dos Goytacazes, RJ) onde foram acondicionados em tanques oxigenados por um período de aclimação de 1 (uma) semana. Os animais que não apresentavam condições saudáveis (escamas brilhantes, ausência de fungos ou mobilidade visivelmente comprometida) foram descartados.

## 2.2 Experimento

Após o período de aclimação dos peixes no laboratório, os peixes foram anestesiados com eugenol (1%) e em seguida, foram submetidos a injeção intraperitoneal contendo mercúrio orgânico (MeHg) em uma concentração de 0,75 µg/0,1mL ( com base em experimentos por via trófica segundo Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2008) e mercúrio inorgânico (HgCl<sub>2</sub>) a uma concentração de 75µg/0,1mL. Ambos os reagentes foram diluídos em PBS (phosphate buffer solution). Após a injeção, os peixes foram colocados em aquários individuais (Apêndice II) permanecendo nestes até finalizar o tempo de exposição estipulado em 24, 48, 72, 96, 120 horas.

Para os indivíduos controle foi injetado também na cavidade intraperitoneal uma solução de PBS (phosphate buffer solution) no mesmo volume que os indivíduos contaminados. Após o tempo de exposição referido acima, os peixes eram anestesiados, pesados (a média do peso total foi de 163 g ± 90 g) e necropsiados para a retirada do músculo, fígado, rins, brânquias e cérebro (Apêndice II). Em seguida, o fígado foi acondicionado a uma temperatura de -80° C, até a análise enzimática e os demais foram acondicionados a uma temperatura de -20°C até a análise química.

## 2.3 Análise Enzimática

### 2.3.1. Dosagens enzimáticas

#### 2.3.1.1. Preparação das amostras biológicas

Os tecidos biológicos foram homogeneizados (1:4; peso/volume), em tampão de homogeneização (pH 7,6), e centrifugado a  $9.000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 30 min. O sobrenadante foi separado em alíquotas e estocado em freezer -  $80^\circ\text{C}$  para as demais análises bioquímicas. Toda a análise enzimática foi realizada no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC, Florianópolis, SC.

#### 2.3.1.2. Glutathione redutase (GR)

Ao reduzir o substrato GSSG a GR oxida NADPH, que pode ser monitorado pelo decréscimo de absorvância no comprimento de onda de 340nm. A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa em U/mg de proteína, a atividade enzimática da Glutathione redutase (Carlberg & Mannervik, 1985).

#### 2.3.1.3. Glutathione peroxidase (GPx)

É acompanhada indiretamente pelo desaparecimento do NADPH. A enzima ao utilizar GSH para degradar um peróxido orgânico, como o peróxido de tert-butila (t-BOOH), gera glutathione oxidada (GSSG), que por sua vez é reduzida pela glutathione redutase com a oxidação de NADPH. Este consumo de NADPH é acompanhado espectrofotometricamente em comprimentos de onda de 340nm, similar a determinação de GR (Wendel, 1981). A atividade da glutathione peroxidase foi expressa em U/mg de proteína.

#### 2.3.1.4. Glutathione-S transferase (GST)

A determinação da atividade da glutathione S-transferase total foi realizada segundo o ensaio descrito por Keen *et al.* (1976), que se baseia na velocidade de formação do conjugado CDNB-GSH. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 3000) em comprimentos de onda de 340 nm, durante 2 min. A atividade enzimática foi expressa em unidades de GST por mg de proteínas (U/mg de prot ), sendo que uma unidade enzimática corresponde à quantidade de enzima que conjuga 1 mol de CDNB por min a 25 °C.

#### 2.3.1.5. Catalase (CAT)

A CAT é uma enzima que promove a decomposição do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . A técnica empregada para medir sua atividade foi a descrita por (Aebi, 1984), que quantifica a velocidade de decomposição da  $H_2O_2$  pela enzima, através do decréscimo de absorvância à 230 nm ( $0,071 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) à 37 °C. O meio de reação continha  $H_2O_2$  10 mM, Tris 0,1 M e EDTA 0,5 mM, pH 8,0. Os valores de atividade da CAT foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de CAT corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1 mol de  $H_2O_2$  por minuto, à 37 °C, em pH 8,0.

#### 2.3.1.6. Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A G6PDH catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconolactona que, rápida e espontaneamente, se hidrolisa formando 6-fosfogliconato. No processo catalítico esta enzima utiliza  $NADP^+$  como aceptor de elétrons, gerando equivalentes reduzidos NADPH que mantém parte do poder redutor intracelular.

A atividade da G6PDH foi determinada através do aumento de absorvância provocado pela redução de  $NADP^+$  a NADPH, no comprimento de onda de 340 nm ( $6,22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Glock & McLean, 1953). O meio de reação

continha  $\text{MgCl}_2$  0,2 M,  $\text{NADP}^+$  0,2 mM, Tris-HCl 0,1 M, EDTA 0,5 mM, pH 8,0 e glicose-6-fosfato 0,6 mM. A seguir foram adicionados ao meio de reação volumes variáveis de sobrenadante. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

#### 2.3.1.7. Superóxido dismutase (SOD)

A SOD catalisa a reação de dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Esta enzima foi determinada segundo o método descrito por McCord & Fridovich (1969). A reação catalisada pela xantina oxidase promove a transformação da xantina em ác. úrico, e transfere um elétron para o  $\text{O}_2$  molecular, produzindo  $\text{O}_2^-$ , medindo-se assim o aumento da absorbância em comprimento de onda de 550 nm, a 25 °C. A adição de superóxido dismutase (SOD) inibe a velocidade de redução do citocromo c, uma vez que a SOD compete com este citocromo pelo  $\text{O}_2^-$ , dismutando-o a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O meio de reação continha Citocromo c 10  $\mu\text{M}$ , Xantina 50  $\mu\text{M}$ , EDTA 100  $\mu\text{M}$ , KCN 20  $\mu\text{M}$ , KBP 0,05M, pH 7,8. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

#### 2.3.2 Número Amostral

A Tabela 1 apresenta o número de indivíduos utilizados nas análises enzimáticas em cada tempo de exposição. No total 52 peixes foram utilizados para este trabalho.

Tabela 1. Número amostral de fígados de *H. malabaricus* analisados, tratados com mercúrio orgânico e inorgânico e indivíduos controle.

Tratamento	Controle	Tempo de Exposição (horas)				
		24	48	72	96	120
MeHg	4	6	6	6	6	3
HgCl <sub>2</sub>	4	5	5	5	4	3

#### 2.4 Análise Química

O número amostral de tecidos dos indivíduos tratados com MeHg, HgCl<sub>2</sub> e controle, utilizados nas análises químicas estão apresentados na Tabela 2. Após o tempo de tratamento pré-estabelecido neste estudo, os indivíduos foram necropsiados e os tecidos utilizados para o estudo foram separados e pesados em alíquotas de aproximadamente 1,0g (peso úmido). Em tecidos como cérebro e rins, esta massa não foi alcançada, logo foram pesados e analisados na sua totalidade. Em seguida, os tecidos sofreram digestão ácida, segundo Bastos *et al.*, (1998) para a determinação de mercúrio total por ICP-AES da Varian (modelo Liberty II) com acessório de geração de vapor frio (VGA-77).

Testes de precisão foram realizados através da determinação do mercúrio em amostra padrão certificado de peixe - DORM 1- (tecido muscular de *Dogfil Squalus* sp) fornecida pela Marine Analytical Chemistry Standards Programs, Canadá. A concordância entre o resultado analítico do material de referência determinado e seu valor certificado foi de 99%.

Para verificação de possíveis contaminações, foram analisados brancos para cada grupo de dez amostras. As concentrações de Hg determinadas nas amostras foram corrigidas pela média dos valores determinados para os brancos cujos valores determinados não foram

significativos (abaixo do limite de detecção do aparelho), indicando que a contaminação durante a manipulação das amostras foi mínima.

A precisão da metodologia empregada foi garantida pelo uso de triplicatas analíticas no caso do músculo e brânquias. As amostras que apresentaram coeficiente de variação [CV (%) = (Desvio padrão / Média) x 100] entre as réplicas superiores a 10% foram novamente analisadas. O mesmo procedimento não foi possível de ser adotado para o fígado, cérebro e rim em função da reduzida massa de cada amostra. Especificamente para estes tecido, foram utilizadas réplicas analíticas.

O limite de detecção do método calculado foi de 17,93 µg/kg. O cálculo seguiu a metodologia descrita por Lima (1997) de acordo com a equação:

$$LD = 3. s / a$$

onde,  $s$  é igual ao desvio padrão de 10 leituras do branco da curva e  $a$  é igual ao coeficiente angular da curva analítica (Lima, 1997).

Tabela 2. Número amostral de tecidos de *H. malabaricus* tratados com mercúrio orgânico e inorgânico e indivíduos controle utilizados nas análises químicas.

	Fígado	Rim	Músculo	Brânquia	Cérebro
MeHg	19	15	18	21	22
HgCl <sub>2</sub>	20	16	17	16	21
Controle	16	7	7	7	6

#### 2.4 Análise estatística

Diferenças significativas entre os tempos de exposição e as atividades enzimáticas, assim com, as diferenças significativas nas concentrações de Hg total

entre os diferentes tempos de tratamento, foram observadas utilizando o ANOVA one-way e, a posteriori o teste de Tukey. Para avaliar a correlação entre as enzimas antioxidantes analisadas foi adotado o teste de correlação de Pearson. O programa estatístico utilizado para esta análise foi o GRAPHPAD versão 5.0. A significância foi testada ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. Resultados

#### 3.1. Acumulação de mercúrio total em diversos tecidos de traíra.

As médias das concentrações de mercúrio e o desvio padrão dos peixes tratados com MeHg e HgCl<sub>2</sub> e dos peixes não administrados com mercúrio (controles) estão apresentados na Tabela 3. Os dados mostram que a acumulação do metal pela espécie estudada devido ao aumento significativo da concentração do mercúrio total em todos os tecidos em relação aos controles.

A distribuição decrescente de mercúrio nos tecidos de *H. malabaricus* tratados com a forma orgânica foi, Cérebro>Rim>Fígado>Músculo>Brânquia. Em relação aos indivíduos tratados com mercúrio inorgânico a distribuição foi diferenciada Fígado> Brânquia>Cérebro> Músculo > Rim (Tabela 3).

Nos indivíduos controle a ordem decrescente de acumulação foi, Rim > Fígado > Cérebro > Brânquia > Músculo (Tabela 3). Porém as médias de concentração de Hg nos indivíduos controle foram próximas, não diferindo significativamente entre os tecidos.

Ao comparar a acumulação de Hg entre os órgãos de traíras tratadas com HgCl<sub>2</sub>, o fígado, foi o único órgão que apresentou diferença significativa em relação aos demais tecidos. Em traíras tratadas com MeHg, o rim, o fígado e o cérebro diferenciaram significativamente das brânquias e músculo (Tabela 3).

Tabela 3. Acumulação de Hg ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nos diferentes tecidos de *H. malabaricus* tratados com mercúrio orgânico e inorgânico e indivíduos controle.

Tratamento	Fígado	Rim	Músculo	Brânquia	Cérebro
MeHg	401 $\pm$ 226 <sup>a</sup>	469 $\pm$ 802 <sup>ab</sup>	130 $\pm$ 30 <sup>cd</sup>	112 $\pm$ 33 <sup>d</sup>	526 $\pm$ 362 <sup>be</sup>
HgCl <sub>2</sub>	48086 $\pm$ 21200 <sup>a</sup>	443 $\pm$ 188 <sup>b</sup>	784 $\pm$ 331 <sup>b</sup>	2472 $\pm$ 1580 <sup>b</sup>	2060 $\pm$ 1479 <sup>b</sup>
Controle	52 $\pm$ 19	96 $\pm$ 35	49 $\pm$ 14	50 $\pm$ 16	51 $\pm$ 20

Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )



### 3.1.1- Fígado

Para os peixes tratados com  $\text{HgCl}_2$ , os tempos de exposição de 24 e 96 horas apresentaram maior acumulação de Hg ( $68810 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $44652 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente) (Figura 1), não diferenciando significativamente entre eles. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas entre os demais tempos de exposição e ainda, entre os tempos de exposição ao  $\text{HgCl}_2$  e as amostras controle, estas obtiveram concentrações variando de  $52 \pm 19 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

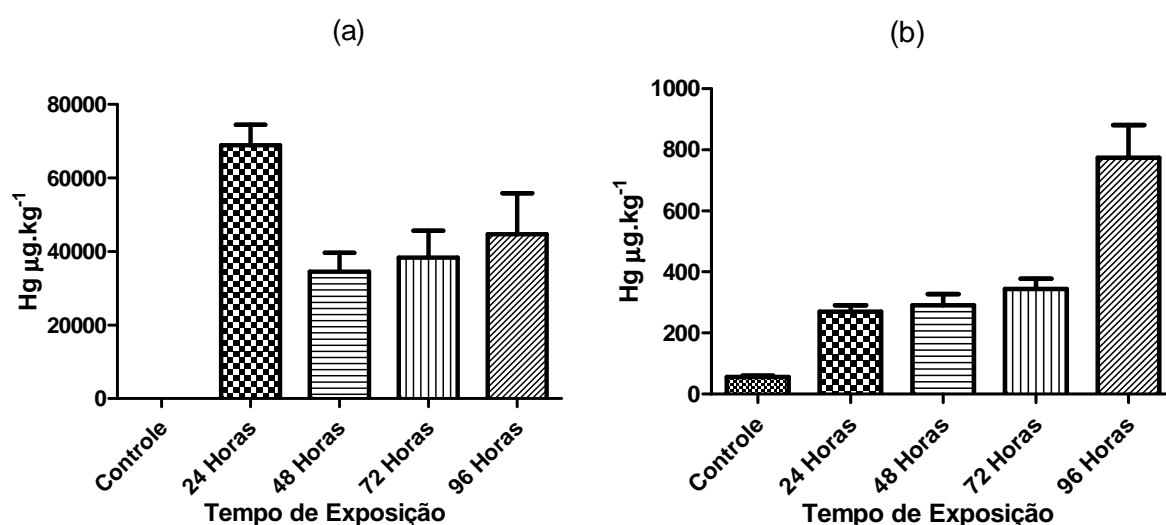


Figura 1. Concentrações médias de mercúrio ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em fígado de *H. malabaricus* controle e tratados com  $\text{HgCl}_2$  (a) e MeHg (b), respectivamente, por até 96 horas.

A acumulação de Hg em traíras tratadas com MeHg foi crescente com o tempo de exposição, alcançando a maior concentração após 96 horas ( $774 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Figura 1). Este tempo de exposição apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) com os demais tempos de exposição. Apesar desta tendência de aumento de concentração com o aumento do tempo de exposição à pequena variação na média das concentrações de Hg nos tempos iniciais (24, 48 e 72 horas) refletiram na ausência de diferença significativa entre eles (Apêndice III).

### 3.1.2 Cérebro

O armazenamento de Hg neste tecido apresentou comportamento diferenciado em relação as diferentes formas do mercúrio. Os peixes administrados com  $\text{HgCl}_2$  apresentaram uma oscilação na acumulação de Hg no cérebro (Figura 2). Em indivíduos tratados com mercúrio inorgânico, maiores concentrações de Hg foram evidenciadas após 24 horas ( $2699 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), após este tempo foi observado um decréscimo nessas concentrações e após 72 horas ( $3962 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) um novo acréscimo (Figura 2).

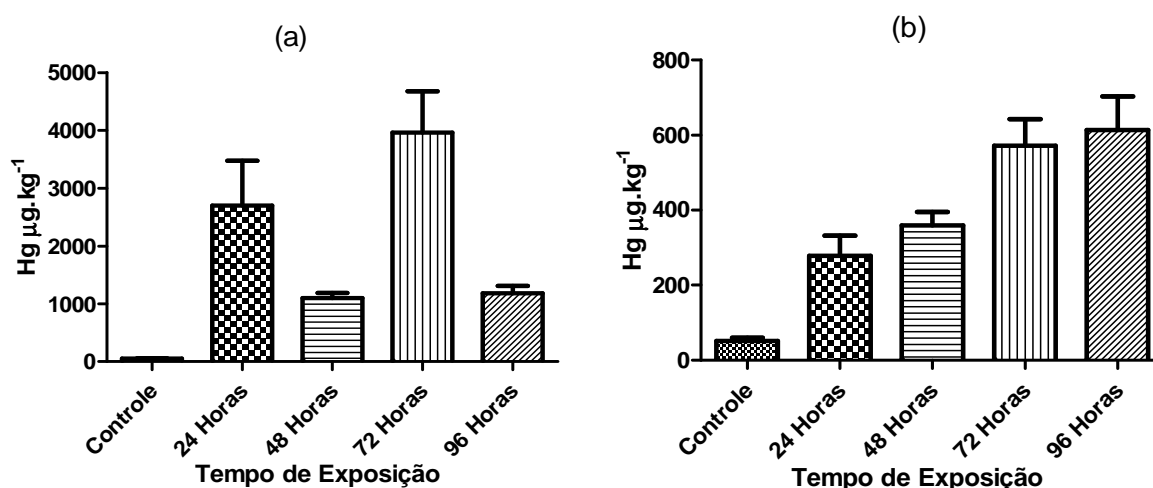


Figura 2. Concentrações médias de mercúrio ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em cérebro de *H. malabaricus* controle e tratados com  $\text{HgCl}_2$  (a) e MeHg (b), respectivamente, por até 96 horas.

Não foi observada diferença significativa na acumulação de Hg em cérebro de traíras tratadas com  $\text{HgCl}_2$  entre os tempos 24 e 72 horas, 24 e 96 horas e 48 e 96 horas. Com relação à concentração de Hg nos indivíduos controle todos os tempos de exposição foram significativamente diferentes das concentrações nos organismos contaminados (Apêndice III).

A acumulação de Hg em cérebros de peixes tratados com mercúrio orgânico foi crescente em relação aos tempos de exposição, assim como ocorreu em fígados tratados com mercúrio orgânico (Figura 2).

Não foi observado diferenças significativas na acumulação de Hg em cérebros de traíras tratadas com MeHg entre os tempos de 24 e 48 horas, assim como entre 72 e 96 horas. Com relação aos indivíduos controle todos os tempos de exposição foram diferentes significativamente (Apêndice III).

### 3.1.3 Rins

As médias das concentrações de Hg observadas em rins de traíras tratadas com  $\text{HgCl}_2$  após 24, 48 e 96 horas de exposição foram similares (1454, 1504 e 1368  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente). As concentrações mais elevadas foram observadas após 72 horas de experimento (3138  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Figura 3).

Não houve diferença significativa na acumulação de Hg em rins de traíra administradas com  $\text{HgCl}_2$  entre os tempos de 24 e 48 horas, 24 e 96 horas e 48 e 96 horas. Diferenças significativas entre os tempos de exposição e rins de traíras não tratadas com mercúrio (controle) (Apêndice III).

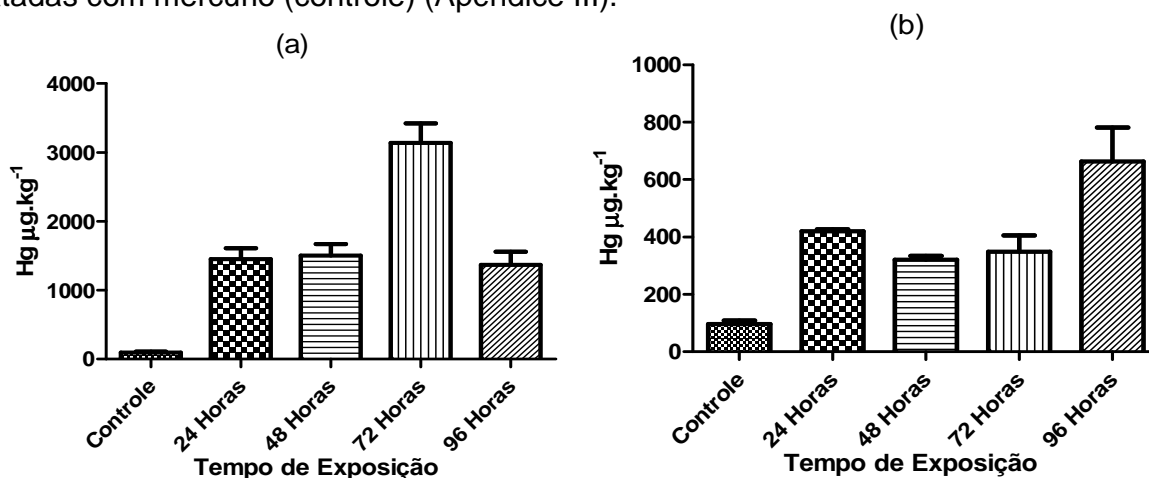


Figura 3. Concentrações médias de mercúrio ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em rim de *H. malabaricus* controle e tratados com  $\text{HgCl}_2$  (a) e MeHg (b), respectivamente, por até 96 horas.

Nos tecidos renais de traíras tratadas com MeHg, maiores concentrações de Hg foram observadas após o período final do experimento (96 horas - 663  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), assim como observado em fígados e cérebros de traíras tratados com mercúrio

orgânico (Figura 3). Não foram observadas diferenças significativas entre 24 e 72 horas, 24 e 96 horas e 72 e 96 horas de exposição. Diferenças significativas foram observadas ao comparar os rins administrados com MeHg e os rins de traíras controle.

#### 3.1.4 Músculo

A oscilação na concentração de Hg no músculo é comum as duas formas químicas (Figura 4).

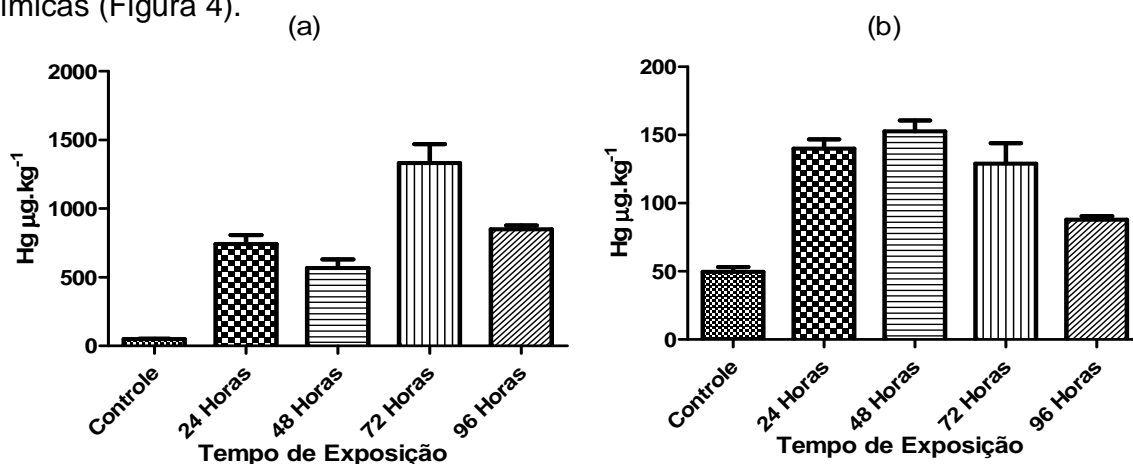


Figura 4. Concentrações médias de mercúrio ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) em músculo de *H. malabaricus* controle e tratados com  $\text{HgCl}_2$  (a) e MeHg (b), respectivamente, por até 96 horas.

Em traíras tratadas com  $\text{HgCl}_2$  houve um pico na acumulação de Hg após 72 horas ( $1333 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) do tratamento (Figura 4). Esse tempo de exposição diferenciou significativamente dos demais (Apêndice III).

Em traíras tratadas com MeHg, a variação da acumulação de Hg nos tempos de exposição foi diminuta (24 horas –  $140 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 48 horas -  $153 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 72 horas –  $129 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Reduções na acumulação do Hg após 96 horas de tratamento, foram observados em indivíduos tratados com MeHg e  $\text{HgCl}_2$  (Figura 4).

Diferenças significativas nas concentrações de Hg nos músculos dos indivíduos tratados com MeHg foram observada apenas no tempo final de exposição 96 horas em relação aos demais tempos. Diferenças significativas também foram observadas entre

músculos dos indivíduos tratados com MeHg e músculos dos indivíduos controle, em todos os tempos de exposição (Apêndice III).

### 3.1.5 Brânquias

As maiores concentrações médias de Hg em brânquias de traíras tratadas com MeHg e HgCl<sub>2</sub> foram observadas no tempo inicial (24 horas) (Figura 5). Em brânquias de traíras tratadas com HgCl<sub>2</sub> a média foi de 4940 µg kg<sup>-1</sup>. Para brânquias de traíras tratadas com MeHg essa média foi de 140 µg kg<sup>-1</sup>.

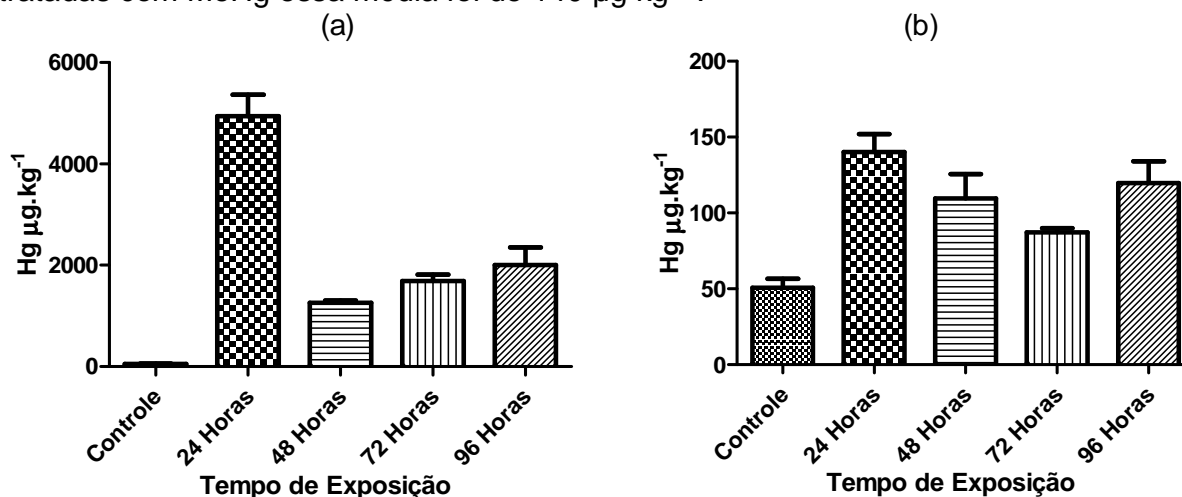


Figura 5. Concentrações médias de mercúrio (µg kg<sup>-1</sup>) em brânquia de *H. malabaricus* controle e tratados com HgCl<sub>2</sub> (a) e MeHg (b), respectivamente, por até 96 horas.

Após 24 horas de exposição ao HgCl<sub>2</sub> houve diminuição significativa na acumulação de Hg. Todos os tecidos de brânquias tratados com o HgCl<sub>2</sub> diferiram estatisticamente das brânquias controle (Apêndice III).

No tratamento com mercúrio orgânico, houve redução na acumulação de mercúrio após 24 horas de exposição. Com 96 horas de exposição, as concentrações de Hg voltaram a aumentar, diferindo significativamente das concentrações observadas após 72 horas de exposição (Apêndice III).

### 3. Análise Enzimática

A atividade da SOD no fígado dos peixes, diferiu significativamente ( $p=0,002$ ) após 72 horas de exposição ao MeHg em relação aos fígados dos peixes controle (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade das enzimas analisadas nos tecidos hepáticos de traíras controle e tratadas com mercúrio orgânico em diferentes tempos (horas).

Enzimas	Controle	24	48	72	96	120
SOD (U/mg de prot)	11,6 ± 2,88	10,7 ± 3,6	10,2 ± 1,6	9,5 ± 1,2*	8,1 ± 1,9	9,4 ± 1,7
GST (mU/mg de prot)	144 ± 24,6	128 ± 14,4	145 ± 33,5	136 ± 32,4	111 ± 20,6	127 ± 16,2
CAT (U/mg de prot)	440 ± 101	648 ± 180	540 ± 86,3	517 ± 90,4	483 ± 127,6	552 ± 95,6
GR (mU/mg de prot)	32,9 ± 18,2	27,8 ± 18,8	39,4 ± 19,9	30,0 ± 10,6	20,6 ± 5,4	31,2 ± 7,3
G6PDH (mU/mg de prot)	29,4 ± 9,8	39,4 ± 20,4	47,0 ± 15,9	39,2 ± 27,2	47,1 ± 22,7	37,4 ± 26,2
GPx (mU por mg de prot)	58,6 ± 14,1	63,4 ± 18,7	63,8 ± 11,9	70,3 ± 22,3	48,8 ± 17,5	63,6 ± 21,6

Valores médios ± desvio padrão. \* indica diferença em relação ao controle (p<0.05). Prot= proteínas

Correlação positiva e significativa pode ser observada entre as atividades da GST e da GR, no fígado de indivíduos tratados com MeHg (Tabela 5).

Tabela 5. Correlação das enzimas analisadas nos tecidos hepáticos de traíras tratadas com mercúrio orgânico.

	CAT	GST	G6PDH	GR	GPx	SOD
CAT	1,00					
GST	0,10	1,00				
G6PDH	0,20	0,16	1,00			
GR	0,05	0,50*	0,36	1,00		
GPx	0,10	0,23	-0,24	0,09	1,00	
SOD	0,13	0,35	-0,18	0,29	0,30	1,00

\*Valor diferente significativamente  $p < 0,05$

As atividades da SOD ( $p=0,003$ ) e GR ( $p=0,016$ ) nos fígados de peixes tratados com  $HgCl_2$ , foram inibidas após o período total do tratamento (120 horas) (Tabela 6).



Tabela 6. Níveis totais das enzimas analisadas nos tecidos hepáticos de traíras controle e tratadas com mercúrio inorgânico em diferentes tempos (horas).

Enzimas	0	24	48	72	96	120
SOD (U/mg de prot)	11,6 ± 2,9	12,1 ± 2,5	8,4 ± 1,9	11,0 ± 2,9	8,5 ± 1,0	6,1 ± 1,3*
GST (U/mg de prot)	144 ± 24,6	129 ± 31,2	132 ± 23,4	118 ± 20,3	149 ± 25,8	131 ± 24,2
CAT (U/mg de prot)	440 ± 101	634 ± 144	567 ± 46,5	611 ± 227	515 ± 35,2	419 ± 47,1
GR (U/mg de prot)	32,9 ± 18,2	22,6 ± 9,5	19,3 ± 6,9	28,8 ± 8,4	21,3 ± 7,1	16,3 ± 9,5*
G6PDH (U/mg de prot)	29,4 ± 9,8	29,6 ± 8,3	48,5 ± 14,5	54,6 ± 27,6	46,6 ± 7,2	47,5 ± 9,7
GPx (U/mg de prot)	58,6 ± 14,1	74,8 ± 14,9	70,7 ± 21,3	63,8 ± 14,0	65,7 ± 19,6	53,7 ± 9,3

Valores médios ± desvio padrão. \* Valores significativamente diferentes em relação ao controle (p<0,05). Prot= Proteínas.

Foram observadas correlações positivas significativas entre as atividades enzimáticas dos fígados tratados com HgCl<sub>2</sub>. As correlações significativas (p<0,05) foram entre SOD-CAT, SOD-GR e GST-GR (Tabela 7).

Tabela 7. Correlação das enzimas analisadas nos tecidos hepáticos de traíras tratadas com mercúrio inorgânico.

	CAT	GST	G6PDH	GR	GPx	SOD
CAT	1,00					
GST	0,25	1,00				
G6PDH	-0,09	0,39	1,00			
GR	0,20	0,41*	0,39	1,00		
GPx	0,32	0,08	-0,03	-0,10	1,00	
SOD	0,67*	0,12	0,05	0,44*	0,25	1,00

\*Valor diferente significativamente p<0,05

#### 4. Discussão

Normalmente os peixes podem acumular MeHg e HgCl<sub>2</sub> em seus tecidos do corpo a partir de ambientes aquáticos. As concentrações no peixe são comumente mais elevadas que a correspondente no sistema aquático (Boudou & Ribeyre, 1989; Baeyens *et al.*, 2003).

A forma de contaminação utilizada nesse trabalho não tem caráter realístico, pois neste trabalho os peixes foram submetidos a injeções intraperitoniais do contaminante, dado que, esta forma de contaminação não ocorre no sistema aquático. Porém, é evidente a necessidade de entender o comportamento das diferentes formas de mercúrio que são lançadas no ambiente, nos diferentes tecidos do peixe a partir de concentrações conhecidas, e a injeção intraperitoneal é comumente utilizada em trabalhos laboratoriais com exposição aguda a algum tipo de metal, pois este é rapidamente absorvido devido à superfície da cavidade peritoneal ser relativamente grande e ao seu rico suprimento sanguíneo (Casarett & Doull's, 2001). Esta rápida absorção promove interações entre as formas químicas

de Hg e as barreiras biológicas que são importantes para o entendimento dos mecanismos de bioacumulação e efeitos toxicológicos.

Em trabalhos que utilizam mercúrio na dieta alimentar contaminada ou através da exposição pela água, não há segurança para evidenciar que a concentração exposta seja absorvida pelo peixe, ainda que tenham caráter realístico. Essa afirmação pode ser evidenciada nas diferentes porcentagens de assimilação do MeHg por peixes carnívoros destacadas nos trabalhos de, Wiener & Spry (1994) que varia de 65-80% e de Boudou & Ribeyre (1997) que varia de 41-92%. Neste último trabalho as taxas de assimilação de MeHg apresentaram grandes variações dentro da mesma espécie de peixe submetidas as mesmas concentração do contaminante. As diferentes taxas de assimilação irão influenciar na distribuição e acumulação das formas orgânicas e inorgânicas do mercúrio, podendo demonstrar uma falsa realidade nas concentrações de Hg nos diferentes tecidos.

Schultz *et al.* (1996) após administração intraperitoneal de mercúrio inorgânico em peixes por até 300 horas, concluíram que a maioria do Hg absorvido pelo organismo do peixe esteve concentrado no fígado e quantidades traços deste Hg foram acumuladas no músculo. O presente estudo corrobora com os resultados de Schultz *et al.* (1996), apresentando maior acumulação de Hg (inorgânico) no tecido hepático e em níveis mais inferiores, no tecido muscular. O mercúrio inorgânico assim como todas as outras substâncias que são digeridas e passam através da parede intestinal, são transportados primeiramente para o fígado, via veia porta. Esta veia é responsável pelo transporte de todo material absorvido no intestino para o fígado, com exceção de parte dos lipídios. O fígado exerce um papel importante na metabolização e na acumulação de mercúrio inorgânico com proteínas de ligação que seqüestram esse metal neutralizando-o e impedindo que ele circule em outros tecidos.

Metalotioneínas (proteínas de baixo peso molecular, capazes de seqüestrar metais) têm uma elevada afinidade pelo mercúrio inorgânico, mas não pelo MeHg (Wiener & Spry, 1996). Tem sido demonstrado que o fígado de peixes tem papel regulador desta proteína em resposta à exposição de mercúrio (Schlenk *et al.*, 1995). Segundo Drevnick *et al.* (2008) avaliando a toxicidade do mercúrio em peixes do norte da Ilha de Royale (USA) concluíram que em peixes rapidamente expostos a uma quantidade suficientemente elevada de mercúrio inorgânico são capazes de seqüestrar no fígado o que foi recolhido através do intestino, isso

possivelmente explica a maior quantidade de mercúrio inorgânico no fígado. Desta forma, a alta dose de  $\text{HgCl}_2$  administrada nos indivíduos do presente estudo contribuiu para que se observassem altas concentrações durante o tempo inicial do tratamento (24 horas).

As menores concentrações de Hg observadas no tecido muscular de indivíduos tratados com  $\text{HgCl}_2$ , foi explicada devido a baixa afinidade deste tecido com a forma inorgânica de Hg (Oliveiro-Ribeiro *et al.*, 1996; Olson *et al.*, 1978; WHO, 1990). As oscilações nas concentrações de Hg total nos diferentes tempos de exposição foi comum as duas formas químicas de mercúrio ao qual os animais foram tratados, diferentemente dos demais tecidos, a explicação para tal semelhança é devido a função exercida por este tecido que é de acumulação, o que diminui a disponibilidade do metal para a corrente sanguínea.

Segundo Español (2001) altas concentrações de Hg encontradas em fígados administrados com  $\text{HgCl}_2$ , em relação aos demais tecidos, foi devido a esse tecido ser o primeiro órgão a atuar na biotransformação de xenobiótico e excreção de alguns metais através do ciclo entero-hepático além do fluxo sanguíneo elevado em situação de repouso (típico de traíras), o que direciona o Hg presente no organismo para esse órgão, elevando os valores de concentração.

A acumulação de mercúrio em traíras tratadas com  $\text{MeHg}$  e  $\text{HgCl}_2$ , resultou em um aumento dos níveis deste metal em todos os tecidos com relação aos tecidos não tratados (controle). Esse resultado está de acordo com outros estudos feitos com espécies de clima temperado como *I. mellas* (Elia *et al.*, 2003) carpas (Yediler & Jacobs, 1995) tilápias (Walczak *et al.*, 1986) e peixe gato (Elia *et al.*, 2000) todos expostos ao cloreto de mercúrio diretamente solubilizado na água em diferentes condições experimentais. Os estudos anteriores apresentaram maiores concentrações de Hg em rins e brânquias em relação a fígado e músculo. Esse mesmo padrão foi observado em estudos com administração intraperitonal (Serra *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 1996; Liao *et al.*, 2005).

Menores concentrações de Hg em rins observadas neste trabalho em indivíduos tratados com  $\text{HgCl}_2$  foi explicada pela parte do rim escolhida para as análises químicas, que foi o rim anterior. Segundo WHO (1991), o rim posterior possui alta afinidade por mercúrio inorgânico, devido ao seu papel na eliminação desta forma de mercúrio (Allen *et al.*, 1988). Os trabalhos que observaram maiores concentrações no rim quando comparados com outros tecidos podem ter utilizado o

rim posterior, uma vez que já foi referenciando sua importante relação com esta forma química de Hg, ou a dose utilizada nesse estudo não atingiu o rim posterior, ou ainda, os mecanismos envolvidos com a detoxificação e/ou imobilização deste metal sejam mais eficientes.

Existe uma carência de trabalhos experimentais com base na acumulação de metilmercúrio em tecidos de peixes. E como foram observadas nesse estudo, as formas de mercúrio, orgânicas e inorgânicas, tem diferentes padrões de acumulação nos órgãos internos dos peixes, fenômeno esse também observado por Leaner & Mason (2001). Isto tem sido atribuído à capacidade lipofílica do metilmercúrio para difundir no organismo, enquanto que o mercúrio inorgânico é mais lentamente transferido para os órgãos internos (Boudou & Ribeyre, 1985; Oliveira e Ribeiro *et al.*, 1999).

Nesse estudo, valores decrescentes de acumulação de Hg em traíras tratadas com MeHg foram observados em cérebro, rins e fígado. Esses órgãos também foram avaliados por Berntssen *et al.* (2003) em tratamentos de exposição trófica de peixes ao MeHg, porém, o padrão de acumulação do metilmercúrio nos órgãos examinados foram, em ordem decrescente, fígado>rins>cérebro. O cérebro não é um órgão comumente analisado em trabalhos de bioacumulação de Hg, desta forma, possíveis comparações são limitadas. Altas concentrações observadas em cérebros de traíra tratadas com MeHg foram atribuídas a sua elevada lipofilia, ou seja, esta forma química de Hg é capaz de se difundir através da membrana celular sem a necessidade de qualquer sistema transportador específico, dada a sua afinidade com os grupamentos sulfidrílicos livres em fluidos biológicos, além disso, tem sido proposto, um processo ativo de transporte de MeHg pela membrana celular. O MeHg forma complexos com a cisteína plasmática, e este complexo resulta em uma molécula semelhante a metionina, que será então transportado pelo sistema de transportes de aminoácidos da membrana celular (Zheng *et al.* 2003).

Um exemplo das concentrações médias de mercúrio em cérebros de traíras encontradas no meio ambiente foi relatado em Gomes (2007), que após análises das concentrações de mercúrio total em cérebros de traíras das lagoas de Cima e do Campelo (Campos dos Goytacazes-RJ), verificou concentrações médias de  $303,3 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $415,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores estão acima das concentrações médias de Hg encontradas nos indivíduos controle do presente estudo ( $50,86 \mu\text{g kg}^{-1} \pm 19,94 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e são próximas as médias observadas em

cérebros de indivíduos tratados com MeHg. Desta forma, os dois ambientes avaliados por Gomes (2007) podem estar sofrendo com a contaminação mercurial.

Segundo Español (2001), a maior parte dos compostos organomercuriais se distribuem amplamente por todo o organismo e com maior uniformidade nos diferentes tecidos do que o mercúrio inorgânico e a maior parte destes organomercuriais vai para o cérebro, fígado e rins. Essa afirmativa explica a ordem de acumulação encontrada nesse estudo em traíras tratadas com MeHg. Esta forma de mercúrio é a de maior deposição cerebral, atingindo até 98% do total absorvido. Por essa razão, o sistema nervoso central é o ponto crítico do organismo na exposição ao metilmercúrio (Azevedo, 2003).

Segundo Hursh *et al.* (1985), a toxicidade relativa do mercúrio inorgânico está vinculada a suas taxas de absorção. Após exposições agudas e crônicas de animais e homens a estes compostos, por vias intravenosas, subcutâneas ou orais, as maiores concentrações de mercúrio aconteceram nos rins e depois no fígado. Assim como encontrado em trabalhos que utilizaram exposições tróficas para trutas (*Oncorhynchus mykiss*) expostas ao metilmercúrio (Boudou & Ribeyre, 1985; Skak & Baatrup, 1993), diferentemente do observado neste trabalho que em indivíduos tratados com mercúrio inorgânico através da injeção intraperitoneal, o tecido que apresentou maiores concentrações foi o fígado seguido pelas brânquias e cérebros.

Oscilações na acumulação de Hg, nos diversos tecidos estudados, são encontradas em trabalhos experimentais que utilizam doses únicas deste metal (Schultz *et al.*, 1996). Estas oscilações são interpretadas como tentativa de eliminação do metal pelo organismo, ou ainda, a associação de metais com diferentes ligantes celulares podem influenciar sua biodisponibilidade dentro da célula. Por exemplo, metais seqüestrados por proteínas citosólicas como as metalotioneínas ou estocados nos lisossomos são considerados detoxificados, e não mais biodisponíveis a alvos celulares (Hogstrand & Haux, 1991). Porém, a ligação metalotioneína-mercúrio, é rapidamente desfeita (Goyer, 1986) e, desta forma, este metal é novamente disponibilizado para a corrente sanguínea.

Estresse oxidativo é uma condição induzida pelo oxigênio e derivados de oxigênio (superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e de óxido nítrico, comumente conhecidos como radicais livres de espécies reativas de oxigênio (ROS). Normalmente, os níveis adequados de antioxidantes celulares, principalmente superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase

(GPx) e glutathione redutase (GR) mantêm os potenciais radicais livres no organismo. A situação em que há uma mudança em direção a este equilíbrio de pró-oxidantes, quer devido à geração de ROS ou a diminuição excessiva da capacidade antioxidante, é referido como estado de estresse oxidativo (OSS) (Davidson, *et al.*, 2007).

O mercúrio é um conhecido agente pró - oxidante que tem como um dos principais mecanismos de toxicidade a geração de estresse oxidativo pelo aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O aumento desta espécie reativa de oxigênio resulta em alguns efeitos a nível celular, como diminuição dos níveis glutathione (GSH), peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos no DNA (Stohs & Bagchi, 1995).

Nesse estudo foi observada uma diminuição na atividade da SOD no fígado de traíras tratadas com MeHg, apenas após 72 horas de tratamento, quando comparadas com a atividade desta enzima em fígados de traíras controle. Em traíras tratadas com HgCl<sub>2</sub> também foi observada uma diminuição na atividade da SOD, porém essa redução foi significativa apenas após 120 horas de exposição. As reduções das atividades da SOD tanto em indivíduos tratados com MeHg quanto para indivíduos tratados com HgCl<sub>2</sub>, e da GR em indivíduos tratados com HgCl<sub>2</sub>, indicam uma maior susceptibilidade das biomoléculas das células hepáticas, sobretudo hepatócitos, a danos oxidativos.

Diminuição significativa da atividade da GR, em relação a atividade desta enzima no fígado de indivíduos controle, foi observada apenas em indivíduos tratados com HgCl<sub>2</sub>, após 120 horas de tratamento. A enzima glutathione redutase (GR) atua na reciclagem da glutathione (GSH), que por sua vez é utilizada pelas enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e glutathione peroxidase selênio dependente. A redução de GSH é ocasionada pela formação de conjugados de GSH-S com formas iônicas de Hg, formando complexos lineares covalentes (Rabenstein, 1989). O complexo GSH-S atua como um agente quelante intracelular, que impede a interação nucleofílica dos metais com as principais estruturas celulares (Maracine e Segner, 1998). Como consequência, a diminuição nas concentrações de GSH ocorre uma queda na capacidade antioxidante celular, uma vez que esta molécula representa um importante antioxidante não-enzimático. Além disso, a GSH também é utilizada como coenzima em várias reações enzimáticas (ex: glutathione peroxidase e glutathione S-transferase). Assim, GSH e suas enzimas associadas desempenham um papel protetor dentro da célula.

Elia *et al.* (2003) observaram variações nos níveis de GSH e nas atividades enzimáticas associadas com a exposição de mercúrio, mas as respostas foram amplamente variáveis dependendo da espécie animal utilizada, do tempo de exposição (estudos em laboratório) e da concentração do metal.

O padrão de variação nos níveis de GSH, em animais experimentais, tem variado com a forma química do metal, com espécies diferentes de peixes (Elia *et al.*, 2003). Em *Anabas testiduneus*, expostos a 166 µg/L de mercúrio inorgânico, os níveis GSH diminuíram após 24 horas e após 48 horas observou-se um aumento desses níveis (Chatterjee & Bhattacharya, 1984). Em *Mugil cephalus* tratados com 200 µg/L de mercúrio por 7 dias, os níveis hepáticos de GSH aumentaram (Thomas & Wofford, 1984). O mercúrio forma complexos com GSH, e em doses moderadas de HgCl<sub>2</sub> observa-se um aumento na concentração de GSH (Lash & Zalups, 1996). No entanto, em doses tóxicas de HgCl<sub>2</sub>, como foi o caso do presente estudo, há depleção de GSH que ocorre a partir do rim, resultando na oxidação de porfirinas reduzidas, uma característica típica da toxicidade do mercúrio. Esta depleção de GSH ocorre a partir do rim, resultando no estresse oxidativo (Gstaunthaler *et al.*, 1993; Woods *et al.*, 1990 a, b).

A inibição da atividade das enzimas analisadas também foram observados por Mella *et al.* (2008) em traíras tratadas com a mesma concentração de MeHg após 70 dias de exposição trófica e por Sen & Semiz (2007), em peixes contaminados por Hg inorgânico. Ambos autores citados anteriormente, afirmam que estas inibições enzimáticas têm como consequência uma situação de estresse oxidativo.

Sen & Semiz 2007, ainda comparam a atividade enzimática em peixes tratados com diferentes metais (Ni, Cd, Cu, Zn, Sb, Fe<sup>+2</sup>, Co, Al e Fe<sup>+3</sup>) e concluem que o Hg é o metal que apresenta maior efeito na diminuição da atividade da GST. Existem indícios de que a atividade da glutathione S-transferases (GST) está envolvida na conjugação de Hg<sup>2+</sup> (Brambila *et al.*, 2002; McGuire *et al.*, 1997). Em contrapartida, Elia *et al.*, (2003) observaram aumento da atividade da GST em peixes tratados com 35, 70 e 140 µg/L de mercúrio na água por 10 dias de exposição. Este autor conclui que o aumento do nível GSH hepático em peixes é provavelmente devido a adaptação metabólica em condições contínuas de exposição a altos níveis desse elemento.



No presente estudo, não foi observada diferença significativa na atividade da GST nos indivíduos tratados com MeHg e HgCl<sub>2</sub> e os indivíduos controle, porém foi observado correlação positiva significativa entre a atividade de GR (inibida significativamente) e a GST, para indivíduos tratados com as duas formas químicas do Hg.

Relatos de estudos de campo como os observados por Larose *et al.*, (2008), em peixes de um lago no Canadá contaminado por mercúrio, apresentaram a inibição da atividade da GST e da GR.

Apesar da ausência de significância na atividade da CAT em fígados de traíras tratadas com Hg em relação a fígados de indivíduos controle, foi possível observar correlação significativa positiva entre a atividade da CAT e a atividade da SOD, em fígados de traíras tratadas com o mercúrio inorgânico. Estas enzimas têm um importante papel na detoxificação de radicais em moléculas não reativas, enquanto a SOD cataliza a conversão de ânions superóxidos (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a CAT metaboliza essas moléculas de peróxido formadas em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (Van der Oost *et al.*, 2003).

O presente estudo, não teve como intenção, comparar as atividades enzimáticas nas diferentes formas químicas nas quais, as traíras foram submetidas uma vez que as concentrações utilizadas no tratamento foram distintas.

## 5. Conclusões

Analisando os resultados apresentados no presente estudo em conjunto, é possível afirmar que as análises químicas refletiram a capacidade de bioacumulação do mercúrio orgânico e inorgânico nos tecidos analisados, apesar das diferenças nas concentrações de Hg que variaram conforme a função do tecido e a forma química do mercúrio a qual o peixe foi tratado. Os biomarcadores bioquímicos responderam de forma semelhante para as formas orgânica e inorgânica de Hg, através da inibição da atividade da SOD (superóxido dismutase), porém o tempo de exposição foi um fator importante para diferenciar significativamente a inibição desta enzima indicando que maiores tempos de exposição devem resultar numa maior confiabilidade no uso da atividade da SOD como ferramenta para o monitoramento ambiental do mercúrio. A inibição significativa da GR (glutathione redutase) apenas em peixes tratados com mercúrio inorgânico permite a utilização da sua atividade

como ferramenta de biomarcadores bioquímicos específicos para esta forma química do Hg. Porém, os ensaios laboratoriais devem ter continuidade uma vez que diferentes respostas foram observadas nos trabalhos citados neste estudo.

## 6. Referências Bibliográficas

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, 105, 121:126.

Allen, P.; Min, S.Y. & Keong, W.M. Acute effects of mercury chloride on intracellular GSH levels and mercury distribution in the fish *Oreochromis aureus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 40: 178-184.

Azevedo, F. A. 2003. Toxicologia do Mercúrio. Ed. Rima, São Paulo.

Baatrup, E. 1991. Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. *Comparative Biochemical Physiology*, 100 C, 253-257.

Baeyens, W.; Leemakers, M.; Papina, T.; Saprykin, A.; Brion, N.; Noyen, J.; De Gieter, M.; Elskens, M. & Goeyens, L. 2003. Bioconcentration and biomagnification of mercury and methylmercury in North Sea and Scheldt Estuary fish. *Environmental Contamination and Toxicology*, 45: 498-508.

Bastos W.R.; Malm, O.; Pfeiffer, W.C.; & Cleary, D. 1998. Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brazil. *Ciência Cultura*, 50: 255-260.

Berntssen, M.H.; Aatland, G.A. & Handy, R.D. 2003. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquatic Toxicology*, 62: 55-72.

Boudou, A. & Ribeyre, F. 1985. Experimental study of trophic contamination of salmo gairdneri two mercury compounds HgCl<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub>HgCl – analysis at the organism and organ level. *Water Air Soil Pollution.*, 26: 137–148.

Boudou, A. & Ribeyre, F. 1989. Fish as biological models in aquatic ecotoxicology. *In: Boudou, A., Ribeyre, F. (Eds.), Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies, vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL, 127-162.*

Boudou, A. & Ribeyre, F. 1997. Aquatic Ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environmental Health Perspectives Supplements, 105: 21-35.*

Boylard, E. & Chasseaud, L.F. 1969. The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Advances in Enzymology and Related Areas Molecular Biology, 32: 173-219.*

Brambila, E.; Liu, J.; Morgan, D.L.; Beliles, R.P., & Waalkes, M.P. 2002. Effect of mercury vapor exposure on metallothionein and glutathione s-transferase gene expression in the kidney of nonpregnant, pregnant and neonatal rats. *Jornal Toxicology Environmental Health, 65:1273-1288.*

Canesi, L.; Viarengo, A.; Leonzio, C.; Filippelli, M. & GALLO, G. 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology, 46: 67–76.*

Carlberg, I. & Mannervik, B. 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymology, 113: 484-490.*

Chatterjee, S. & Bhattacharya, S. 1984. Detoxification of industrial pollutants by the glutathione-S-transferase system in the liver of *Anabas testudineus* (Bloch). *Toxicology Letters, 22:187–198.*

Davidson, T., Qingdong, K., & Costa, M. 2007. Selected Molecular Mechanisms of Metal Toxicity and Carcinogenicity, Chapter 5, *In: Gunnar F. Nordberg, Bruce A. Fowler, Monica Nordberg, 3<sup>o</sup> (Eds.), Handbook on The Toxicology of Metals, 969p.*

Di Simplicio, P., & Leonzio, C. 1989. Effects of selenium and mercury on glutathione and glutathione dependent enzymes in experimental quail. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology, 42: 15–21.*

Drevnick, P.E.; Roberts, A.P.; Otter, R.R.; Hammerschmidt, C.R.; Chad, R.K.; Rebecca, O. & JAMES, T. 2008. Mercury toxicity in livers of northern pike (*Esox lucius*) from Isle Royale, USA. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology*, 147(3):331-338.

Elia, A.C.; Dorr, A.J.M.; Mantilacci, L.; Taticchi, M.I. & Galarini, R. 2000. Effects of mercury on glutathione and glutathione-dependent enzymes in catfish (*Ictalurus melas*). In: Market, B., Friesa, K. (Eds.), Trace elements- their distribution and effects in the environment: Trace metals in the environment, vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam.

Elia, A.C.; Galarini, R.; Taticchi, M.I.; Dorr, A.J.M. & Mantilacci, L. 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 162-167.

Español, S.C. 2001. Toxicología del mercurio. *Actuaciones preventivas en sanidad laboral y ambiental. Jornada Internacional sobre el impacto ambiental del mercurio utilizado por la minería aurífera artesanal en Iberoamérica*. Lima, Peru.

Glock, G. E. & McLean, P. 1953. Further studies on the properties and glucosa-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *The Biochemical Journal*, 55: 400-408.

Goyer, R.A. 1986. Toxic effects of metals. In: Klassen, C.D, Amdur, M.O, and Doull, J. (Eds.). *Toxicology (The Basic science of poisons)*. Macmillan Publ. Co., New York, 582-635.

Gomes, R. A. 2007. Bioacumulação de mercúrio e caracterização histológica e ultraestrutural do tecido nervoso de *Hoplias malabaricus* (traíra-Block, 1794) sob o efeito da exposição in vivo por mercúrio. Dissertação de mestrado. Centro de Biociência e Biotecnologia. UENF.43p.

Gstaunthaler, C.; Pfaller, W. & Kotank, P. 1993. Glutathione depletion and *in vivo* lipid peroxidation in mercury or maleate-induced acute renal failure. *Biochemistry Pharmacology*, 32: 2969-272.

Heisinger, J.F., & Scott, L. 1985. Selenium prevents mercuric chloride induced acute osmoregulatory failure without glutathione peroxidase involvement in the black bullhead (*Ictalurus melas*). *Comparative Biochemical Physiology C*, 80: 295–297.

Hogstrand, C. & Haux, C. 1991. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100: 137–141.

Hush, J. B. 1985. Partition coefficients of mercury (203 Hg) vapor between air and biological fluids. *Journal of Applied Toxicology*, 5: 327-332.

Keen, J.H.; Habig, W.H. & Jakoby, W.B. 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 251: 6183-6188.

Larose, C.; Canuel, R.; Lucotte, M. & Di Giulio, R.T. 2008. Toxicological effects of methylmercury on walleye (*Sander vitreus*) and perch (*Perca flavescens*) from lakes of the boreal forest. *Comparative Biochemistry and Physiology, C*, 147: 139-149.

Lash, L.H. & Zalups, R.K. 1996. Alterations in renal cellular glutathion metabolism after *in vivo* administration of a subtoxic dose of mercury chloride. *Journal Biochemical Toxicology*, 11: 1-9.

Leaner, J.J. & Mason, R.P. 2001. The effect of thiolate organic compounds on methylmercury accumulation and redistribution in sheepshead minnows, *Cyprinodon variegates*. *Environmental Toxicology Chemical*, 20: 1557-1563.

Lemaire, P.; Matthews, A.; Foerlin, L. & Livingstone, D.R. 1994. Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and

perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Archives Environmental Contamination Toxicology*, 26: 191-200.

Liao, C.Y.; Zhou, Q.F.; Shi, J.J.B. & Fu, G. & Jiang, B. 2005. Mercury Accumulation and Distribution in Medaka after the Exposure to Sublethal Levels of Methylmercury. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 75:584–591.

Livingstone, D.R. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environmental. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, 57: 195-211.

Maracine, M., & Segner, H. 1998. Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: importance of the cellular glutathione status. *Comparative Biochemical Physiology, A* 120: 83–88.

McCord, J.M. & Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Jornal Biology Chemical*, 244: 6049-6055.

McGuire, S.; Dagget, D.A.; Bostad, E.; Nelson, S.; Wright, L.S.; Siegel, F.L. & Kornguth, S. 1997. Increased levels of glutathione S transferases and appearance of novel alpha class isoenzymes in kidneys of mice exposed to mercuric chloride. I. Biochemical and immunohistochemical studies. *Nephron*, 77: 452–460.

Mela, M.; Filipak Neto, F.; Oliveira Ribeiro, C.A. & Ventura, D.F. 2008. Avaliação dos efeitos tóxicos do metilmercúrio em fígado de *Hoplias malabaricus*, traíra, através de biomarcadores de estresse oxidativo. *In: X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*, 2008, Bento Gonçalves.

Mela, M.; Randi, M.A.F; Ventura, D.F; Carvalho, C.E.V; Pelletier, E. & Oliveira Ribeiro, C.A. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68: 426-435.

Morel, F.; Kraepiel, A. & Amyot, M. 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review Ecology, Syst*, 29: 543-566.

Oliveira Ribeiro, C.A.; Fanta, E.; Turcatti, N.M.; Cardoso, R.I. & Carvalho, C.S. 1996. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis*. *Biocell*, 20: 171–178.

Oliveira Ribeiro, C.A.; Rouleau, C.; Pelletier, E.; Audet, C. & Tjalve, H. 1999. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Science Techonology*, 33: 902-907.

Oliveira Ribeiro, C.A.; Mesmer-Dudons, Gonzalez, P.; Yannick, D.; Bourdineaud, J.; Boudou, A. & Massabuau, J. C. 2008. Chronic and Trophic Effects of Methylmercury on Zebrafish Muscle Fibers. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25: 304-305.

Olson, K.K.; Squibb, K.S. & Cousins, R.J. 1978. Tissue uptake, subcellular distribution, and metabolism of  $^{14}\text{CH}_3\text{HgCl}$  by *rainbow trout*, *Salmo gairdneri*. *Journal Fisher Research Board Canadian*. 35:381-390.

Pfeiffer, E. 1995. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. Eds. Tessier, A., Turner, D.R. John Wiley e Sons Ltd.

Rabenstein, D.L. 1989. Metal complexes of glutathione and their biological significance. In: Dolphin, D., Auramovibc, O., Poulson, R. (Eds.), *Glutathione: Chemical Biochemical and Medical Aspects: Coenzymes and Cofactors.*, Vol. 3. Wiley, New York, 147-186.

Schlenk, D.; Zhang, Y.S. & Nix, J. 1995. Expression of hepatic metallothionein messenger RNA in feral and caged fish species correlates with muscle mercury levels. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 31: 282-286.

Schultz, R.I.; Peters, L.E. & Newman, C.M. 1996. Toxicokinetics and disposition of inorganic mercury and cadmium in channel catfish after intravascular administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 140:39-50.

Sen, A. & Semiz, A. 2007. Effects of metals and detergents on biotransformation and detoxication enzymes of leaping mullet (*Lisa saliens*). *Ecotoxicology Environmental Safety*, 68 (3): 405-411.

Serra, R.; Barghigiani, C.; Rossi, A.; Cattani, O. & Carpené, E. 1996. Mercury concentrations in tissues of *Solea solea* treated with HgCl<sub>2</sub>. *Oebalia*, 22: 113-118.

Skak, C. & Batrup, E. 1993. Quantitative and histochemical demonstration of mercury deposits in the inner-ear of trout, salmo-trutta, exposed to dietary methylmercury and dissolved mercuric-chloride. *Aquatic Toxicology*. 25: 55-70.

Stein, E.D.; Cohen, Y. & Winer, A.M. 1996. Environmental distribution and transformation of mercury compounds. *Critical Review Environmental Science Technology*, 26: 1-43.

Stohs, S.J. & Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 2: 321–336.

Thomas, P. & Wofford, H.W. 1984. Effects of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine and acid-soluble thiol levels in mullet (*Mugil cephalus*). *Toxicology Applied Pharmacology*, 76: 172-182.

Van Der Oost, R.; Beyer, J. & Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.

Walczak, B.Z.; Hammer, U.T & Huang, P.M. 1986. Ecophysiology and mercury accumulation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) when exposed to mercury in various concentrations of chloride. *Canadian Journal Fisheries Aquatic Sciences*, 43, 710-714.



Wendel, A. 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymology*. 77: 325-333.

WHO, INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY. 1990. *Environmental Health Criteria: Methylmercury*. Geneva: World Health Organization, p. 101-144.

Wiener, J.G. & Spry, D.J. 1996. Toxicological significance of mercury in freshwater fish. Pp. 297-339. *In*: Beyer, W.N.; Heinz, G.H; Redmon-Norwood, A.W. (eds.), *Environmental contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentration*. Florida: Lewis Publishers; Boca Raton, 494p.

Woods, J.S.; Calas, C.A.; Aicher, L.D.; Robinson, B.H. & Mailer, C. 1990a. Stimulation of porphyrinogen oxidation by mercury ion. Evidence of free radical formation in the presence of thiol and hydrogen peroxide. *Molecular Pharmacology*, 38: 253-260.

Woods, J.S.; Calas, C.A.; Aicher, L.D.; Robinson, B.H. & Mailer, C. 1990b. Stimulation of porphyrinogen oxidation by mercury ion. Promotion of oxidation from the interaction of mercury ion, glutathione and mitochondria-generated hydrogen peroxide. *Molecular Pharmacology*, 38: 261-266.

Yediler, A. & Jacobs, J. 1995. Synergistic effects of temperature, oxygen and water flow on the accumulation and tissue distribution of mercury in carp (*Cyprinus carpio*) *Chemosphere*, 31: 4437- 4453.

Zakharov, V.M. & Clarke, G.M. 1993. Biotest: a new integrated biological approach for assessing the condition of natural environments. International Foundation, Russian Affiliate, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian.

Zheng, W.; Aschner, M. & Ghersi-Egea, J.-F. 2003. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192: 1–11.

### CAPÍTULO III.

Histological and Hematological Variables in *Hoplias malabaricus* After Acute Intraperitoneal Administration of Organic and Inorganic Mercury.

## Histological and Hematological Variables in *Hoplias malabaricus* After Acute Intraperitoneal Administration of Organic and Inorganic Mercury.

Táise Bomfim de Jesus<sup>1</sup>, Sérgio Bonadiman<sup>1</sup>, Renato Augusto DaMata<sup>1</sup>, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro<sup>2</sup>, Carlos Eduardo Veiga de Carvalho<sup>1</sup>.

1-Laboratório de Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Norte Fluminense

2- Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná

taisebj@hotmail.com

### Abstract

Mercury is a highly toxic metal found in sites where metabolically active. Because of this ability and also the possibility toxic to biomagnify along the food chain, this metal is considered of high ecotoxicological risk to aquatic organisms. In this study, individuals of the species *Hoplias malabaricus*, Traíra, were treated by intraperitoneal injection with organic mercury (MeHg) and inorganic mercury (HgCl<sub>2</sub>) for up to 96 hours of exposure. To evaluate the toxic effects of Hg were control groups of individuals are treated. The objective was to evaluate the occurrence of histological and hematological effects caused by acute treatment with MeHg and HgCl<sub>2</sub>. Responses histopathological kidney and liver have clearly differentiate animals contaminated by organic and inorganic mercury in control animals. Injuries and damages to tissues suggest too slow defense mechanisms to immobilize or eliminate exposition methylmercury and mercury chloride, demonstrating that sensitivity of fish cells to MeHg and HgCl<sub>2</sub> exposure. Significant reduction (PCV after 72 hours of Hg after 48 hours of WBC after 48 and 72 hours and lymphocytes, after 24 and 72 hours) in some blood parameters in individuals treated with MeHg was observed. In individuals treated with HgCl<sub>2</sub> only the WBC, after 72 hours, varied significantly. These results indicate that the toxic effects caused by Hg depend on the chemical form of metal and that the biomarkers used in this study give efficient responses to contribute in the environmental monitoring in areas impacted by mercury.

## Variáveis Histológicas e Hematológicas em *Hoplias malabaricus* Após a Administração Intraperitoneal Aguda ao Mercúrio Orgânico e Inorgânico.

Táise Bomfim de Jesus<sup>1</sup>, Sérgio Bonadiman<sup>1</sup>, Renato Augusto DaMata<sup>1</sup>, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro<sup>2</sup>, Carlos Eduardo Veiga de Carvalho<sup>1</sup>.

1-Laboratório de Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

2- Laboratório de Toxicologia Celular, Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

taisebj@hotmail.com

### Resumo

O mercúrio é um metal altamente tóxico quando encontrado em sítios metabolicamente ativos. Dada a essa capacidade tóxica e também a possibilidade de se biomagnificar ao longo da cadeia alimentar, este metal é considerado de alto risco ecotoxicológico para os organismos aquáticos. Neste trabalho indivíduos da espécie *Hoplias malabaricus*, traíra, foram tratados através de injeção intraperitoneal com mercúrio orgânico (MeHg) e mercúrio inorgânico ( $\text{HgCl}_2$ ) por até 96 horas de exposição. Para avaliar os efeitos tóxicos do Hg foram feitos grupos controle de indivíduos não tratados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de efeitos histológicos e hematológicos ocasionados pelo tratamento agudo com MeHg e  $\text{HgCl}_2$ . As respostas histopatológicas renais e hepáticas permitiram diferenciar claramente os animais contaminados por mercúrio orgânico e inorgânico dos animais controle. A incidência de necroses e centros de melanomacrófagos, principalmente nos rins, de peixes contaminados por mercúrio (orgânico ou inorgânico) aponta para o comprometimento deste tecido. Redução significativas (hematócrito, após 72 horas, de Hg, após 48 horas, de leucócitos, após 48 e 72 horas e dos linfócitos, após 24 e 72 horas) em alguns parâmetros sanguíneos nos indivíduos tratados com MeHg foram observadas. Em indivíduos tratados com  $\text{HgCl}_2$  apenas os leucócitos, após 72 horas, variaram significativamente. Estes resultados indicam que os efeitos tóxicos ocasionados pelo Hg dependem da forma química deste metal e que os biomarcadores utilizados nesse estudo são eficientes para auxiliar nas respostas ao monitoramento ambiental em áreas impactadas por mercúrio.

## 1. Introduction

Mercury has no known biological functions in the animal body and is described as an ultratrace element (Lall, 1989; Allen, 1994; Azevedo, 2003). Consequently, there is no well defined regulatory mechanism present in the animal body and mercury tends to accumulate readily when available in an animal's environment. Sources of mercury include the chloroalkali industry, the manufacture of electrical equipment, paint, fungicides and dentistry (Micaroni *et al.*, 2000). The use of mercury in the gold mining industry has caused extensive pollution in the Amazon Basin (Lacerda, 1990). Whether fish take up organic or inorganic mercury, most of it accumulates in the tissues in the organic form. Most cases of mercury poisoning arising from fish consumption are due to methylmercury because mercury entering the aquatic system rapidly becomes methylated. Minamata disease in humans was first reported in 1956 due to consumption of contaminated fish and shellfish from Minamata Bay. Therefore it is important to monitor the mercury content of fish which are caught or farmed for human consumption. Since many commercial animal feeds contain a fish meal component, monitoring is important from the aspect of contamination of farm animals intended for human consumption (Allen, 1994).

Carnivorous fish tissues are sensitive indicators of aquatic pollution and have a high mercury bioaccumulation capacity for both organic and inorganic forms (Gochefeld, 2003). Although many reports on mercury distribution and speciation, accumulation and effects in non-tropical freshwater fish species are available, experimental study of data on mercury in tropical fish and its toxic effects on fish tissues and organs are scarce (Mella *et al.* 2007; Oliveira Ribeiro *et al.* 2002). Traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch), is a freshwater carnivorous fish widely distributed in South America. This species is an interesting biological model for experimental study of dietary exposure to contaminants due to its voracious behavior, its ability to adapt to experimental conditions, and its food chain position. In addition, *H. malabaricus* have one of the greatest tolerances to food deprivation recorded, surviving for periods of up to 180 days without reduction in metabolic rates (oxygen uptake) (Costa *et al.* 2007; Rios *et al.*, 2005).

According to Hinton & Lauren (1990), the liver is a detoxification organ and is essential for both the metabolism and the excretion of toxic substances in the body.

Exposure to metals may therefore cause histological changes in the liver and a histological investigation of exposed specimens may therefore produce meaningful results. Bruslé & González Anadon (1996) state that fish liver histology could serve as a model for studying the interactions between environmental factors and hepatic structures and functions. The harmful effect of heavy metal pollution on fish liver histology may, however, depend on the duration of the exposure (chronic or acute) and the concentration level of the specific metal.

Many authors have studied the histopathological effects of mercury on fish exposed to water-borne inorganic mercury on liver, kidneys, gills, olfactory epithelium, and spleen (Filenko *et al.*, 1989; Skak & Bastrup, 1993; Handy & Penrice, 1993; Allen, 1994; Banerjee & Bhattacharya, 1994; Oliveira Ribeiro *et al.*, 1995, 1996; Oliveira Ribeiro & Torres, 1995; Jagoe *et al.*, 1996a; Samson & Shenker, 2000). Another biomarker used in diagnoses is the hematological profile. This can be used to study the normal cell pattern (morphology and percentages) (Garcia-Navarro, 1994; Ranzani-Paiva *et al.*, 1999), alterations in blood parameters revealing lesions in other organs or tissues (Garcia-Navarro, 1994), or to help breeding, given that changes in the hematological profile may indicate infestations and infections or even environmental changes (Ranzani-Paiva *et al.*, 1999). According to Serpunin & Likhatchyova (1998), the blood parameters of a fish species are true indicators of the health state of the organism, and white blood cell tests play an important role in the monitoring of contaminated surface waters (Trombickij & Gorbunenko, 1993 *apud* Modra *et al.*, 1998).

This study aimed to assess the influence of the acute exposition of organic and inorganic mercury, through intraperitoneal injection on fish. The specie *H. malabaricus* were used as a bioindicator; the hematological profile and morphological alterations in liver, kidney were used as biomarkers.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Animals

*Hoplias malabaricus* specimens were monthly collected, between July and October 2007, in lakes located at Itaocara municipality, northwest of Rio de Janeiro State (21°40'44''S e 42° 04' 53'' W). The lakes are located within a forested area with

very little influence of anthropogenic and point sources of pollutants, no agricultural activities were placed in the surroundings and in the lake catchment.

After the sampling the specimens were transported to the laboratory in plastic bags. In the laboratory the wounded and sick specimens were discarded in order to use only health specimens in the experiment. The organisms were placed in aquariums with continuous water flux for seven days for acclimatization. Table 1 present the number of the specimens used in the experiment in each of the exposure times.

## 2.2 Experimental design

A solution of methylmercury (MeHg) was intraperitoneally injected in fish administrated in an unique doses of  $0.75\mu\text{g}$  in a  $0.1\text{ mL}$  volume, and mercury chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) solution was also administrated in an unique doses of  $75\ \mu\text{g}$ . The concentration used was established in a previous study with the same fish specie (Ribeiro *et al.*, 2006). The concentration used was established according with a previous study developed with trophic contamination with the same fish species (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2006). Intraperitoneal injection of toxicants into laboratory animals is also a common procedure. This method the exposition results in rapid absorption of chemical substances because of the rich blood supply and the relatively large surface area of the peritoneal cavity (Casarett & Doull's, 2001).

After the injection of the Hg solution, fishes were placed in aquariums and at 24, 48, 72 and 96 hours the specimens were measured, weighted and necropsy in order to remove tissue samples from liver, gills and kidney. During all time intervals control samples were also collected from fishes that received only an injection of  $0.1\text{ mL}$  of PBS.

## 2.3 Tissue Sampling and Processing for Histological Analysis

Liver, gills, and kidney were collected, and preserved in Alfac fixative solution for 16 h (85 mL the ethanol 80%; 10 mL the formol 40% and glacial acetic acid-5 mL, for each 100 mL solution). Tissue were dehydrated in a alcohol graded series, cleared in xylene, infiltrated and embeded in Paraplast Plus resin (Sigma). The sliced

sections (5µm) were stained in hematoxilin/eosin and observed in Zeiss Axiophot photomicroscope.

Table 1. Number of kidney, gill and liver samples analyzed in each time exposure experiments of the used *Hoplias malabaricus* specimens.

	Liver	Kidney	Gills
MeHg	5	5	5
HgCl <sub>2</sub>	5	5	5
Control	10	10	10

## 2.4 Blood Sampling and Analysis

Blood analyses were carried out after each exposition period (Table 2.). Blood was collected by caudal vein with heparinized disposable syringes. Erythrocytes count (RBC), packed cell volume (PCV), hemoglobin concentration (Hb), white blood cell count (WBC) and differential white cell count in blood smear, stained with May Grünwald-Giemsa, were carried out. Erythrocyte indices such as mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated. All steps followed the methodology described by Campbell (2004).

Table 2. Number of samples analyzed in each time exposure experiments of the used *Hoplias malabaricus* specimens.

Treatments	Time exposure (hours)			
	24	48	72	96
MeHg	5	5	5	5
HgCl <sub>2</sub>	5	5	5	5
Control	5	5	5	5

## 3. Results

### 3. Hematologic Profile Analyses

The hematological parameters of the specimens of *H. malabaricus* receiving organic or inorganic mercury did not differ significantly with respect to time after treatment of specimens with mercury. However, when compared alone in times of exposure different treatments showed some significant differences in the control (Table 3 and 4).



In specimens exposure with methylmercury the PCV and lymphocytes were lower in the 72 hours group. Fishes from the 48 hours group presented lower levels of hemoglobin. WBC values decreased in 48 and 72 hours groups respectively. Beside there was no significant differences between the values, a decrease in PCV, RBC, Hb and WBC was noted on fishes treated for 48 and 72h.

Table 3. Blood pattern analyzed in each time exposure methylmercury experiments of the used *H. malabaricus* specimens

Blood Pattern	Time exposure (hours)				
	Control	24	48	72	96
PCV (%)	22,6 ± 2,2	19,9 ± 5,7	16,0 ± 2,2	15,2 ± 2,6*	19,8 ± 6,0
RBC ( $\cdot 10^6/\text{mm}^3$ )	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,5	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,4	1,7 ± 0,3
Hb (g/dL)	5,0 ± 0,8	4,1 ± 1,0	3,4 ± 0,8*	3,9 ± 1,0	4,8 ± 1,1
MCV (fL)	154 ± 35,7	155 ± 24,1	170 ± 48,1	168 ± 73,3	117 ± 32,1
MCHC (%)	22,6 ± 4,8	22,2 ± 3,0	21,4 ± 3,4	25,3 ± 3,3	25,3 ± 5,6
TB ( $\cdot 10^3/\text{mm}^3$ )	42,0 ± 19,1	27,0 ± 10,4	41,7 ± 8,9	32,6 ± 11,1	43,7 ± 13,3
WBC ( $\cdot 10^3/\text{mm}^3$ )	4,4 ± 1,0	3,2 ± 1,4	3,1 ± 1,6*	2,5 ± 0,4**	3,6 ± 2,0
Lymphocytes (%)	76,4 ± 4,3	67,2 ± 4,1**	69,8 ± 5,2	68,0 ± 4,6*	72,6 ± 5,0
Lymphocytes ( $\cdot 10^3/\text{mm}^3$ )	3,4 ± 0,7	2,2 ± 1,0*	2,2 ± 1,4	1,7 ± 0,4***	2,7 ± 1,7
Monocytes (%)	4,0 ± 2,9	6,2 ± 2,8	5,4 ± 2,7	4,4 ± 2,9	4,0 ± 0,7
Monocytes ( $\cdot 10^3/\text{mm}^3$ )	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Neutrophils (%)	18,5 ± 6,1	25,6 ± 3,0	23,8 ± 3,7	26,6 ± 1,8	22,8 ± 4,4
Neutrophils ( $\cdot 10^3/\text{mm}^3$ )	0,9 ± 0,4	0,8 ± 0,3	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,3
Eosinophils (%)	1,0 ± 1,2	0,8 ± 0,8	1,0 ± 1,0	1,0 ± 1,4	0,6 ± 0,9
Eosinophils ( $\cdot 10^3/\text{mm}^3$ )	0,04 ± 0,05	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,04
Basophils (%)	0,1 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0	0	0
Basophils ( $\cdot 10^3/\text{mm}^3$ )	0,01 ± 0,01	0,002 ± 0,004	0	0	0

\* significantly different in relation to control,  $p < 0,05$

In “traíras” contaminated with mercury chloride for 72 hours presented lower values for WBC. Like the methylmercury group, a decrease of PCV, RBC and TB

values was detected at the 24, 48, and 72 hours group. But a slight increased in MCHC and MCV was noted in these groups.

Table 4. Blood pattern analyzed in each time exposure mercury chloride experiments of the used *H. malabaricus* specimens

Blood pattern	Time exposure (hours)				
	Control	24	48	72	96
PCV (%)	22,6 ± 2,2	19,4 ± 3,4	19,8 ± 4,3	19,4 ± 7,3	27,8 ± 9,4
RBC (.10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,4	1,4 ± 0,6
Hb (g/dL)	5,0 ± 0,8	3,9 ± 0,7	4,9 ± 1,2	5,5 ± 1,4	5,3 ± 2,4
MCV (fL)	154 ± 35,7	209 ± 52,8	173 ± 27,1	187 ± 14,9	209 ± 53,2
MCHC (%)	22,6 ± 4,8	20,6 ± 4,3	24,6 ± 1,3	29,7 ± 4,3	19,2 ± 5,8
TB (.10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	42,0 ± 19,1	42,9 ± 19,6	42,4 ± 12,4	39,0 ± 11,5	29,4 ± 9,4
WBC (.10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,4 ± 1,0	4,1 ± 1,3	3,5 ± 1,2	3,0 ± 0,5*	3,5 ± 1,4
Lymphocytes (%)	76,4 ± 4,3	75,0 ± 4,8	68,2 ± 3,6	70,8 ± 7,9	73,4 ± 4,0
Lymphocytes (.10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	3,4 ± 0,7	3,1 ± 1,1	2,3 ± 0,8	2,1 ± 0,5	2,5 ± 0,9
Monocytes (%)	4,0 ± 2,9	1,8 ± 1,6	4,2 ± 2,5	3,4 ± 2,5	3,4 ± 1,7
Monocytes (.10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Neutrophils (%)	18,5 ± 6,1	23,0 ± 4,7	27,0 ± 3,2	25,6 ± 5,9	22,2 ± 2,8
Neutrophils (.10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,4
Eosinophils (%)	1,0 ± 1,2	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0,8 ± 1,1
Eosinophils (.10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0,04 ± 0,05	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,05
Basophils (%)	0,1 ± 0,4	0	0,2 ± 0,4	0	0,2 ± 0,4
Basophils (.10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0,01 ± 0,01	0	0,01 ± 0,02	0	0,01 ± 0,03

\* significantly different in relation to control, p<0,05

### 3.2 Histopathological Analyses

Gill epithelium of control group was similar to that of other teleostean fishes. In “traíras” experimental group (MeHg and HgCl<sub>2</sub>) did not show gill histopathological alterations.

The normal liver parenchyma of both species had the teleost fish pattern, in which polygonal cells, similar to liver cells, were arranged in irregular cell cords separated by sinusoids (Figure 1A). The liver of *H. malabaricus* presented melanomacrophage centers. Fatty and hydropic degeneration, eosinophilic hepatocytes were not observed, but vacuolization and necrosis (Figure 1F) were present in the experimental group (MeHg and HgCl<sub>2</sub>) when compared to the control group (Table 5). Also the presence of MMCs (Figure 1E) was not significantly higher in the experimental group (MeHg and HgCl<sub>2</sub>) than in the control group (Figure 2.).

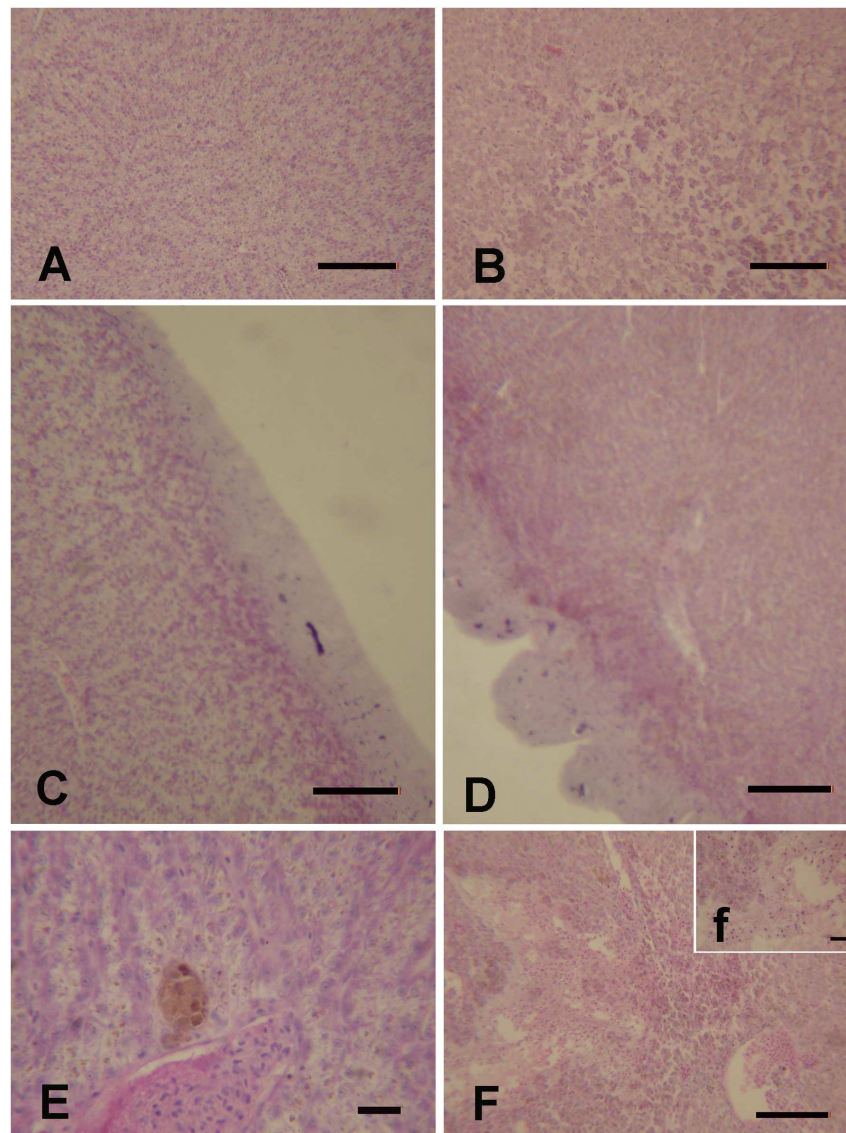


Figure 1. Cross-section of liver of *Hoplias malabaricus* stained with hematoxilin/eosin: A (control - normal liver parenchyma), B (trated with HgCl<sub>2</sub> – spacing of the tissue), C (control – uniformity the external layer parenchyma), D (trated with HgCl<sub>2</sub> – spacing the external layer parenchyma) e F (trated with MeHg – necrosis areas), Scale bar= 100 µm. E (trated with MeHg – presence de MMCs) e f (trated with MeHg – necrosis areas), Scale bar= 20 µm.

Table 5. Injuries observed in the liver of “traíras” treated and control (in brackets shows the number of tissues examined).

Líver			
Injuries	Control	HgCl <sub>2</sub>	MeHg
Necrosis	3 (10)	3 (5)	5 (5)
MMCs	3 (10)	4 (5)	4 (5)
MM	1 (10)	2 (5)	4 (5)
Vacuolization	0 (10)	1 (5)	0 (5)

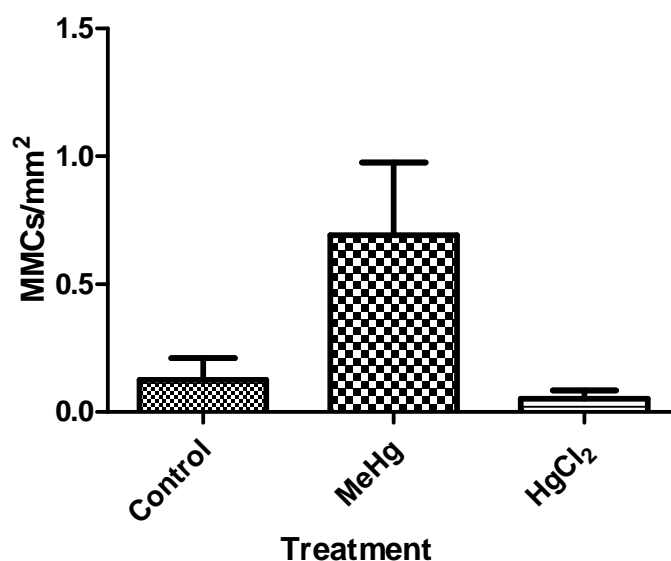


Figure 2. Summary of liver damages after MeHg e HgCl<sub>2</sub> exposure and control showing the incidence of melano-macrophage center (MMCs/mm<sup>2</sup>).

The head kidney of *H. malabaricus* is composed by a variety of cells including parenchymal, lymphoid and haematopoietic, interregal and chromaffin glands, and also groups of melano-macrophages. After the organic and inorganic mercury inoculation the presence of necrosis areas were not observed (Table 6) absent in the control group (Figure 3A). Also the presence of MMCs was not significantly higher in the experimental group (MeHg and HgCl<sub>2</sub>) than in the control group (Figure 4).

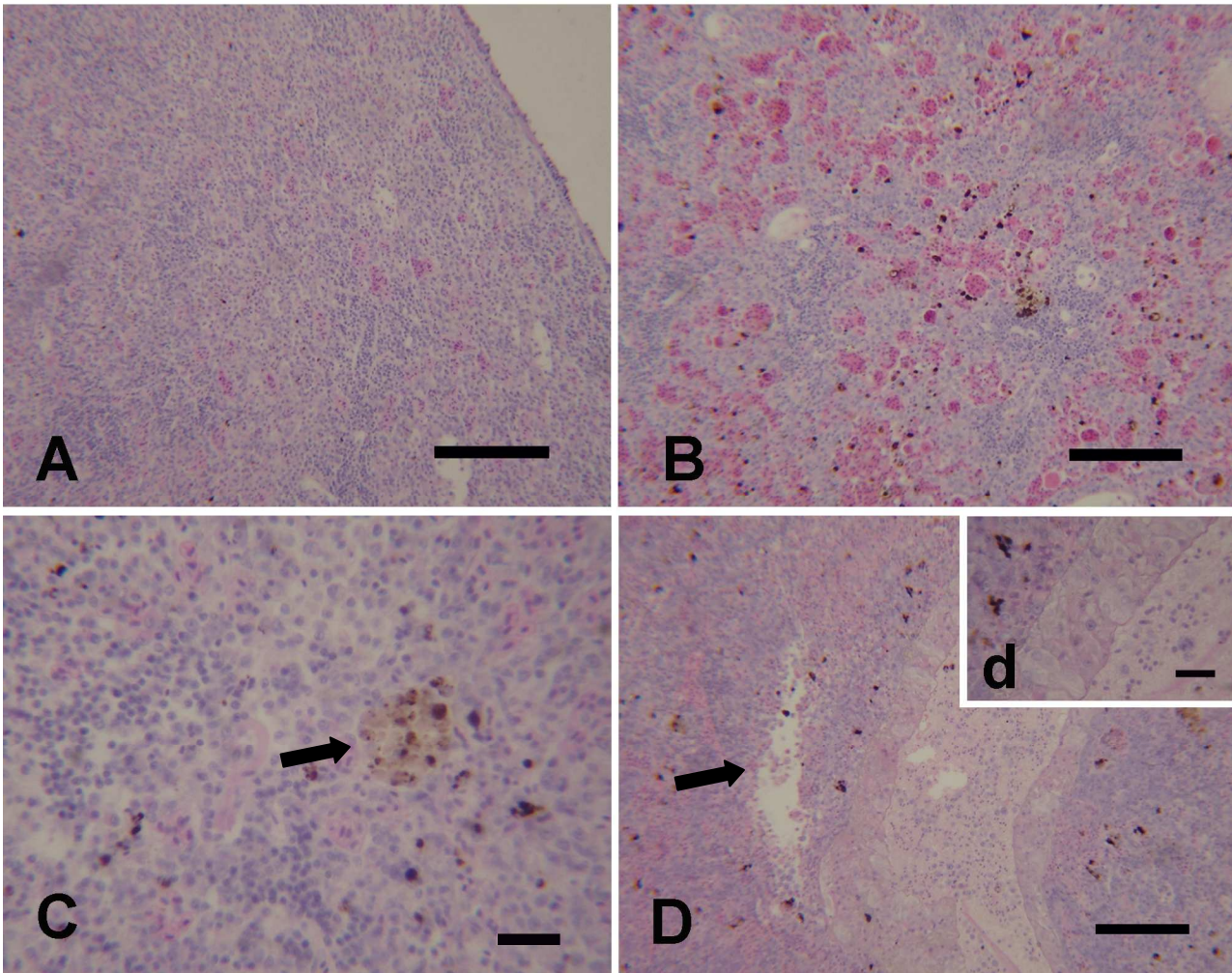


Figure 3. Cross-section of kidney of *Hoplias malabaricus* stained with hematoxylin/eosin: A (control - normal kidney parenchyma), B (treated with  $\text{HgCl}_2$  – melano macrophage free) e D (treated with MeHg – necrosis areas), Scale bar= 100  $\mu\text{m}$ . C (treated with MeHg - presences de MMCs) e d (treated with MeHg), Scale bar= 20 $\mu\text{m}$ .

Table 6. Injuries observed in the kidney of “traíras” treated and control (in brackets shows the number of tissues examined).

Kidney			
Injuries	Control	HgCl <sub>2</sub>	MeHg
Necrosis	3 (10)	3 (5)	5 (5)
MMCs	2 (10)	4 (5)	5 (5)
MM	5 (10)	5 (5)	5 (5)

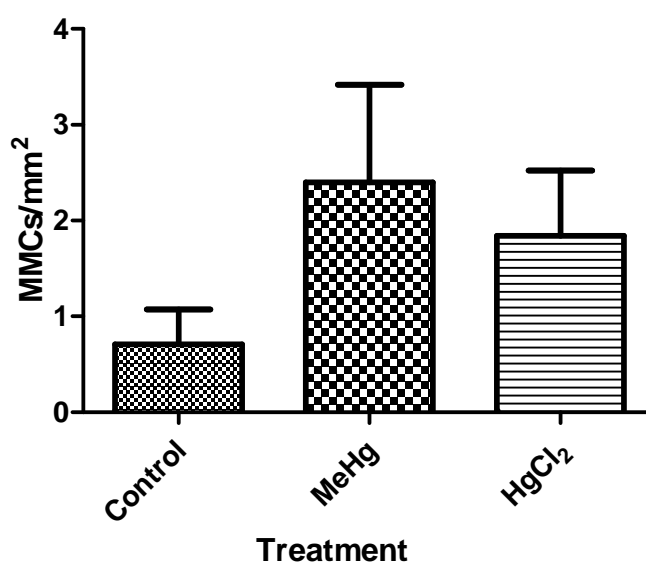


Figure 4. Summary of kidney damages after MeHg e HgCl<sub>2</sub> exposure and control showing the incidence of melano-macrophage center (MMCs/mm<sup>2</sup>).

#### 4. Discussion

Blood parameters are considered an important resource in physiopathologic evaluation and consequently a great tool in fish intoxication diagnoses (Adhikari *et al.* 2004).

The heterogeneity in fish blood cells morphology and parameters could be explained by the large distribution of this class in different habitats around the world (Silva, 1987). Thus, the establishment of hematological parameters for one specie requires attention and good sense, once those values could be influenced by many

factors such as season, injuries, management and capture technique, beside all the environmental factors (Heath, 1987).

According to many authors, fresh water fishes from lentic habitat presents less hemoglobin concentration than migratory species from lotic habitat (Silva, 1987). Paiva *et al.* (2000), studying species from Paraná River in State of Paraná, Brazil, found larger values of Hb in migratory species, from 7,3 to 9,7 mg/dL, as *Prochilodus lineatus*, *Serrasalmus marginatus* and *Pimelodus maculatus*, compared to some siluriforms of sedentary habits (4,0 to 4,6 mg/dL). Others authors registered main Hb for fresh water fishes around 6,6 mg/dL and 13 mg/dL for migratory species from lotic habitat (Pitombeira, 1972; Ribeiro, 1978; Ranzani-Paiva e Godinho, 1985). In this way, main Hb of “traíras” from the control group fit inside the medium values previously registered, as normal, for species from lentic habitat. In fact, those fishes were captured in small dams, with typical characteristic of lentic habitat. As well, the exposition to chemical pollutants or hypoxia can cause changes in this parameter. In this work, *H. malabaricus* exposed to MeHg over 48 hours presented a significantly ( $p < 0,05$ ) decrease in Hb compared to the control group, porém there was no difference in fishes treated with  $HgCl_2$ . However, a little decrease was noticed in 24 hours after contamination with  $HgCl_2$ .

Mela (2004) observed an increase in RBC, WBC, PCV, Hb and thrombocytes after exposition trophic to methylmercury. Dawson (1990) observed a lightly increase in PCV and decrease of Hb in *Scophthalmus aquosus* submitted to different concentrations of  $HgCl_2$  in water. Micryakov & Lapirova (1997) besides the decrease in Hb level, noticed an increase in WBC in *Acipenser baeri*.

In the other hand, this study showed a decrease in all these parameters. While there was no significant difference of RBC and Hb between control group and fishes contaminated with both types of mercury.

So, Shakooriri *et al.* (1994) studying *Ctenopharyngodon idella* exposed to  $HgCl_2$  ( $0,0005 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Hg}$ , in water), observed a decrease in RBC, PCV and Hb on the first two weeks after contamination, but an increase in MCV was noticed on the fourth week after exposition. Similar results were obtained by Beena & Viswaranjan (1987) and Hilmy *et al.* (1980) for *Cyprinus carpio* e *Aphanius díspar*, respectively. O'Connor & Fromm (1975) related the diminution in levels of RBC and PCV with the hemolytic process occurred during the intoxication by Hg. Fletcher & White (1986) explain this parameters break down by the spleenmegaly observed in toxicity experimentation

with  $\text{HgCl}_2$  in *Pleuronectes platessa*, since this organ is responsible for erythrocytes recycling. According to his results the decrease of PCV is related to spleen mass increase. In the other hand, some authors affirm that the diminution on PCV in this type of experimentation could be related to stress in confinement process or starving (Benfey & Biron, 2000; Affonso *et al.*, 2002). As all groups passed by an acclimation period those hypothesis are discarded.

Different and diverging results can occur due to some factors as body size, species, contaminant concentration and period of exposition (Fletcher & White, 1986). In similar experiments conducted with *Channa punctatus* (Juneja & Mahajan, 1983) and rainbow trout (O'Connor & Fromm, 1975) was noted an elevation on RBC and PCV. These last authors observed a decrease on PCV in the beginning of the experiment, but this value increase in the end of 12 weeks. O'Connor & Fromm (1975) mentioned the possibility that was stimulation on the erythropoietic tissue in response to the diminution on RBC caused by the exposition. Moreover, Oliveira-Ribeiro *et al.* (2000) related that fishes exposed to inorganic Hg dissolved in water present hypoxia, caused by the hyperplasia of secondary gills lamella reducing the gas change surface. Due to this respiratory difficulty, there is an increase on RBC, Hb and MCHC to raise the oxygen transportation to the tissues (Affonso *et al.*, 2002). Thus, the blood parameters alteration is a secondary factor to the damage on gill caused by mercury. In the present study it was not observed alterations in the gill probably because the form of exposition.

Leukocyte population changes as reflex in stimulation or suppression of the immune system during the Hg exposition have great importance since affect fish susceptibility to diseases. Romão *et al.* (2006) evaluated hematological parameters of two species (*Geophagus brasiliensis* and *Hoplias malabaricus*) captured in polluted and reference areas. Fishes collected on polluted areas presented lower levels for PCV, Hb and erythrocytic index.

In the present paper there was a significant decrease in WBC in animals treated with MeHg and  $\text{HgCl}_2$  when compared to control group. This result support Kotsanis *et al.* (2000) work, where leukocytes response environmental alterations changing their morphology and distribution. This decrease occurred mainly in 24 and 72 hours groups contaminated with MeHg. The reduction in the number of leukocytes observed in "traíras" treated with MeHg reflects the reduction in the number of lymphocytes, because there was increase in number of neutrophils and monocytes.



The significant decrease in the number of lymphocytes was observed only in animals treated with MeHg (24 hours- $67.2 \pm 4.1\%$  and 72 h- $68.0 \pm 4.6\%$ ) when compared with control animals ( $76.4 \pm 4.3\%$ ). Since the lymphocyte cells are the main defenses in fish (Ranzani-Paiva & Eiras, 1992). The lymphocytopenia of “traíra”, will certainly damage the immune response of these agents, making them more susceptible to diseases (Mela, 2004).

Oliveira Ribeiro (2006) working with *H. Malabaricus* sub chronically exposed to MeHg did not observe any alteration on erythrocytes. Nevertheless, an increase on Hb, PCV, WBC, neutrophils and monocytes was noted in exposed fishes. Experimental exposure of *Channa punctatus* to 0.3–1.8 mg/L HgCl<sub>2</sub> has been shown to produce a number of pathological alterations such as reductions in blood hemoglobin content, erythrocyte count, and body weight/protein contents (Sharma, 1984).

Monocytes presented a lightly increase in beginning of experiment, but decreased in the end. Anyway, there was no significant difference between the treatments. Ishikawa *et al.*, (2007) did not observed any difference on monocyte population studying tilapia exposed to HgCl<sub>2</sub> on water. Basophils and eosinophils were rarely found. Because of this, the real effect of mercury contamination on these cells was difficult to measure. This same difficulty was broached by Ishikawa *et al.*, (2007). The monocytes in “traíra” are not frequent, representing approximately 10% of leukocytes (Ranzani-Paiva & Eiras, 1992). Metals such as lead, may cause necrosis in many tissues and increase the melano-macrophage centers (MMCs) (Rabitto *et al.*, 2004). The macrophages to remove the damaged tissue possibly from monocytes are stored in certain organs.

In this study, the number of thrombocytes in animals treated with HgCl<sub>2</sub> was reduced in the final days of exposure (72 and 96 hours) compared with the numbers of thrombocytes in control animals. In animals treated with MeHg, the number of thrombocytes decreased after 48 and 72 hours, but after the days following the reduction, the number of thrombocytes was recovered in relation to the control animals. This reduction of thrombocytes can prejudice the coagulation system, which is required in cases of tissue necrosis and lesions in vascular system. Sorensen (1991) observed a 42% increase in the number of thrombocytes in the blood of fish after acute exposure to inorganic mercury by 24 and 48 hours, this author characterized this case as from acute intoxication by mercury.

Eosinophils and basophils were found in a few fish, why we could not see the possible effects of Hg on these cells. The difficulty in view of the possible effects of Hg on eosinophils and basophils was also discussed by Ishikawa (2003) to expose treated with MeHg and HgCl<sub>2</sub>. However, no significant difference in the quantity of these cells between treated and control groups.

Based on these results it is possible to affirm that the exposition to Hg, mainly MeHg, can induce alterations on hematological profile. However, those effects should be analyzed combined with other contamination indicators, considering that increases and decreases on some hematological parameters were observed in both groups treated with different forms of Hg, however they appear on different time and type of exposure.

Histopathological alterations on fishes are biomarkers of exposure to environmental stress that signalizes the resulting effects of exposure to one or more toxic agents (Hinton *et al.*, 1992).

In the present study, the kidney and liver histopathological responses have clearly different the animals exposition by organic and inorganic mercury animal control. According to Schmalz *et al.* (2002) the presence of necrotic areas in liver of *Fundulus heteroclitus* exposed to mercury and other metals was related to the increase of an inflammatory response and formation of melano-macrophage centers (MMCs). These structures are large hepatic granulomas formed exclusively by macrophages surrounded by a thin layer of fibrous tissue with some lymphocytes (Ferguson, 1989). According to Agius (1980), their function is capture and eliminates, by fagocytosis, strange particles from apoptosis or cell death. These structures can store some pigments such as melanin, lipofuscin and ceroides.

The quantitative increase of MMCs in individuals expose treated with MeHg and HgCl<sub>2</sub> observed earlier in the kidney, suggests that there is a tendency of melano-macrophage free to focus on center, although it was not observed significant difference of these structures in animals treated. Mela (2007) may also observe an increase in the number of MMCs in livers and kidneys of treated "traíras" through diet, with MeHg, compared to control subjects. Wolke (1992) and Manera *et al.* (2000), describing the melano-macrophage free and MMCs are biological parameters that can be influenced by exposure to contaminants in the diet of fish.

Previous studies have related to the occurrence of MMCs: aging, degradation of tissues, food conditions, iron metabolism and hemoglobin, pollution, disease and

inflammatory conditions, immunological processes and deprivation of food (Agius & Roberts, 1981; Grover, 1968; Hartley *et al.*, 1996; Vogelbein *et al.*, 1987; Secombes & Manning, 1980; Brown & George, 1985; Rios, 2001).

The presence of necrosis observed in livers and kidneys of treated animals with MeHg and HgCl<sub>2</sub> is corroborated by Simenova (1999). The author relates the high number of neutrophils found in head kidney and leukocyte infiltration in liver of individuals exposed to MeHg suggest the secretion of tumoral factor by resident macrophages in harmed tissues. The increase in the number of neutrophils in the blood of individuals treated with MeHg and HgCl<sub>2</sub>, the answer may be related to injuries observed in the liver and kidneys examined in this study.

## 5. Conclusion

Based on the results obtained by this hematological study it is possible to say that exposure to mercury, primarily in its organic form can cause haematological effects, but these effects should be analyzed together with other indicators of contamination, because increases or decreases are observed in individuals treated by the same chemical form of metal, however, in different times and forms of exposure.

## 6. References

Adhikari, N.P.; Pehg, X.; Aalizadeh, A.; Ganti, S.; Nayak, S.K. & Kumar, S.K. 2004. Multiscale modeling of the surfactant mediated synthesis and supramolecular assembly of cobalt nanodots. *Physical Review Letters*, 93: 18301- 18304.

Agius, C. & Roberts, R.J. 1981. Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. *Journal of fish biology*, 19: 161-169.

Affonso, E.G.; Polez, V.L.P.; Corrêa, C.F.; Mazon, A.F.; Araújo, M.R.R.; Moraes, G. e Rantin, F.T. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133C: 375-382.

Allen, P. 1994. Distribution of mercury in the soft tissues of the blue tilapia *Oreochromis aureus* (Steindachner) after acute exposure to mercury (II) chloride. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 40: 178–184.

Azevedo, F. A. 2003, *Toxicologia do mercúrio*. São Carlos: RIMA. São Paulo: Intertox. 292p.

Banerjee, S. & Bhattacharya, S. 1994. Histopathology of kidney of *Channa punctatus* exposed to chronic nonlethal level of elsan, mercury and ammonia. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 29: 265–275.

Benfey, T.J. & Biron, M. 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167-176.

Benna. S. & Viswaranjan, S. 1987. Effect of cadmium and mercury on the hematological parameter of the fish *Cyprinus carpio*. *Environmental Ecology*, 5 (4): 726-732.

Brown, C.L & George, C.J. 2006. Age dependent accumulation of macrophage aggregates in the yellow perch, *Perca fluviatilis* (Michell). *Journal of Fish Diseases*, 8: 135-138.

Bruslé, J.; González, G. & Anadon, G. G.1996. The structure and function of fish liver. Pp. 77–93. In: J.S.D. Munshi & H.M. Dutta, (eds.). *Fish Morphology Science Publishers Inc.*, USA. 300p.

Campbell, T.W. 2004. Hematology of fish. In: Thrall, M.A. (org.) *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, p. 227 – 290.

Costa, B.G.B. 2007. Concentração de mercúrio total em cavala (*Scomberomorus cavalla* - Cuvier, 1829) e serra (*Scomberomorus brasiliensis* - Collette, Russo & Zavala-Camin, 1978) comercializados nas bancas de pescado do Mucuripe, Fortaleza, CE, 45p.

Costa, J.R.M.A.; Mela, M.; Silva De Assis, H.C.; Pelletier, E.; Randi, M.A.F. & Oliveira Ribeiro, C.A. 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 82-88.

Ferreira, A. G. 2004. *Efeitos ecotoxicológicos da contaminação ambiental por mercúrio em Hoplias malabaricus (Traíra – BLOCH, 1794 – PISCES – ERYTHRIDAE) de quatro lagoas do Norte do Estado do Rio de Janeiro*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 120p.

Filenko, O.F.; Xihua, D.; Xulong, C. & Yugi, Z. 1989. Distribution of mercury in the tissues of carp and its biological effects. *Hydrobiology*, 24: 64–68.

Garcia-Navarro, C.E.K & Pachaly, J.R. 1994. Manual de hematologia veterinária. Livraria Varela, São Paulo, 169p.

Gochfeld, M. 2003. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 174-179.

Grover, J.H. 1968. Hemosiderin in bluegill spleens. *Transaction of the American Fisheries Society*, 97: 48-50.

Handy, R.D. & Penrice, W.S. 1993. The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in *Rainbow trout, Oncorhynchus mydiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 106: 717–724.

Hartley, W.R.; Thiyagarajah, A. & Treinies, A.M. 1996. Liver lesions in the gar fish (lepisosteidae) as biomarker of exposure. *Marine Environmental Research*, 42: 217-221.

Heath, A. G. 1987. *Water pollution and fish physiology*. Boca Raton: CRC Press, Florida, 230p.

Hilmy, A.M.; Shabana, M.B. & Said, M.M. 1980. Haematological responses to mercury toxicity in the marine teleost, *Aphanius dispar* (RÜPP). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 67C:147-158.

Hinton, D.E. & Laurén, D.J. 1990. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. *American Fisheries Society Symposium*, 8: 51–66.

Hinton, D.E.; Baumann, P.C.; Gardner, G.R.; Hawkins, W.E.; Hendricks, J.D.; Murchelano, R.A. & Okirino, M.S. 1992. Histopathology biomarkers. *In*: Hugget, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle Jr, P.M. & Bergaman, H.L. Biomarkers \_ Biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress. Flórida: Lewis Publishers,.. p.155-209.

Ishikawa, N.M.; Ranzani-Paiva, M.J.T.; Lombardi, J.V. & Ferreira, C.M. 2007. Hematological parameters in Nile Tilápia, *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of mercury. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50 (4): 619-626.

Jagoe, D.H.; Shaw-Allen, P.L. & Brundage, S. 1996. Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in Largemouth bass *Micropterus salmoides* from three reservoirs with different levels of mercury contamination. *Aquatic Toxicology*, 36: 161–176.

Lacerda, L. D. 1990. Distribuição e comportamento do mercúrio no ambiente Amazônico. *In: Riscos e Conseqüências do Uso do Mercúrio* (S. Hacon; L. D. Lacerda; W. C. Pfeiffer & D. Carvalho, org.), pp. 80-90, Brasília: Finep/Ibama/MS/CNPq.

Lall, G. P. 1989. The minerals. *In: Fish nutrition*. pp219-257. Ed. Halver, J.E, Academic Press, San Diego.

Mela, M. 2004. *Uso de biomarcadores na avaliação dos efeitos do metilmercúrio em Hoplias malabaricus (Block, 1794) (traíra)*. Dissertação de Mestrado do Instituto de Biologia. Curitiba, PR, UFPR. 123p.

Mela, M.; Randi, M.A.F; Ventura, D.F; Carvalho, C.E.V; Pelletier, E. & Oliveira Ribeiro, C.A. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68: 426-435.

Micaroni, R. C. C. Bueno, M. I. M. S.; Jardim, W. F. 2000. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova*, v. 23, p.487-495.

Modra, H.; Svobodova, Z. & Kolarova, J. 1998. Comparison of Differential Leukocyte Counts in Fish of Economic and Indicator Importance. *Acta Veterinaria Brno*, 67: 215-226.

O'Connor, D.V & Fromm, P.O. 1975. The effect of methyl mercury on gill metabolism and blood parameters of Rainbow trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 13 (4): 406-411.

Oliveira Ribeiro, C.A. & Torres, R.F. 1995. Acute effects evaluation of inorganic mercury on epidermis of *Trichomycterus brasiliensis*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 32: 260–266.

Oliveira Ribeiro, C.A.; Filipak, N.F.; Mela, M.; Silva, P.H.; Randib, M.A.F.; Rabitto, I.S.; Alves Costa, J.R.M. & Pelletier, E. 2006. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environmental Research*, 101: 74-80.

Oliveira Ribeiro, C.A.; Guimarães, J.R.D. & Pfeiffer, W.C. 1996. Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34: 190-195.

Oliveira Ribeiro, C.A.; Rouleau, C.; Pelletier, E.; Audet, C. & Tjalve, H. 1999. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Science Technology*, 33:902-907.

Paiva, M.J.T.R. 2000. Hematological evaluation in commercial fish species from the floodplain of the upper Paraná River, Brazil. *Acta Scientiarum*, 22, (2): 507-513.

Penteado, J.C.P. & Vaz, J.M. 2001. O legado das bifenilas policloradas. *Química Nova*, 24:390-398.

Pitombeira, M.S. 1972. *Hematologia do apaiari, Astronotus ocellatus (Cuvier, 1829) peixe teleósteo*. Aspectos morfológicos e fisiológicos. 1972. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 130p.

Ranzani-Paiva, M. J. T. & Eiras, J. C. 1992. Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos de 13 espécies de teleósteos do Rio Paraná-PR. *Acta scientiarum*, 34: 54-62.

Ranzani-Paiva, M. J. T.; Salles, F. A.; Eiras, J. C.; Ishikawa, C. M. and Alexandrino, A. C. 1999. Análise hematológica de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do instituto de pesca. *Boletim do Instituto de Pesca*, 25: 77-83.

Ranzani-Paiva, M.J.T. & Godinho, H.M. 1985. Estudos hematológicos em curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). Série vermelha. *Boletim do Instituto de Pesca*, 12 (2): 25 – 35.

Ribeiro, W.R. 1978. *Contribuição ao estudo da hematologia de peixes: morfologia e citoquímica das células do sangue e dos tecidos hematopoéticos do mandi amarelo, Pimelodus maculatus Lacépède, 1803*. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 146p.

Rios, F.S. 2001. Metabolismo energético de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) (Erythrinidae) submetida à privação de alimento e à realimentação. São Carlos-SP. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 104p.



Rios, F.S.; Oba, E.T.; Fernandes, M.N.; Kalinin, A.L. & Rantin, F.T. 2005. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 140: 281-287.

Romão, S.; Donatti, L.; Freitas, O.M.; Teixeira, J. & Kusma, J. 2006. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49: 441-448.

Samson, J.C. & Shenker, J. 2000. The teratogenic effects of methyl mercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 48: 343–354.

Secombes, C. J. & Manning, M.J. 1980. Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians: antigen localization in the carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Diseases*, 3: 399-412.

Serpunin, G. G. & Likhatchyova, O. A. 1998. Use of the ichthyohaematological studies in ecological monitoring of the reservoirs. *Acta Veterinaria Brno.*, 67 : (4), 339-345.

Shakoori, A.R.; Iqbal, M.J.; Mughal, A.L. & Ali, S.S. 1994. Biochemical changes induced by inorganic mercury on the blood, liver and muscles of freshwater Chinese grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Journal Ecotoxicology Environmental Monitorament*, 4 (2): 81-92.

Silva, A.T. 1987. *Ecologia molecular de hemoglobinas de Leporinus steindachneri (Eigenmann, 1907) (Anostomidae, Characiformes) de dois lagos do Vale do Rio Doce, MG*. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 73p.

Skak, C. & Baatrup, E. 1993. Quantitative and histochemical demonstration of mercury deposits in the inner ear of trout, *Salmo trutta*, exposed to dietary methyl mercury and dissolved mercuric chloride. *Aquatic Toxicology*, 25: 55–70.

Sorensen, E.M.B. 1991. *Metal poisoning in fish*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 340p.

### 3.0 DISCUSSÃO GERAL

A exposição constante da biota aquática a substâncias tóxicas lançadas no meio ambiente, como mercúrio e suas espécies químicas, é capaz de interagir com o organismo vivo causando múltiplas alterações que podem gerar graves conseqüências em populações, comunidades ou ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (Jesus & Carvalho, 2008)

Os testes de toxicidade com organismos aquáticos em condições de laboratório possibilitam a qualificação e a mensuração dos efeitos dos produtos tóxicos sobre a biota e a estimativa dos riscos de intoxicação ao ambiente. Esses testes de toxicidade utilizam como ferramenta a determinação de parâmetros biológicos selecionados, como histologia, bioquímica e fisiologia, que são conhecidos por variar em resposta aos efeitos tóxicos, que no caso desse estudo é o mercúrio sob a forma orgânica e inorgânica.

A avaliação biológica da exposição a metais só é possível quando estiverem disponíveis informações toxicológicas suficientes referentes aos mecanismos de ação e/ou a toxicocinética dos agentes químicos aos quais os indivíduos estão expostos. Dentre essas informações as análises químicas realizadas posteriormente aos ensaios laboratoriais podem responder a questões como: absorção da substância por diferentes vias e distribuição para os diferentes compartimentos do organismo. Além de ser necessário saber também se a substância se acumula ou não no organismo (Bernard & Lauwerys 1986; Rudiger 1999).

As análises químicas realizadas nesse estudo confirmaram a capacidade de acumulação de Hg pelos peixes, uma vez que, a concentração de Hg nos tecidos tratados com MeHg e HgCl<sub>2</sub> foram superiores significativamente em relação aos indivíduos controle. Essa capacidade de acumulação também foi observada em outros ensaios laboratoriais utilizando análise química de tecidos de peixes principalmente de clima temperado como carpas (Filenko *et al.*, 1989), tilápias (Handy *et al.*, 1993), *Salvelinus alpinus* (Oliveira Ribeiro *et al.*, 1999). Dentre as espécies de clima tropical que já demonstraram ter capacidade de

acumulação ao mercúrio em ensaios laboratoriais estão: o *Trichomycterus zonatus* (Oliveira Ribeiro *et al.*, 1995; 1996).

Uma vez absorvido pela cavidade peritoneal, que como já foi dito anteriormente proporciona uma rápida absorção do Hg devido ao enriquecimento sanguíneo deste local, o Hg entra na corrente sanguínea do peixe, porém no sangue, o mercúrio inorgânico tem distribuição igual entre células e plasma, já o MeHg acumula-se preferencialmente nas células, penetrando na membrana do eritrócito e se unindo a hemoglobina. Essa alta afinidade do MeHg pelas células do sangue tem sido observada em várias espécies de peixes (Espanol, 2001). As diferenças no padrão de afinidade entre as células sanguíneas possivelmente refletem nos resultados dos efeitos hematológicos observados nesse estudo, onde apenas as concentrações de leucócitos foram reduzidas (após 72 horas) quando comparado com as concentrações de leucócitos dos indivíduos controle. Já nos indivíduos tratados com MeHg, variáveis hematológicas como, hematócrito, hemoglobina, linfócitos e leucócitos, foram reduzidas significativamente quando comparados com os indivíduos controle.

Após o Hg ter sido absorvido pelo peixe, este metal é transportado pelo sangue até um tecido de acumulação, principalmente o fígado, onde também ocorre acumulação ou metabolização (Penteado & Vaz, 2001). Esta afirmativa corrobora o resultados de ordem de acumulação de Hg em indivíduos tratados com HgCl<sub>2</sub>. Schultz *et al.* (1997), também observaram que após injeção intraperitoneal de mercúrio inorgânico em indivíduos da espécie catfish a maioria do Hg iniciava sua acumulação no fígado e somente quantidades traços deste metal foram observadas no músculo. O rim também é um órgão de detoxificação e por isso refletiu maior acumulação de Hg em indivíduos tratados com MeHg, seguido pelo cérebro devido a facilitação da passagem pela membrana celular, através de mecanismos já discutidos anteriormente.

Um metal, como o mercúrio, pode sofrer metabolização no fígado, e ser armazenado, ou então pode ser excretada pela bile ou fezes, podendo ainda passar à corrente sanguínea para possível excreção pelos rins ou ficar armazenada nos tecidos extra-hepáticos (Penteado & Vaz, 2001).

A distribuição do mercúrio nos diferentes órgãos de um peixe após a exposição por um determinado tempo depende simultaneamente, de vários processos dinâmicos como a forma química, a concentração do Hg e o tempo de exposição (Leaner & Mason, 2001). Neste trabalho, a forma de exposição, via intraperitoneal, possibilitou a utilização do teste agudo, uma vez que a cavidade intraperitoneal é ricamente vascularizada permitindo a rápida distribuição para os tecidos relacionados com a metabolização, eliminação e afinidade as formas químicas. Por isso padrões diferentes foram observados em indivíduos tratados com MeHg e HgCl<sub>2</sub>.

A acumulação de Hg pelo fígado e pelos rins dos indivíduos tratados com MeHg e HgCl<sub>2</sub> refletiu nos efeitos histológicos observados como aumento dos centro de melano macrófagos e principalmente a presença de necrose. De acordo com Manahan (1991) a ocorrência de necrose é também uma consequência da inibição enzimática, ocasionando danos na integridade da membrana celular e distúrbios na síntese de proteínas e metabolismo de carboidrato. O MeHg é largamente reconhecido por causar estresse oxidativo elevando as concentrações de ânions superóxido, radicais hidroxilas e peróxido de hidrogênio (Limke *et al.*, 2004). Desta forma, as inibições das enzimas SOD (indivíduos tratados com MeHg e HgCl<sub>2</sub>) e GR (indivíduos tratados com HgCl<sub>2</sub>), podem ter contribuído no processo de necrose dos tecidos acima mencionados.

#### 4.0 CONCLUSÕES GERAIS

- O MeHg interfere nos padrões sanguíneos após a exposição por injeção intraperitoneal a um volume de 0.75µg/0,1 mL no tempo de até 96 horas, apesar destes indivíduos não apresentarem concentrações de Hg nos seus tecidos tão elevadas quanto os indivíduos tratados com HgCl<sub>2</sub>.
- O HgCl<sub>2</sub> não interfere nos padrões sanguíneos na mesma proporção que o MeHg, apesar das maiores concentrações de Hg terem sido observadas nestes indivíduos. Isso indica que deve existir um mecanismo de defesa de toxicidade mais eficiente para a forma inorgânica do mercúrio.
- Foi gerado estresse oxidativo nos indivíduos tratados com MeHg e HgCl<sub>2</sub>, via injeção intraperitoneal, uma vez que foi constatada a inibição da SOD (HgCl<sub>2</sub> e MeHg) e da GR (MeHg) em relação aos indivíduos não tratados com mercúrio.
- A forma de exposição dos indivíduos (caráter não realística) e as diferentes formas químicas de mercúrio utilizadas nesse trabalho, via injeção intraperitoneal, influencia no padrão de acumulação de mercúrio em suas diferentes formas químicas.
- O fígado teve destaque na acumulação de mercúrio em indivíduos tratados com HgCl<sub>2</sub>, enquanto que em indivíduos tratados com MeHg o cérebro foi o tecido que apresentou maior concentração de mercúrio.
- O MeHg e o HgCl<sub>2</sub> provocam injúrias nos tecidos de fígado e rins após a exposição por injeção intraperitoneal a um volume de 0.75 µg/0,1 mL no tempo de 96 horas, como necrose e um número elevado de centros de melanomacrófagos. Estas alterações foram diminutas em indivíduos controle, o que confere as duas formas químicas de Hg testadas efeito tóxico nos tecidos estudados.

## 5.0 RECOMENDAÇÕES

Existe uma necessidade crescente de novas abordagens utilizando biomarcadores em experimentos laboratoriais e, portanto, a continuidade dos estudos laboratoriais e a comparação com as respostas encontradas em indivíduos no campo, sejam outras espécies de peixes, ou ainda, outras espécies de bioindicadores, utilizando os biomarcadores relatados nesse estudo para oferecer a comunidade, um conjunto de técnicas alternativas para a monitorização ambiental.

## 6.0 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Adhikari, S.; Sarkar, B.; Chatterjee, A.; Mahapatra, C. T. & Ayyappan, S. 2004. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton), [\*Ecotoxicology and Environmental Safety\*](#), 58: 220-226.

Agusa, T.; Kunito, T.; Iwata, H.; Moniritha, I.; Tanac, T. S.; Subramaniana, A. & Tanabe, S. 2005. Mercury contamination in human hair end fish from Cambodia: levels, specific accumulation and risk assesement. *Environmental Polution*, 134: 79-86.

Allen, P. 1994. Distribution of mercury in the soft tissues of the blue tilapia *Oreochromis aureus* (Steindachner) after acute exposure to mercury (II)chloride *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53, no. 5, pp. 675-683.

Altindag, A. & Yigit, S. 2005. Assessment of heavy metal concentrations in the food web of lake Beysehir, Tukey. *Chemosfere*. 60: 552-556.

Azevedo, F. A. 2003, *Toxicologia do mercúrio*. São Carlos: RIMA. São Paulo: Intertox. 292p.

Banerjee, S. & Bhattacharya, S. 1994. Histopathology of kidney of *Channa punctatus* exposed to chronic nonlethal level of elsan, mercury and ammonia. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 29: 265–275.

Bastos, W. R.; Gomes, J. P. O; Oliveira, R. C.; Almeida, R.; Nascimento, E. L.; Bernardi, J. V. E.; Lacerda, L. D.; Silveira, E. G. Pfeiffer, W. C. 2005. Mercury in the environment and riverside populaton in the Madera River Basin, Amazon, Brazil. *Science os the Total Environment*, 368: 344 – 351.

Bisinoti, M.C. Jardim, W.F. 2004. O comportamento do metilmercúrio (MetilHg) no ambiente. *Química Nova*, 27: 593-600.

Bistoni, M.D.L.A., Haro, J.G. & Gutierrez, M. 1995. Feeding of *Hoplias malabaricus* in the wetlands of Dulce river (Cordoba, Argentina). *Hydrobiologia*, 316: 103-107.

Boening, D. W. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. [Chemosphere](#), 40: 1335-1351.

Boischio, A.A.P. & Henshel, D.S. 2000. Linear Regression Models of Methyl Mercury Exposure during Prenatal and Early Postnatal Life among Riverside People along the Upper Madeira River, Amazon. [Environmental Research](#), 83:150-161

Boudou, A. & Ribeyre, F. 1985. Experimental study of trophic contamination of salmo gairdneri two mercury compounds  $HgCl_2$  and  $CH_3HgCl$  – analysis at the organism and organ level. *Water Air Soil Pollution*, 26: 137–148.

Boudou, A. & Ribeyre, F. 1997. Aquatic Ecotoxicology: From the Ecosystem to the Cellular and Molecular Levels . *Environmental Health Perspectives*, 105,:21-35.



Bruslé, J.; González, G. & Anadon, G. G. 1996. The structure and function of fish liver. Pp. 77–93. In: J.S.D. Munshi & H.M. Dutta, (eds.). *Fish Morphology Science Publishers Inc.*, USA. 300p.

Burguer, J.; Dixon, C.; Shukla, T.; Tsipoura, N. & Gochfeld, M. 2002. Metal levels in horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*) from Maine to Florida. *Environmental Research*, 90: 227-236.

Burguer, J. & Gochfeld, M. 2006. Mercury in fish available in supermarkets in Illinois: Are there regional differences. *Science of the Total Environment*, 367: 1010 – 1016.

Cabana, G.; Tremblay, A.; Kaff, J.; Rasmussen, J. B., 1994, Pelagic food chain structure in Ontario Lakes: A determination of mercury levels in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Canadian Journal Fish Aquatic Science*, 51: 381-389.

Cairns Jr., J. & Van Der Schalie, W. H., 1980. Biological monitoring. Part I - Early warning systems. *Water Research*, 14:1179-1196.

Cajaraville, M.P.; Bebianno, M.J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C. & Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment*, 247: 295-311.

Carvalho, G. P. de; Cavalcante, P. R. S.; Castro, A. C. L. de, & Rojas, M. O. A. I. 2000. Preliminary assessment of heavy metal levels in *Mytella falcata* (Bivalva, Mytilidae) from Bacanga River estuary, São Luis, State of Maranhão, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*. 60: 13-27.

Coelho, J. P.; Pereira, M. E.; Duarte, A. & Pardal, M. A. 2005. Macroalgae response to a mercury contamination gradient in a temperate coastal lagoon (Ria de Aveiro- Portugal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*.

[Comporti M.](#) 1989. Three models of free radical-induced cell injury. *Chemico-biological Interactions*, 72:1-56.

Costa, J.R.M.A.; Mela, M.; Silva De Assis, H.C.; Pelletier, E.; Randi, M.A.F. & Oliveira Ribeiro, C.A. 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 82-88.

Drevnick, P.E.; Sandheinrich, M.B. & Oris, J.T. 2006. Increased ovarian follicular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to dietary methylmercury. *Aquatic Toxicology*, 79: 49–54.

Driscoll, C. T. C. 1994. The mercury cycle and fish in the Adirondack lakes. *Environmental Science Technology*, 28: 136-143.

Espanol, S.C. 2001. Toxicologia del mercurio. *Actuaciones preventivas en sanidad laboral y ambiental. Jornada Internacional sobre el impacto ambiental del mercurio utilizado por la minería aurífera artesanal en Iberoamérica*. Lima, Peru.

Fang, F.; Galarini, R.; Taticchi, M. I.; Dorr, A. J. M. & Mantilacci, L. 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 55: 162-167.

Ferreira, A. G. 2004. *Efeitos ecotoxicológicos da contaminação ambiental por mercurio em Hoplias malabaricus (Traíra – BLOCH, 1794 – PISCES – ERYTHRIDAE) de quatro lagoas do Norte do Estado do Rio de Janeiro*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 120p.

Farrington, J.W. 1991. Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. *Environmental Health Perspectives*, 90: 75-84.

Fernandes, M.N.; Rantin, F.T.; Kalinin, A.L. & Moron, S.G. 1993. Comparative study of gill dimensions of three Erythrinid species in relation to their respiratory function. *Canadian Journal of Zoology*, 71: 160-165.

Fileenko, O.F.; Xihua, D.; Xulong, C. & Yugi, Z. 1989. Distribution of mercury in the tissues of carp and its biological effects. *Hydrobiology*, 24: 64–68.

Freeman, B.A & Crapo, J.D. 1982. Biology of disease free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation*, 47: 412-426.

Gomes, R. A. 2007. Bioacumulação de mercúrio e caracterização histológica e ultraestrutural do tecido nervoso de *Hoplias malabaricus* (traíra-Block, 1794) sob o efeito da exposição in vivo por mercúrio. Dissertação de mestrado. Centro de Biociência e Biotecnologia. UENF, 43p.

Gonçalves, A. & Gonçalves, N. N. S. 2004. Exposição humana ao mercúrio na Amazônia brasileira: uma perspectiva histórica. *Revista Panamá Saúde Publica*, 15: 415- 419.

Hammond, P. B. & Beliles, R. P. 1980. Metals. *In: Doull, J.; Klaasen, C. D., Amour, M. O. (eds.). Casarett and Doull's toxicology: the basic science of posions. 3nd. New York: Macmillan Publications, Co. Inc. p. 409-467.*

Handy, R.D. & Penrice, W.S. 1993. The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in *Rainbow trout, Oncorhynchus mydiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 106: 717–724.

Heath, A.C. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology* (Second Edition). Lewis, Boca Raton, FL. 384p.

Hinton, D.E., & Laurén, D.J. 1990. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. *American Fisheries Society Symposium*, 8: 51–66.

Hui, C. A.; Rudnick, D. & Williams, E. 2005. Mercury burdens in Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) in three tributaries of southern San Francisco Bay, California, USA. *Environmental Pollution*, 133: 481-487.

Ishikawa, N.M.; Ranzani-Paiva, M.J.T.; Lombardi, J.V. & Ferreira, C.M. 2007. Hematological parameters in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of mercury. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50: 619-626.

Jagoe, D.H.; Shaw-Allen, P.L. & Brundage, S. 1996. Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in Largemouth bass *Micropterus salmoides* from three reservoirs with different levels of mercury contamination. *Aquatic Toxicology*, 36: 161–176.

Jardim, W. F. 1988. Contaminação por mercúrio: fatos e fantasias. *Ciência Hoje*, 41, p78.

Jesus, T. B., Santos, G. C. C., Machado, A. L. S., Villela, D. M., Nascimento, M. T., Carvalho, C. E. V. & Matschullat, J. Total Mercury distribution in soils of Atlantic Rainforest fragments in Rio de Janeiro State, Brazil. *Z. Geol. Wiss.* 35, 6: 343-348.

Klinger, R.E.; Blazer, V.S. & ECchevarria, C. 1996. Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 47: 225-233.

Koropatnick, J. & Zalups, R.K. 1997. Effect of non-toxic mercury, zinc or cadmium pretreatment on the capacity of human monocytes to undergo lipopolysaccharide-induced activation. *British Journal of Pharmacology*, 120: 797-806.

Kutter, V. T. 2006. Aspectos da Biogeoquímica do Mercúrio em lagos na planície costeira do Sul do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. Departamento de Oceanografia Física, Química e Geológica. Instituto de Oceanografia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Lacerda, L. D.; Paraquetti, H. H. M.; Matins, R. V.; Rezende, C. E. Zalmon, I. R.; Gomes, M. P. & Farias, V. 2000. Mercury content in shark species from the southeastern brazilian coast. *Revista Brasileira de Biologia*, 60: 571 – 576.

Lauwerys, R.R. & Bernard, A.M. 1986. Cadmium and the kidney. *British Journal of Industrial Medicine*, 43:433-435.

Leaner, J.J. & Mason, R.P. 2001. The effect of thiolate organic compounds on methylmercury accumulation and redistribution in sheepshead minnows, *Cyprinodon variegates*. *Environmental Toxicology Chemical*, 20: 1557-1563.

Legrand, M.; Arp, P.; Ritchie, C. & Chan, H. M. 2005. Mercury exposure in two coastal communities of the Bay of Fundy, Canada. *Environmental Research*, 98: 14-21.

Liao, C.Y.; Zhou Q.F; Shi, J.; Fu, J.-B. & Jiang, G.-B. 2005. Mercury Accumulation and Distribution in Medaka after the Exposure to Sublethal Levels of Methylmercury. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 75: 584–591.

Limke, T.L.; Bearss, J.J. & Atchison, W.D. 2004. Acute Exposure to Methylmercury Causes  $Ca^{+2}$  Dysregulation and Neuronal Death in Rat Cerebellar Granule Cells

through an M3 Muscarinic Receptor-Linked Pathway. *Toxicological Sciences*, 80: 60–68.

Manahan, S.E. 1991. *Water Pollution Environment Chemistry*, first ed. Lewis Publishers, London. 844p.

Marins, R. V. 1998. Avaliação da contaminação por mercúrio emitido por fontes difusas em sistema costeiro subtropical – O caso da Baía de Sepetiba, SE, RJ. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Geociências. Universidade Federal Fluminense. 77p.

Marzella, L. & Trump B.J. 1991. Pathology of the liver: functional and structural alterations of hepatocyte organelles induced by cell injury, *In*: Meeks R.G., Harrison S.D. & Bull R.J. (eds.) *Hepatotoxicology*. CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 93-138.

Maurice-Bourgoin, L.; Quiroga, I.; Chincheros, J. & Courau, P. 2000. Mercury distribution in waters and fishes the upper Madeira rivers and mercury exposure in riparian Amazonian populations. *The Science of the Total Environment*, 260: 73-86.

McKim, J.M.; Olson, G.F.; Holcombe, G.W. & Hunt, E.P. 1976. Long term effects of methylmercuric chloride on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*): toxicity, accumulation, distribution and elimination. *Journal Fisher Research Board Canadian*, 33: 2726–2739.

Mela, M.; Randi, M.A.F.; Ventura, D.F.; Carvalho, C.E.V.; Pelletier, E. & Oliveira Ribeiro, C.A. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68: 426-435.

Menezes, M.R. & Quasim, S.Z. 1984. Effects of mercury accumulation on the electrophoretic patterns of the serum, haemoglobin and eye lens proteins of *Tilapia mossambica* (Peters). *Water Research*, 18: 153-161.

Milman, M., & Bodali, R. A. 2005. Total mercury, methyl mercury and carbon in fresh and burned plants and soil in Northwestern Ontario. *Environmental Pollution*. 138: 161-166.

Mol, J. H., Ramlal, S. J., Lietar, C. & Verloo, M. 2001. Mercury contamination in freshwater, estuarine and marine fishes in relation to small-scale gold mining in Suriname, South America. *Environmental Research*, 83: 183-197.

Morales-Aizpurúa, I. C.; Tenuta-Filho, A.; Sakuma, A. M. & Zenebon, O. 1999. Mercúrio total em cação comercializado em São Paulo – SP, Brasil. *Ciência e tecnologia de Alimentos*, 19: 429-432

Mozeto, A. A. & Zagatto, P. A. 2006. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: Pedro A. Zagatto; Eduardo Bertoletti. (Org.). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicação*. São Carlos, SP: Rima Editora, p. 15-38.

Munthe, J.; Wángberg, I.; Iverfeldt, A.; Llindqvist, O.; Stromberg, D.; Sommar, J.; Gardfeldt, K.; Petersen, G.; Ebingahaus, R.; Prestbo, E.; Larjava, K. & Siemens, V. 2003. Distribution of atmospheric mercury species in Northern Europe: final results from MOE project. *Atmospheric Environmental*. 37: 09-20.

Nepomuceno, J.C.; Ferrari, I.; Spano, M.A. & Centeno, A.J. 1997. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. *Environmental Molecular Mutagenic*, 30: 293–297.

Niencheski, L. F.; Windom, H. L.; Baraj, B.; Wells, D. & Smith, R. 2001. Mercury in Fish from Patos and Mirim Lagoons, Southern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 42:1403 – 1406,

Oliveira Ribeiro, C.A. & Torres, R.F. 1995. Acute effects evaluation of inorganic mercury on epidermis of *Trichomycterus brasiliensis*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 32: 260–266.

Oliveira Ribeiro, C.A.; Fernandes, L.N.; Carvalho, C.S.; Cardoso, R.I. & Trucatti, N.M. 1995. Acute effects of inorganic mercury on olfactory epithelium of *Trichomycterus brasiliensis*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 31: 104–109.

Oliveira Ribeiro, C.A.; Fanta, E.; Turcatti, N.M.; Cardoso, R.I. & Carvalho, C.S., 1996. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis*. *Biocell*, 20: 171–178.

Oliveira Ribeiro, C.A.; Rouleau, C.; Pelletier, E.; Audet, C. & Tjalve, H. 1999. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Science Technology*, 33: 902-907.

Oliveira Ribeiro, C.A.; Filipack Neto, F.; Mela, M.; Silva, P.H.; Randi, M.A.F.; Costa, J.R.A. & Pelletier, E. 2006. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead and tributyltin chloride. *Environmental Research*, 29,101:74-80.

Paiva, M.P. 1974. Crescimento, alimentação e reprodução da traíra, *Hoplias malabaricus* (Block), no nordeste brasileiro. Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 216 p.

Paradis, S.; Wheatley, B.; Bosuell-Purdy, J.; Belisle, D.; Cole, M.; Lickers, H.; Hayton, A. & Davies, K. 1997. Mercury contamination through fish consumption. A



model for predicting and preventing hazards behaviour on a community level. *Water Air and Soil Pollution*, 97: 147-158.

Peakall, D.W. & Walker, C.H. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (3). *Ecotoxicology*, 3: 173-179.

Penteado, J.C.P. & Vaz, J.M. 2001. O legado das bifenilas policloradas. *Química Nova*, 24:390-398.

Perottoni, J.; Lobato, L.P.; Silveira, A.; Rocha, J.B.T.R. & Emanuelli, T. 2004. Effects of mercury and selenite on  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity and selected oxidative stress parameters in rats. *Environmental Research*, 95: 166-173.

Phillips, G. R.; Lenhart, T. E & Gregory, R.W. 1980. Relation between trophic position and mercury accumulation among fishes from the Tongue river reservoir, Manitoba. *Environmental Research*, 22: 73-80.

Pirrone, N.; Costa, P.; Pacyna, J. M. & Ferrara, R. 2001. Mercury emissions to the atmosphere from natural and anthropogenic sources in the Mediterranean region. *Atmospheric Environmental*, 35: 2997-3006.

Powers, D.A. 1989. Fish as model systems. *Science*, 246: 352-358.

Primo, W. S.; Carvalho, C. E. V.; Carvalho, C. C. V. & Suzuki, M.S. 2004. Mercury and organic carbon distribution in six lakes from the north of Rio de Janeiro state. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47: 139-145.

Rabitto, I.S.; Costa, J.R.M.A.; Silva de Assis, H.C.; Pelletier, E.; Akaishi, F.M.; Anjos, A.; Randi, M.A.F. & Oliveira Ribeiro, C.A. 2005. Effects of dietary Pb (II) and

TBT (tributyltin) on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: Histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 147-156.

Ranzani-Paiva, M.J.T.; Ishikawa, C.M.; Campos, B.E.S. & Eiras, A.C. 1997. Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus* Gunther, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 14: 329-339.

Régine, M.B., Gilles, D., Yannick, D. & Boudou, A. 2006. Mercury distribution in fish organs and food regimes: Significant relationships from twelve species collected in French Guiana (Amazonian basin). *Science Total Environmental*, 368, 262– 270

Rios, F.S.; Oba, E.T.; Fernandes, M.N.; Kalinin, A.L. & Rantin, F.T. 2005. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 140: 281-287.

Rouleau, J.C.; Borg-Neczak, K.; Gottofrey, J. & Tjalve, H. 1999. Accumulation of water-borne mercury (II) in specific areas of fish brain. *Environmental Science Technology*, 33: 3384-3389.

Rüdiger, H.W. Biomonitoring in occupational medicine. In: Marquart H, Schäfer SG, McClellan R, Welsch F (eds.). Toxicology. San Diego: Academic Press; 1999. p.1027-39.

Saeki, K.; Okabe, Y.; Kim, E. Y.; Tanabe, S.; Fukuda, M. & Tatsukawa, R. 2000. Mercury and cadmium in common cormorants (*Phalacrocorax carbo*). *Environmental Pollution*, 108: 249-255.

Samson, J.C. & Shenker, J. 2000. The teratogenic effects of methyl mercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 48: 343–354.

Santos, A.P.M.; Mateus, M.L.; Carvalho, C.M.L.; Batoréu, C.M.C. 2007. Biomarkers of exposure and effect as indicators of the interference of selenomethionine on methylmercury toxicity. *Toxicology Letters*, 169: 121-128.

Santos, E.C.O.; Maura de Jesus, I.; Brado, E.S.; Loureiro, E.B.; Mascarenhas, A.F.S.; Weirich, J.; Câmara, V.C & Cleary, D. 2002. Mercury exposure in riverside Amazon communities in Pará, Brazil. *Environmental Reserach Section*, 84:100-107.

Sastry, K.V. & Sharma, K. 1980. Mercury induced haematological and biochemical anomalies in *Ophiocephalus (Channa) punctatus*. *Toxicology Letters*, 5: 245-249.

Schultz, R.I.; Peters, L.E. & Newman, C.M. 1996. Toxicokinetics and disposition of inorganic mercury and cadmium in channel catfish after intravascular administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 140:39-50.

Schultz, R.I. & Newman, C.M. 1997. Methylmercury Toxicokinetics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and largemouth bass (*Micropterus Salmoides*) after intravascular administration. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 5: 990–996.

Shakoori, A.R.; Iqbal, M.J.; Mughal, A.L. & Ali, S.S. 1994. Biochemical changes induced by inorganic mercury on the blood, liver and muscles of freshwater Chinese grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Monitory*, 4: 81-92.

Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, 91, 3C:31-38.

Skak, C. & Baatrup, E. 1993. Quantitative and histochemical demonstration of mercury deposits in the inner ear of trout, *Salmo trutta*, exposed to dietary methyl mercury and dissolved mercuric chloride. *Aquatic Toxicology*, 25: 55–70.

Stegeman, J.J.; Brouwer, M.; Giulio, R.T.; Forlin, L.; Fowler, B.A.; Sanders, B.M. & Van Veld, P.A. Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effects. *In: Biomarkers Biochemical. Physiological and Histological Markers of Antropogenesis stress* (Huggett, R.J.; Kimerley, R.A.; Meherle, P.M.Jr.; Bergman, H.L.) Eds. Lewis Publishers, 235-335.

Storelli, M.M., Storelli, A.; Giacomini-Stufler, R. & Marcotrigiano, G. O. 2005. Mercury speciation in the muscle of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and striped mullet (*Mullus barbatus*) from the Mediterranean sea: estimated weekly intake. *Food Chemistry*, 89: 295-300.

Tanan, C.L.; Ventura, D.F.; Souza, J.M.; Grotzner, S.R.; Mela, M.; Gouveia Jr., A. & Oliveira Ribeiro, C.A. 2006. Effects of mercury intoxication on the response of horizontal cells of the retina of traíra fish (*Hoplias malabaricus*). *Journal of Medical and Biological Research*, 39: 987-995.

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

Thomann, R.V. 1989. Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environmental Science Technology*, 23: 699-707.

UNEP CHEMICALS. 2002. Current exposure and impacts of mercury on human health. *In: Global mercury assessment*. Switzerland: UNEP. chap. 4. Disponível

em: <<http://www.chem.unep.ch/mercury/WGmeeting/revreport-Ch4.pdf>>. Acesso: agosto de 2008.

Vaisman, A. G.; Matins, R. V. & Lacerda L. D. 2005. Characterization of the Mangrove Oyster, *Crassostrea rhizophorae*, as a Biomonitor for Mercury in Tropical Estuarine Systems, Northeast Brazil. *Buletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 74, n. 3, pp.582-588.

Van Der Oost, R.; Beyer, J. & Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assesement: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.

Walczak, B.Z.; Hammer, U.T. & Huang, P.M. 1986. Ecophysiology and mercury accumulation of rainbow trout (*Salmo gairdnerri*) when exposed to mercury in various concentrations of chloride. *Canadian Journal Fisher Aquatic Science*, 43: 710 – 714.

Wester, P.W. & Canton, H.H. 1992. Histopathological effctcs in *Poecillia reticulata* (Guppy) exposed to methylmercury chloride. *Toxicology Pathology*, 20: 81–92.

WHO, International Program on Chemical Safety. 1989. *Mercury- Environmental Aspects*. Geneva: World Health Organization, 115p. Disponível em:<<http://www.inchem.org/documents. ehc/ ehc/ ehc118.htm#PartNumber:3>>. Acessado em: abril de 2008.

WHO, International Program on Chemical Safety. 1990. *Environmental Health Criteria: Methylmercury*. Geneva: World Health Organization, p. 101-144. Disponível em:<<http://www.inchem.org/documents. ehc/ ehc/ ehc118.htm#PartNumber:3>>. Acessado em: abril de 2008.

WHO. World Health Organization. 1991. Inorganic mercury. Geneva. Environmental Health Criteria, n.118. Disponível em:<[http://www. inchem. org/ documents. ehc/ ehc/ ehc118.htm#PartNumber:3](http://www.inchem.org/documents. ehc/ ehc/ ehc118.htm#PartNumber:3)>. Acessado em: abril de 2008.

Wobeser, G. 1975. Acute toxicity of methylmercury chloride and mercuric chloride for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry and fingerlings. *Journal Fisher Research Board Canadian*, 32: 2005–2013.

[www.pescabrasil.com.br/especies/traira.gif](http://www.pescabrasil.com.br/especies/traira.gif), acessado em abril de 2007.

[www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685\\_98.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/685_98.htm), acessado em julho de 2007.

Zanette, J.; Monserrat, J. M. & Bianchini, A. 2006. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143C: 187-195.

Zupanc, K.H.G & Ott, R. 1999. Cell Proliferation after Lesions in the Cerebellum of Adult Teleost Fish: Time Course, Origin, and Type of New Cells Produced. [Experimental Neurology](#),60: 78-87.

## Apêndice I. Artigo Publicado: Utilização de Biomarcadores em Peixes como Ferramenta para Avaliação de Contaminação Ambiental por Mercúrio (Hg)

Revista: OECOLOGIA BRASILIENSIS (PDF)

*Oecol. Bras.*, 12 (4): 680-693, 2008

680

Jesus, T.B. & Carvalho, C.E.V.

*Oecol. Bras.*, 12 (4): 680-693, 2008

### UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES EM PEIXES COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR MERCÚRIO (Hg)

*Táise Bomfim de Jesus*<sup>1,2\*</sup> & *Carlos Eduardo Veiga de Carvalho*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, 28015620, Campos dos Goytacazes-RJ, Tel: 22-27261403 Fax: 22-27261472.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Centro de Biociência e Biotecnologia, UENF, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, CEP: 28015620, Campos dos Goytacazes-RJ.

\*E-mail: taisebj@hotmail.com

#### RESUMO

O estudo dos biomarcadores é uma ferramenta de avaliação do efeito tóxico de substâncias poluentes em ecossistemas aquáticos, que através do desenvolvimento e aplicação de técnicas de exposição ou efeito em três níveis de complexidade (individual, celular e molecular), tornando possível a elucidação da relação causa-efeito e dose-efeito na avaliação de risco à saúde. O mercúrio e seus compostos são considerados importantes poluentes ambientais e são quimicamente ativos, e, dependendo da concentração atingida nos tecidos animais, podem desnaturar proteínas e inativar enzimas e alterar a atividade celular. No monitoramento aquático, os peixes funcionam como bons indicadores de poluição, e o grau de eficiência de cada biomarcador depende do organismo (tamanho, sexo e idade) e da posição deste na cadeia trófica, por isso, estudos de qualidade ambiental que utilizam os mais diversos tipos de biomarcadores refletem com melhor precisão os efeitos do possível contaminante no organismo.

**Palavras-chave:** Ecossistema aquático, indicadores de poluição, efeito tóxico, monitoramento.

#### ABSTRACT

**USING BIOMARKERS IN FISH TO DETECT ENVIRONMENTAL CONTAMINATION BY MERCURY.** Biomarkers can be used to evaluate the toxic effects of pollutants to aquatic environments. Through studying the effects of exposure to pollutants in three levels of complexity – individual; cellular and molecular – the actual health risk related to causes/ doses/ effects can be evaluated. Mercury and its derivatives are considered important environmental pollutants that are highly reactive, which upon certain concentrations within tissues can denature proteins and inactivate enzymes, thus impairing cellular activities. Fish can be suitably coupled with biomarkers to serve as indicators of pollution in aquatic environments. The efficiency degree of each biomarker will depend of the fish used (e.g. its size, sex, and age) and on its trophic position in the system. This way, environmental quality studies that employ a wide range of biomarkers more are capable of returning a precise evaluation of the possible effects of a contaminant on a given organism.

**Keywords:** Aquatic ecosystems, pollution assessment, indicators of pollution, toxic effects

#### INTRODUÇÃO

O crescimento populacional verificado nas últimas décadas, acoplado ao aumento do avanço tecnológico e ao aumento na geração de produtos industriais, inclusive a manufatura de produtos químicos como fertilizantes, inseticidas e herbicidas, tem levado a economia global a uma expansão do nível de compostos xenobióticos no ecossistema aquático. Tal fato vem contribuindo para a redução da qualidade dos diversos compartimentos ambientais (água, sedimento, ar e solo), bem

como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas (Cajaraville *et al.* 2000).

Através das primeiras discussões científicas mundiais sobre prevenção de impactos ambientais, em 1992, a USEPA lançou uma nova abordagem, intitulada “Avaliação de risco”. Esta abordagem incorpora informações derivadas cientificamente, com preocupações sociais e econômicas, para projetar as conseqüências da ação de estressores de origem antrópica sobre o ambiente e, com base nesse modelo projetado, poderem definir ações para evitá-las.

A exposição constante da biota aquática a substâncias tóxicas lançadas no meio ambiente, como mercúrio e suas espécies químicas, é capaz de interagir com o organismo vivo causando múltiplas alterações que podem gerar graves conseqüências em populações, comunidades ou ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição, como pode ser observado na Figura 1. Para avaliar o efeito nocivo de um contaminante lançado no ambiente quando este está abaixo do limite legislado, utilizam-se testes de toxicidade, analisados por estimativa de pontos, normalmente expressos por concentrações letais, efetivas ou inibidoras que causam, respectivamente, mortalidade, anormalidade ou inibição a 50% dos organismos expostos. Entretanto, Denton *et al.* (1994) provaram, com base em uma série de dados, que o valor aproximado, a partir do qual o efeito começa, está sempre abaixo de 25%, o que torna a avaliação de riscos com base em valores de 50%, uma temeridade (Nascimento *et al.* 2006). A impossibilidade de confiança dos dados de toxicidade, ainda utilizados hoje, torna o uso dos biomarcadores mais promissores para a detecção preventiva de efeitos adversos.

Biomarcadores são hoje definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (Depledge 1992, Depledge 1993). Em 1987, quando o termo surgiu, foi proposta uma definição, sendo estabelecido que biomarcadores fossem “indicadores que assinalavam eventos em sistemas ou amostras biológicas sob exposição a contaminantes químicos”. A ênfase era o efeito em humanos. Adams (1990) modificou a definição original para incluir respostas de organismos, populações e comunidades aquáticas, e Depledge (1994) ampliou a definição, introduzindo respostas comportamentais a definição e outras perspectivas ecotoxicológicas críticas, como diversidade genética.

Os biomarcadores são comumente usados como indicadores bioquímicos, fisiológicos, e histológicos de exposição à xenobióticos ou de efeitos de contaminantes químicos (Huggett *et al.* 1992). Leonzio & Fossi (1993) também ampliaram a definição (e conseqüentemente o uso de biomarcadores) proposta pela *National Academy of Sciences*, definindo o que propuseram chamar de biomarcadores ecotoxicológicos, como variações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que possam ser medidas em amostras de tecidos ou fluidos orgânicos, em organismos ou populações, que possam evidenciar exposição ou efeitos de um ou mais poluentes químicos ou radiações. Mais recentemente, Decaprio (1997) definiu biomarcador como um indicador biológico que evidencia efeito resultante de exposição a um estressor, que pode ser interpretado como evento adaptativo não patogênico ou como séria alteração de um evento funcional, dependendo da toxicocinética e do mecanismo de ação do estressor.

Existem biomarcadores moleculares, celulares e ao nível de indivíduo. As duas características mais importantes dos biomarcadores são: a) permitem identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos; b) possibilitam a mensuração de efeitos sub-letais. Esta última característica permite pôr em prática ações remediadoras ou, melhor ainda, ações preventivas. Daí a importância e o interesse atual de incorporação da análise de biomarcadores em programas de avaliação da contaminação ambiental.



## CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES

Os biomarcadores podem ser classificados como de exposição, efeito ou suscetibilidade.

Os biomarcadores de exposição são alterações biológicas mensuráveis que evidenciam a exposição dos organismos a um poluente. Um exemplo de biomarcadores de exposição são os parâmetros bioquímicos que têm sido testados em peixes com relação a suas respostas a substâncias tóxicas. Entre os indicadores mais investigados nesses animais estão as enzimas presentes no tecido hepático, envolvidas na detoxificação de xenobióticos e seus metabólitos, englobando as enzimas de biotransformação de fase I e fase II e cofatores e as enzimas antioxidantes (Lech & Vodcnik 1985), como por exemplo, a indução do citocromo P-4501 (CYP1A) monoxidase, sob exposição a hidrocarbonetos poliaromáticos (Bucheli & Fent 1995). Esses biomarcadores são muito sensíveis e específicos para os compostos referidos. Uma das grandes vantagens do uso desses biomarcadores é o baixo custo, que chega a ser 100 a 200 vezes mais barato em relação ao de análise química (Schlenk 1999).

Os biomarcadores de efeitos, em geral, não são específicos em relação aos estressores e não fornecem informações sobre a sua natureza, mas são característicos da ocorrência de um estresse que poderá ser reversível tão logo o estressor cesse a atuação. São caracterizados pela indução de mecanismo de defesa celular, que se iniciam sempre como uma resposta adaptativa em nível molecular/ bioquímico. Entretanto, se esse mecanismo falha ou se sua capacidade de resposta é ultrapassada, poderão ser desencadeadas alterações fisiológicas ou histológicas, podendo ser irreversíveis, dependendo da capacidade do sistema ou órgão em responder ao estressor. Assim, o organismo pode ter afetada sua capacidade de reprodução ou crescimento. Alguns desses biomarcadores são órgão-específico como enzimas que são lançadas na corrente sanguínea após lesão em tecidos, como várias hepato-amino-ácidos transaminases, indicativas de respostas adaptativas a estressores são as envolvidas com a peroxidação lipídica ou estresse oxidativo (Winzer *et al.* 2001).

Os biomarcadores de suscetibilidade podem ser definidos como indicadores de processos que causam variações de repostas ao longo do tempo e entre exposição e efeito (Barrett *et al.* 1997), determinando condições como: indivíduo sadio, compensação do metabolismo, perturbação das funções, alterações morfológicas e morte. Estas condições aumentam a taxa de transição entre esses dois extremos (exposição e efeito). Os organismos, mesmo da mesma espécie, não respondem igualmente a exposição a xenobióticos. Sexo, jejum, estresse pelo confinamento, tamanho e estágio de desenvolvimento são parâmetros de variação nas respostas a estressores, bem como o polimorfismo genético de uma população. Estes biomarcadores correspondem aos chamados biomarcadores de efeito latente (Fossi & Leonzio 1993), significando que um organismo pode, em determinadas circunstâncias, ter limitada a habilidade de se adaptar ou sobreviver, o que pode ser determinado por mensuração de repostas fisiológicas que, analisadas em conjunto, expressam a diminuição da energia disponível para o crescimento (Nascimento *et al.* 2006).

Alguns autores (Fossi & Leonzio 1993) defendem outra classificação que incluiria, além dos citados, os biomarcadores de exposição e efeito, que, além de indicarem a ocorrência de exposição a determinados poluentes, podem ligar, com especificidade, essa exposição ao efeito evidenciando, de modo a caracterizá-lo. A inibição da acetilcolinesterase (AChE) é o melhor exemplo. Essa enzima hidrolisa a acetilcolina, impedindo a ação continuada dessa substância sobre seus receptores em nível das sinapses, propiciando, assim, um controle na transmissão do impulso nervoso. Organofosforados e carbamatos inibem a acetilcolinesterase, causando hiperestimulação dos receptores de acetilcolina, o que impede a contração muscular normal. Por ser específica para esses praguicidas, a inibição dessa enzima é considerada um biomarcador de exposição e de efeito (Nascimento *et al.* 2006).

O primeiro desafio para o cientista ambiental deve ser a investigação de biomarcadores apropriados para o melhor diagnóstico possível. Para essa escolha deve-se levar em consideração principalmente o contaminante a ser estudado e o melhor modelo biológico.

Os peixes constituem um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental, pois além de estarem presentes em vários ambientes e apresentarem ampla distribuição geográfica, participam ainda, de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, sendo considerados como excelentes modelos biológicos de estudo (Rodrigues 2003). O mercúrio e seus compostos são ativos quimicamente e, dependendo da concentração atingida no tecido animal, pode desnaturar proteínas e inativar enzimas e alterar a atividade celular tanto pela indução de genes específicos como pela transmissão ou influência de sinais de controle da expressão gênica (Koropatnick & Zalups 1997). Podem, ainda, modificar as membranas celulares com prejuízo de suas funções, causando a morte celular e a destruição de qualquer tecido com o qual entrem em contato.

Assim, a determinação de parâmetros biológicos selecionados, como histologia, bioquímica e fisiologia, que são conhecidos por variar em resposta aos efeitos tóxicos dos compostos mercuriais, vêm sendo constantemente recomendadas para avaliar o estado de saúde ambiental de ecossistemas aquáticos. Os biomarcadores mais utilizados atualmente para o estudo da contaminação de peixes por mercúrio (Hg) estão descritos a seguir.

### PARÂMETROS QUÍMICOS

A exposição pode ser avaliada por medida da concentração do agente químico em amostras ambientais, como ar (monitorização ambiental), ou através da medida de parâmetros biológicos (monitorização biológica), denominado indicadores biológicos ou biomarcadores. A monitorização biológica da exposição aos agentes químicos significa a medida da substância ou seus metabólitos em vários meios biológicos, como sangue, urina, ar exalado e outros (por exemplo, mercúrio na urina) (Amorim 2003).

A avaliação biológica da exposição a substâncias químicas só é possível quando estiverem disponíveis suficientes informações toxicológicas referentes aos mecanismos de ação e/ou à toxicocinética dos agentes químicos aos quais os indivíduos estão expostos. Quando a monitorização biológica está baseada na determinação da substância química ou do seu metabólito no meio biológico, torna-se essencial o conhecimento de como a substância é absorvida pelas diferentes vias; posteriormente, de como é distribuída para os diferentes compartimentos do organismo; de como é biotransformada; e, finalmente, de como é eliminada. Além de ser necessário saber também se a substância se acumula ou não no organismo (Bernard & Lauwerys 1986; Rudiger 1999).

A distribuição de Hg nos órgãos dos peixes resulta da ação e interação entre três fatores ecotoxicológicos: (i) condição de exposição, a importância da rota de entrada (água/ingestão da presa) e formas químicas do metal (mercúrio inorgânico, Hg (II) /MetilHg); (ii) características físico-químicas de biótopos (água e compartimento do sedimento), que afetam a especiação química do mercúrio, bioacumulação e também funções fisiológicas e bioquímicas do organismo; (iii) propriedades estruturais e funcionais de diferentes espécies de peixes que poderia afetar as barreiras biológicas e o mecanismo de excreção/depuração do peixe (Réginé *et al.* 2006).

Desta forma, torna-se imprescindível o estudo químico das concentrações deste metal nos biótopos e em espécies aquáticas de hábitos alimentares diferenciados, uma vez que o MeHg é um organometálico que além de se bioacumular também se biomagnifica ao longo das cadeias alimentares, ou seja, os organismos do topo de cadeia tem concentrações mais elevadas do que aqueles do início da cadeia (Campbell *et al.* 2003; Dusek *et al.* 2005; Hammerschmidt & Fitzgerald, 2006).

### PARÂMETROS GENOTÓXICOS

Estudos recentes apontam que metais como o mercúrio, ferro, cobre e cromo atuam em ciclo redox, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) (Stohs & Bagchi 1995). As EROs e o estresse oxidativo gerado por estas induzem a peroxidação de lipídios, danos ao DNA e alteram a

homeostasia de diversos minerais essenciais. Adicionalmente, o estresse oxidativo afeta diversas rotas metabólicas, incluindo aquelas envolvidas no reparo de danos ao DNA, conhecidos como efeitos genotóxicos (Prá *et al.* 2006).

O emprego de parâmetros genotóxicos, principalmente em organismos aquáticos como forma de avaliação da qualidade hídrica, permite avaliar o efeito dos poluentes no meio hídrico, bem como alterações de seu potencial tóxico ou genotóxico após interação com o ambiente.

Ao nível celular se podem utilizar, pelo menos, dois tipos de bioindicadores como indicativos de dano ao material genético: o teste do micronúcleo e o ensaio cometa.

Os micronúcleos são massas de cromatina citoplasmática com o aspecto de pequenos núcleos, constituídos principalmente por fragmentos cromossômicos ou por cromossomos retardados durante a migração anafásica, que se detectam em células interfásicas mediante técnicas simples de coloração, aparecendo no citoplasma como pequenos fragmentos basófilos. Em células de mamíferos, os micronúcleos são conhecidos há muito tempo, e são chamados de corpúsculos de Howell-Jolly. Os micronúcleos podem aparecer por várias causas, entre elas por falha mitótica, tanto de fragmentos acêntricos de cromossomos, gerados por ruptura (clastogenicidade), quanto de cromossomos completos (aneuploidia), como consequência, geralmente, de enfermidades genéticas (Porto *et al.* 2005).

No Brasil, existem poucos estudos que utilizam o teste de micronúcleos (MNTs) para estabelecer o efeito mutagênico e o efeito clastogênico do mercúrio em peixes. (Nepomuceno *et al.* 1997, Grisolia & Cordeiro 2000, Matsumoto & Cólus 2000) mas nenhum desses estudos avaliou os efeitos genotóxicos na distribuição dos micronúcleos no ambiente ou nos peixes em diferentes níveis tróficos, um fator crítico na avaliação de risco da exposição.

O ensaio cometa é uma técnica capaz de detectar danos de DNA em células individuais. É um teste relativamente novo, mas amplamente aplicado em estudos por ser facilmente manipulável, por ter baixo custo e pelo tempo reduzido para obtenção de resultados. Este ensaio permite a detecção de danos diretos no DNA (Pax-Y-Mino *et al.* 2002).

Estudos recentes realizados em peixes submetidos a condições experimentais mostraram diferentes conclusões quanto à eficiência do ensaio cometa como biomarcador. Poleza-Lopes (2004), trabalhando com *Hoplias malabaricus* submetidos à contaminação na água por MeHg, não observou diferença significativa entre o grupo tratado com MeHg e o grupo controle. Bombail *et al.* (2001), estudaram eritrócitos de peixes contaminados com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Neste estudo, o ensaio cometa apresentou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos contaminados. Ferraro *et al.* (2004), aplicaram o ensaio cometa para testar dois contaminantes diferentes, TBT e chumbo, também em *H. malabaricus*, não encontraram diferença significativa entre o grupo controle e o grupo contaminado em peixes tratados com TBT, porém, nos peixes tratados com chumbo foi encontrada diferença significativa entre os grupos.

As explicações para tais diferenças podem ser várias, desde dosagem do xenobiótico a que o animal foi submetido o que faz com que este não provoque danos diretos ao DNA e as proteínas do sistema de reparo (Ferraro *et al.* 2004), ou ainda, diferenças na idade e no sexo dos peixes expostos (Polenza-Lopes 2004).

Em trabalhos realizados em áreas consideradas contaminadas, com diferentes animais marinhos e dulcícolas, foram demonstradas as vantagens do ensaio cometa na avaliação de danos no DNA, porém, estes estudos enfatizam que comparações entre áreas contaminadas não podem ser realizadas facilmente (Lee & Steinert 2003, Souza & Fontanetti 2006).

#### PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os parâmetros do sangue são considerados indicadores fisiohistopatológicos do corpo inteiro e conseqüentemente é um importante diagnóstico do status estrutural e funcional do peixe exposto à substância tóxica. (Adhikari *et al.* 2004).

A ausência de estudos sobre a caracterização de células sanguíneas e outros valores hematológicos em diferentes espécies de peixes, provavelmente seja a maior barreira para se usar esta ferramenta na investigação do efeito de contaminantes em peixes (Mela 2004), assim como a escassez de métodos padronizados, diferenças entre sexo e idade, qualidade da água e métodos de captura, podem ser variáveis que dificultam a interpretação dos dados. Por esta razão, é difícil comparar resultados com diferentes espécies e diferentes estudos (Klinger *et al.* 1996).

O trabalho de Voccia *et al.* (1994) descreve que a capacidade fagocítica de leucócitos, como macrófagos e granulócitos, presentes no rim-cefálico de *Oncorhynchus mykiss* foram inibidos após exposição destas espécies de peixes à concentrações sub-letais de Hg (0,5ppb), provavelmente devido a citotoxicidade do Hg. Os mesmos autores descrevem que o potencial citotóxico do metilmercúrio para leucócitos da truta foi 10 vezes maior que a do mercúrio inorgânico, atuando nos principais tecidos leucopoiéticos. Ação deste metal parece estar relacionada a interrupção do processo fagocitário em uma de suas etapas: sinalização química, ligação com o alvo, ingestão celular, degranulação, “morte” intracelular e digestão intracelular (Ferreira 2004). Mela (2004) observou um aumento nas células no número total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, no grupo de peixes expostos a metilmercúrio em relação ao grupo controle, assim como aumentou o valor do hematócrito e hemoglobina. Alterações na população de leucócitos como reflexo da estimulação ou supressão das defesas naturais (ex. leucócitos fagocíticos) frente à exposição ao Hg, são de importância ecotoxicológica, uma vez que têm o potencial de afetar a susceptibilidade dos indivíduos a doenças. Romão *et al.* (2006) avaliou os parâmetros sanguíneos de duas espécies de peixes (*Geophagus brasiliensis* e *H. malabaricus*) coletados em áreas consideradas poluídas e em áreas de referência. Foram observados índices hematológicos ligeiramente menores em indivíduos coletados na área considerada poluída (hematócrito, hemoglobina e índices de eritrócitos).

Uma linhagem de enzimas específicas do sangue, como as transaminases, podem indicar uma ruptura da membrana celular em certos organismo. Outros parâmetros hematológicos menos específicos como hemoglobina, dosagem de hematócrito, proteínas e glicose, podem ser mais sensíveis a certos tipos de poluentes, ou ainda, níveis de hormônios esteróides no sangue ou proteínas normalmente induzidas por esses hormônios podem também indicar certos efeitos reprodutivos devido a ruptura endócrina (Van der Oost *et al.* 2003).

Low & Sin (1996) chegaram a descrever um aumento na atividade de liso-enzimas plasmáticas e renais do peixe *Trichogaster trichopterus* quando submetidos ao Hg. Liso-enzimas são enzimas que compõem a defesa humoral não específica de peixes, e estão presentes no muco, soro, órgãos hematopoéticos e células fagocíticas. Possuem atividade bactericida, variando sua estimulação/produção diretamente em função da situação de estresse do organismo. Sua inibição pode ser perigosa para os peixes uma vez que, por compor a imunidade não específica de inúmeras espécies da ictiofauna, qualquer fator externo (ex. exposição ao Hg) que provoque uma diminuição da resistência imunológica frente à patógenos, pode resultar em uma alta taxa de infecção levando inclusive a morte de uma população.

Na Tabela I estão citados alguns trabalhos que utilizaram os parâmetros hematológicos como biomarcador. Ferreira (2004) ao realizar a contagem diferencial de leucócitos de peixes de duas lagoas, uma contaminada e outra considerada como não-impactada, ambas localizadas na Região Norte Fluminense (RJ), concluiu que a lagoa contaminada mostrou uma linfocitopenia e uma trombocitose evidente. Também foi constatado um pequeno aumento no número de granulócitos circundantes no sangue de *H. malabaricus*.

Oliveira- Ribeiro *et al.* 2006, ao trabalhar com padrão hematológico de *H. malabaricus* expostos sub-cronicamente ao metilmercúrio, não observou diferença significativa entre os eritrócitos dos indivíduos controle e contaminados por MeHg, porém, foi possível notar o aumento de leucócitos, da concentração de hemoglobina, do hematócrito, de neutrófilos e monócitos dos indivíduos contaminados em relação aos indivíduos controle.

Tabela I. Alguns trabalhos que utilizaram os biomarcadores hematológicos para avaliar a contaminação por mercúrio do peixe, *Hoplias malabaricus*.

Table I. List of papers that employed hematological biomarkers to evaluate contamination by mercury in the fish *Hoplias malabaricus*.

Referência	Parâmetros hematológicos
Mela (2004)	Contagem de células do sangue, hemoglobimetria, determinação do hematócrito, índices hematimétricos e morfometria de eritrócitos, no sangue de <i>H. malabaricus</i> após contaminação <i>in vivo</i> por metilmercúrio.
Ferreira (2004)	Contagem diferencial de leucócitos de <i>H. malabaricus</i> para diferenciar o grau de contaminação de dois ambientes lacustres.
Oliveira-Ribeiro <i>et al.</i> (2006)	Estudos de possíveis diferenças hematológicas entre espécies de <i>H. malabaricus</i> expostos sub-cronicamente ao metilmercúrio.

### PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os parâmetros bioquímicos têm sido largamente testados em peixes com relação a suas respostas a substâncias tóxicas. A Tabela II demonstra alguns dos trabalhos científicos que utilizaram diferentes enzimas para avaliar a ação de um contaminante específico em peixes. Entre os indicadores mais investigados nesses animais estão as enzimas presentes no tecido hepático, envolvidas na detoxificação de xenobióticos e seus metabólitos, englobando as enzimas de biotransformação de fase I, fase II, cofatores e as enzimas antioxidantes (Lech & Vodcnik 1985).

Tabela II. Biomarcadores enzimáticos usados atualmente e suas respectivas referências.

Table II. Enzymatic biomarkers currently used to detect contamination in fish with respective references.

Enzima	Contaminante	Referências
ALAD	Chumbo	Hodson <i>et al.</i> 1977, Goyer & Clarkson 2001, Gurer-Orhan <i>et al.</i> 2004
EROD	PAHs e PCDD/Fs, policlorodibenzeno-para-dioxinas e furanos, e PCBs (policlorobifenis)	Stegeman & Hahn 1994, Bucheli & Fent 1995
GST	Xenobióticos em geral	George 1994
LDH	Óleo cru e condições de hipoxia	Gagnon & Holdway 1999, Cooper <i>et al.</i> 2002

O mercúrio é um metal de alta toxicidade, pois produz no organismo espécies oxigenada altamente reativa como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio), que induz ao decréscimo dos níveis de glutathiona (GSH) e causa a peroxidação lipídica (Stohs & Bagchi 1995).

A diminuição da glutathiona pode reduzir a capacidade celular de destruir os radicais livres e espécies reativas de oxigênio, de modo que aumente o potencial oxidativo da célula. Assim, GSHe suas enzimas associadas exercem um papel protetor dentro da célula. De fato, a conjugação da glutathiona com os xenobióticos, seja espontânea, ou catalizada pela glutathiona-S-transferase (GST), diminuem a ação dos xenobióticos e tornam essas moléculas mais solúveis na água, e elas podem ser mais facilmente eliminadas (Boylard & Chasseaud 1969). Variações nos níveis de glutathiona e enzimas envolvidas em atividades associadas à exposição de mercúrio têm sido estudadas, mas as respostas foram variáveis e dependentes das espécies, tempo de exposição, e concentração do metal (Chatterjee & Bhattacharya 1984, Heisinger & Scott 1985, Di Simplicio & Leonzio 1989, Maracine & Segner 1998, Canesi *et al.* 1999). Filipak-Neto *et al.* (2008) submeteram hepatócitos de *H.*

*malabaricus* a diferentes concentrações de DDT e MeHg, além, da associação entre estes dois contaminantes e concluíram que em todos os tratamentos as atividades das enzimas, catalase (CAT), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutathiona redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) foram alteradas.

A inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) tem sido largamente usada como diagnóstico da exposição por compostos anticolinesterases como: organofosforados, carbamatos e pesticidas (Fulton & Key, 2001). Mais recentemente, estudos indicaram que esse biomarcador é também sensível a outros compostos, incluindo alguns metais e surfactantes (Gill *et al.* 1990, Labrot *et al.* 1996, Guilhermino *et al.* 1998). Rabitto *et al.* (2005) verificaram inibição da atividade acetilcolinesterase em peixes expostos à chumbo, porém, nesse mesmo estudo peixes foram expostos ao TBT e não apresentaram alterações na atividade desta enzima. Costa *et al.* (2007) também observaram inibição na atividade da acetilcolinesterase em peixes expostos ao MeHg.

### PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

O exame histopatológico é reconhecido cada vez mais como uma ferramenta valiosa para a avaliação do campo do impacto de poluentes ambientais em peixes (Heath 1995, Teh *et al.* 1997). Lesões específicas que ocorrem nos órgãos de peixes expostos às substâncias tóxicas sob condições de laboratório ajudam a identificar biomarcadores de exposição. Muitos autores estudaram os efeitos histopatológicos do mercúrio nos peixes expostos ao mercúrio inorgânico e metil mercúrio na água em tecidos como fígado, rins, em brânquias e no epitélio olfatório (Filenko *et al.* 1989, Skak & Baatrup 1993, Handy & Penrice 1993, Allen 1994; Banerjee & Bhattacharya 1994, Oliveira Ribeiro *et al.* 1995, Oliveira Ribeiro *et al.* 1996, Oliveira Ribeiro & Torres 1995, Jagoe *et al.* 1996, Samson & Shenker 2000, Mela *et al.* 2007, Oliveira Ribeiro *et al.* 2008). Estes estudos mostraram que as brânquias e o epitélio olfatório estão em contato direto com os poluentes na água, e podem ser usados como indicadores sensíveis da toxicidade relativa do metil mercúrio nos ecossistemas aquáticos devido às interações do mercúrio com os fluxos brânquial dos gases e dos eletrólitos (Heath, 1995) e ocorrências de problemas morfológicos (Jagoe *et al.* 1996, Oliveira Ribeiro *et al.* 1996, 2000). Poucos dados estão disponíveis na literatura sobre os aspectos histológicos e ultraestruturais do tecido muscular esquelético de teleosteos frente à contaminação por Hg. Notadamente, a maior parte dos trabalhos publicados refere-se aos aspectos bioquímicos e alterações metabólicas provocadas pela exposição *in vitro* de culturas de mioblastos ao Hg ou de experimentos com músculo estriado cardíaco de cobaias (Halbach 1990, Usuki *et al.* 2001). Por sua vez, Sewry *et al.* 2002 afirmam que apesar do uso da microscopia eletrônica de transmissão para observação de alterações no músculo esquelético ter diminuindo nos últimos anos devido a aplicações de técnicas de biologia molecular e imunocitoquímica, ainda assim o autor destaca o papel da técnica no diagnóstico de biópsias deste tipo de tecido.

De acordo com Hinton & Laurén (1990), o fígado é um órgão desintoxicador essencial para o metabolismo e para a excreção de substâncias tóxicas de dentro do corpo. A exposição aos metais pesados pode conseqüentemente causar as mudanças histológicas no fígado e uma investigação histológica de espécimes expostos podem conseqüentemente produzir resultados significativos. Bruslé *et al.* (1996) afirmam que estudos com histologia de fígados de peixes poderiam servir como modelos para estudar as interações entre fatores ambientais e estruturas hepáticas e suas funções. O efeito prejudicial da poluição do metal pesado na histologia do fígado de peixes pode, entretanto, depender da duração da exposição (crônica ou aguda) e nível de concentração do metal específico.

### PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

Vários pesticidas são conhecidos por afetarem o sistema imune resultando em alterações na resposta humoral e celular. As alterações imunológicas podem resultar em doenças auto-imunes, hipersensibilidades ou alergias, enquanto que a supressão do sistema imune pode levar ao aumento

da incidência de doenças infecciosas e até mesmo a transformações neoplásicas (Dean *et al.*, 2001). Sendo assim o uso de biomarcadores imunológicos é muito útil na avaliação do risco toxicológico (Stiller-winkler *et al.* 1999). Nos mamíferos, foi observado que tanto mediada por célula e humoral (anticorpo - mediada) imunidade pode ser deprimido por poluentes tais como os HPA, PCB, PBB, OCPs (dieldrina, lindano, DDTs e HCB), organometais (. ex. metilmercúrio e organoestânios) e metais pesados como Pb e Cd (Von der Oost *et al.* 2003).

O sistema imune de peixes é bem desenvolvido e pode ser comparado em vários aspectos ao sistema imune de mamíferos (Ellis 1982). Desta forma pode-se supor que a sensibilidade das funções do sistema imune frente à contaminação ambiental é comparável entre diferentes espécies. A função imune natural não específica dos organismos oferece inúmeras possibilidades como fonte de marcadores biológicos na ecotoxicologia.

Vários parâmetros imunológicos podem potencialmente serem utilizados como biomarcadores nos peixes, por exemplo, células brancas sanguíneas (leucócitos), status de linfócitos (contagens das células sanguíneas ou diferenciais) e fatores de defesa não específicos (tais como os níveis de atividade lisossomal aguda e proteínas de fluidos corporais), peso e morfologia de leucócitos produzidos em órgãos, como o baço, timo e o rim, centros de melanomacrófagos (número, tamanho e exame histopatológico) (Mela *et al.* 2007, Miranda *et al.* 2008), função macrófago (quimiotaxia, fagocitose, pinocitose e quimioluminescência), um aumento da susceptibilidade a infecções bacteriana, e outros (Weeks *et al.* 1992, Wester *et al.* 1994).

Bussolaro *et al.* (2008) expuseram camundongos a diferentes concentrações de chumbo por 72h e concluíram que mesmo em baixas concentrações as funções dos macrófagos eram afetadas através da redução do índice fagocítico, produção de óxido nítrico, estabilidade do sistema endossomal / lisossomal e da adesão celular.

Convém, no entanto, salientar que o sistema imunológico pode ser influenciado por uma grande variedade de estressores, o que implica em que biomarcadores imunológicos podem ser úteis e sensíveis, mas muitas vezes inespecíficos (Weeks *et al.* 1992).

#### PARÂMETROS REPRODUTIVOS E ENDÓCRINOS

A necessidade de se conhecer os efeitos potenciais dos disreguladores endócrinos tem conduzido a uma demanda por métodos de ensaios *in vitro* e *in vivo* para identificar os efeitos biológicos de uma grande variedade de substâncias naturais e sintéticas presentes no meio ambiente.

Recentes estudos experimentais têm investigado a capacidade de baixas doses de metais pesados (cádmio, mercúrio, zinco, chumbo) de causarem alterações nas funções do sistema endócrino. São relatadas alterações no sistema reprodutivo em populações de espécies de peixes, distúrbios na síntese de cortisol em peixes, indução da síntese de VTG (Leblond *et al.* 1999, Fossi *et al.* 2004).

Os resultados dos trabalhos existentes que relacionam efeitos reprodutivos e endócrinos causados por Hg e do MeHg na ictiofauna (Who 1990, Wiener *et al.* 2003) mostram que peixes submetidos a diferentes concentrações de Hg apresentam alterações hormonais e reprodutivas, e há efeitos adversos sobre o desenvolvimento larval (Who 1990). Verificou-se também que o MeHg pode prejudicar a reprodução dos peixes por afetar o desenvolvimento gonadal e o sucesso de desova dos adultos (Wiener & Spry 1996), além de reduzir o sucesso de incubação dos ovos e da sobrevivência dos estágios embriolares (Mckim *et al.* 1976, Friedmann *et al.* 1996, Latif *et al.* 2001, Hammerchimdt *et al.* 2002).

Os interferentes endócrinos podem exibir tanto um comportamento estrogênico como androgênico. Estrogênios são esteróides hormonais que regulam e sustentam o desenvolvimento sexual feminino e suas funções reprodutivas. Já os androgênios são esteróides hormonais responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas (Hoffman *et al.* 2003).

A determinação da proteína vitelogenina (VTG) em organismos aquáticos, principalmente peixes, tem sido bastante utilizada na investigação por contaminantes. A vitelogenina é uma fosfolipoproteína sintetizada por todas as fêmeas de ovíparos durante o ciclo reprodutivo; é

produzida no fígado e secretada na corrente sanguínea, onde é transportada até os ovários, acumulando-se nos ovócitos em crescimento para ser, então, utilizada como precursora das reservas nutricionais necessárias para o desenvolvimento subsequente dos embriões. Em indivíduos imaturos ou em machos, a codificação do gene para esta proteína não existe ou é muito fracamente expressada. Assim, a presença desta proteína no sangue destes organismos representa um biomarcador de exposição, pois sua síntese depende da presença de xenobióticos (Reis Filho *et al.* 2006).

A síntese de vitelogenina (VTG), é afetado pelo estradiol. Foi demonstrado que peixes expostos a PCBs foram menos capazes de produzir VTG (Spies *et al.* 1990). O comprometimento da função reprodutora pela diminuição dos níveis plasmáticos de VTG foi reportada para as trutas fêmeas expostas ao Cd (Haux *et al.* 1988). A síntese de VTG também pode ser induzida em peixes do sexo masculino expostos a substâncias químicas perturbadoras do sistema endócrino, como a alquilfenóis, conduzindo assim a uma chamada feminização dos peixes machos (Gimeno *et al.* 1996).

O mercúrio (inorgânico ou metilado) causa lesões histopatológicas nas células de Leydig (responsáveis pela síntese de andrógenos) em *Clarias* sp. expostos cronicamente. Isso veio acompanhado pelo decréscimo dos teores de colesterol plasmático, sugerindo um estímulo do catabolismo hepático ou uma inibição da síntese da molécula. O chumbo foi relatado como supressor da liberação de gonadotropinas em peixes, provavelmente por alterar os níveis de dopamina no hipotálamo, o que inibe a espermatogênese e a produção de andrógenos, bem como reduz o crescimento gonadal e os níveis de estradiol em fêmeas (Heath 1995). Porém, no estudo realizado por Alves Costa (2006) em peixes contaminados por chumbo inorgânico divalente não foi observado nenhum efeito antiestrogênico detectável pelo método empregado (imuno-detecção), após bioensaio (administração via intraperitoneal).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, S.M. 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *American Fisheries Societies Symposium*, 8: 1–8.
- ADHIKARI, N.P.; PEHG, X.; ALIZADEH, A.; GANTI, S.; NAYAK, S.K. & KUMAR, S.K. 2004. Multiscale modeling of the surfactant mediated synthesis and supramolecular assembly of cobalt nanodots. *Physical Review Letters*, 93: 18301–18304.
- ALLEN, P. 1994. Distribution of mercury in the soft tissues of the blue tilapia *Oreochromis aureus* (Steindachner) after acute exposure to mercury (II) chloride. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 40: 178–184.
- ALVESCOSTA, J.R.M. 2006. Padronização de Metodologias para o Uso de Biomarcadores de Contaminação Ambiental em Traíra (*Hoplias malabaricus*, ERYTHRINIDAE): ALA-D, metalotioneína e vitelogenina. Instituto de Biologia. Universidade Federal do Paraná. 120p.
- AMORIM, L.C.A. 2003. Os Biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 6:158–170.
- BANERJEE, S. & BHATTACHARYA, S. 1994. Histopathology of kidney of *Channa punctatus* exposed to chronic nonlethal level of elsan, mercury and ammonia. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 29: 265–275.
- BARRETT, J.C.; VAINIO, H.; PEAKALL, D. & GOLDSTEIN, B.D. 1997. 12<sup>th</sup> Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemical: susceptibility to environmental hazards. *Environmental Health Perspective*, 105: 699–737.
- BERNARD, A. & LAUWERYS, R. 1986. Assessment of human exposure to chemicals through biological monitoring. Pp.17-28. In: Kopfler FC, Craun, GF (eds.), *Environmental Epidemiology*. Inc., Chelsea: Lewis Publ.
- BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E. & BARTTY, J. 2001. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocyte from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, 44: 383–392.
- BOYLAND, E. & CHASSEAUD, L.F. 1969. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advances Enzymology Relatives Areas Molecular Biology*, 32: 173–219.
- BRUSLÉ, J.; GONZÁLEZ, G. & ANADON, G. G. 1996. The structure and function of fish liver. Pp. 77–93. In: J.S.D. Munshi & H.M. Dutta, (eds.). *Fish Morphology Science Publishers Inc.*, USA. 300p.
- BUCHELI, T.D. & FENT, K. 1995. Induction of cytochrome P450 as biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Review in Environmental Science Technology*, 25: 201–268.



- BUSSOLARO, D.; FILIPAK NETO, F.; GARGIONI, R.; FERNANDES, L. C.; RANDI, M. A. F.; PELLETIER, E.; OLIVEIRARIBEIRO, C. A. 2008. The immune response of peritoneal macrophages due to exposure to inorganic lead in the house mouse *Mus musculus*. *Toxicology in Vitro*, 22: 254–260.
- CAJARAVILLE, M.P.; BENIANNI, J.M.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C. & VIARENGO, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment*, 247: 295–311.
- CAMPBELL, L.M.; OSANO, O.; HECKY, R.E. & DIXON, D.G. 2003. Mercury in fish from three rift valley lakes (Turkana, Naivasha and Baringo) Kenya, East Africa. *Environmental Pollution*, 125: 281–286.
- CANESI, L.; VIARENGO, A.; LEONZIO, C.; FILIPPELLI, M. & GALLO, G. 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*, 46: 67–76.
- CHATTERJEE, S. & BHATTACHARYA, S. 1984. Detoxification of industrial pollutants by the glutathione-S-transferase system in the liver of *Anabas testudineus* (Bloch). *Toxicology Letters*, 22: 187–198.
- COOPER, R.U.; CLOUGH, L.M.; FARWELL, M.A. & WEST, T.L. 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279: 1–20.
- COSTA, J.R.M.A.; MELA, M.; SILVADEASSIS, H.C.; PELLETIER, E.; RANDI, M.A.F. & OLIVEIRARIBEIRO, C.A. 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 82–88.
- DEAN, J.H., HOUSE, R.V., & Luster, M.I. 2001. Immunotoxicology: Effects of, and Responses to, Drugs and Chemicals. Pp. 1415–1450. In: Taylor & Francis, (ed), Principles and Methods of Toxicology: Fourth Edition, Philadelphia, Pennsylvania. 1835p.
- DECAPRIO, A.P. 1997. Biomarkers: Coming of age for environmental health and risk assessment. *Environmental Science Technology*, 31: 1837–1848.
- DENTON, D.L.; STARRETT, G.I.; MITH, R.H. & JOHNSON, S.C. 1994. Comparison of hypothesis testing to point estimate techniques for marine toxicity tests. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Abstracts, 15<sup>th</sup> annual meeting., Denver- CO, Pensacola FL: SETAC, p. 116–118.
- DEPLEDGE, M.H. 1992. Conceptual paradigms in marine ecotoxicology. In: Proceedings of the 12<sup>th</sup> Baltic Marine Biologists Symposium. Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark, pp. 47–52.
- DEPLEDGE, M.H. 1994. Genotypic toxicity implications for individuals and populations. *Environmental Health Perspectives*, 102: 101–104.
- DI SIMPLICIO, P. & LEONZIO, C. 1989. Effects of selenium and mercury on glutathione and glutathione dependent enzymes in experimental quail. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 42: 15–21.
- DUSEK, L.; SYOBODOVÁ, Z.; JANOUSKOVÁ, D.; VYKUSOVÁ, B.; JARKOVSKÝ, J.; ŠMÍD, R. & PAVLIS, P. 2005. Bioaccumulation of mercury in muscle tissue of fish in the Elbe River (Czech Republic): multispecies monitoring study 1991–1996. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 256–267.
- ELLIS, A. E. 1982. Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. Pp 5–37. In: R. J. Roberts, (ed.), Microbial diseases of fish. Spec. Publ. Soc. Gen. Microbiol. 129p.
- FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A.S. ; CESTARI, M.M. ; MANTOVANI, M.S. ; LEMOS, P. M.M. 2004. Genetic Damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genetics and Molecular Biology*, 27(2): 270–274.
- FERREIRA, A.G. *Efeitos ecotoxicológicos da contaminação ambiental por mercúrio em Hoplias malabaricus (Traíra – BLOCH, 1794 – PISCES – ERYTHRIDAE) de quatro lagoas do Norte do Estado do Rio de Janeiro*. Centro de Biotecnologia e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ, UENF. 2004. 165p.
- FILENKO, O.F.; XIHUA, D.; XULONG, C. & YUGI, Z. 1989. Distribution of mercury in the tissues of carp and its biological effects. *Hydrobiology*, 24: 64–68.
- FILIPAK, F.N.; ZANATA, S.M.; SILVADEASSIS, H.C.; NAKAO, L.S.; RANDI, M.A.F. & OLIVEIRARIBEIRO, C.A. 2008. Toxic effects of DDT and methylmercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*, *Toxicology in Vitro*, no prelo.
- FOSSI, C. & LEONZIO, C. 1993. Nondestructive biomarkers in vertebrates. Boca Raton. Florida, Lewis. 313p.
- FOSSI, M. C.; CASINI, S.; MARSILI, L.; ANCORA, S.; MORI, G.; NÉRI, G.; ROMEO, T.; AUSILI, A. 2004. Evaluation of ecotoxicological effects of endocrine disruptors during a four-year survey of the Mediterranean population of swordfish (*Xiphias gladius*). *Marine Environmental Research*, 48: 425–429.
- FRIEDMMAN, A.S.; WATZIN, M.C.; BRINCK-JOHNSEN, T. & LEITER, J.C. Low levels of dietary methylmercury inhibit growth and gonadal development in juvenile walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquatic Toxicology*, 35: 265–278.
- FULTON, M.H. & KEY, P.B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 37–45.
- GAGNON, M.M. & HOLDWAY, D.A. 1999. Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44: 92–99.

- GEORGE, S.G. 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. Pp. 37–85. In: G.K. Ostrander. (Ed.). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, New York. 560p.
- GILL, T.S.; TEWARI, H. & PANDE, J. 1990. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. *Comparative biochemistry and physiology*, 97: 287–292.
- GIMENO, S.; GERRITSEN, A.; BOWMER, T. & KOMEN, H. 1996. Feminization of male carp. *Nature*, 384: 221–222.
- GOYER, R.A. & CLARKSON, T.W. 2001. *Toxic effect of metals*. Pp. 811– 867. In: C.D. Klaassen, (ed.), Casarett and Doull's toxicology. New York, McGraw-Hill. 1275p.
- GRISOLIA, C.K. & CORDEIRO, C.M.T. 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetic Molecular Biology*, 23: 235–239.
- GUILHERMINO, L.; BARROS, P.; SILVA, M.C. & SOARES, A.M.V.M. 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers*, 3: 157–163.
- GURER-ORHAN, H.; SABIR, H.U. & OZGUNES, H. 2004. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*, 195: 147–154.
- HALBACH, S. 1990. Mercury compounds: lipophilicity and toxic effects on isolated myocardial tissue. *Archives Toxicology*, 64: 31–5319.
- HAMMERSCHIDT, C. R. & FITZGERALD, W.F. 2006. Bioaccumulation and trophic transfer of methylmercury in Long Island Sound. *Environmental Contamination and Toxicology*, 51:416–424.
- HAMMERSCHIDT, C. R.; SANDHEINRICH, M.B.; WIENER, J.G. & RADA, R.G. 2002. Effects of dietary MeHg on reproduction of fatted minnows. *Environmental Science Technology*, 36: 877–883.
- HANDY, R.D. & PENRICE, W.S. 1993. The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 106: 717–724.
- HAUX, C.; BJORNSSON, B.T.; FORLIN, L.; LARSSON, A. & DEFTOS, L.J. 1988. Influence of cadmium exposure on plasma calcium, vitellogenin and calcitonin in vitellogenic rainbow trout. *Marine Environmental Research*, 24: 199–210.
- HEATH, A.C. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology* (Second Edition). Lewis, Boca Raton, FL. 384p.
- HEISINGER, J.F. & SCOTT, L. 1985. Selenium prevents mercuric chloride induced acute osmoregulatory failure without glutathione peroxidase involvement in the black bullhead (*Ictalurus melas*). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 80: 295–297.
- HINTON, D.E., & LAURÉN, D.J. 1990. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. *American Fisheries Society Symposium*, 8: 51–66.
- HODSON, P.V.; BLUNT, B.R.; SPRY, D.J. & AUSTENS, K. 1977. Evaluation of erythrocyte-amino levulinic acid dehydratase activity as short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 34: 501–508.
- HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON Jr., G. A.; CAIRNS Jr., J.; 2003. *Handbook of Ecotoxicology*, 2nd, (ed.), Lewis Publishers CRC Press LLC: USA, 1290p.
- HUGGET, R.J.; UNGER, M.A.; SELIGMAN, P.F. & VALKIRS, A.O. 1992. The marine biocide tributyltin. *Environmental Science & Technology*, 26: 233–410.
- JAGOE, D.H.; SHAW-ALLEN, P.L. & BRUNDAGE, S. 1996. Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase activity in Largemouth bass *Micropterus salmoides* from three reservoirs with different levels of mercury contamination. *Aquatic Toxicology*, 36: 161–176.
- KLINGER, R.E.; BLAZER, V.S. & ECHEVARRIA, C. 1996. Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 47: 225–233.
- KOROPATNICK, J. & ZALUPS, R.K. 1997. Effect of non-toxic mercury and cadmium pretreatment on the capacity of human monocytes to undergo lipopolysaccharide-induced activation. *British Journal of Pharmacology*, 120: 797–806.
- LABROT, F. ; RIBERA, D. ; SAINT DENIS, M. & NARBONNE, J.F. 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, 1: 21–28.
- LATIF, M.A.; BODALY, R.A.; JOHNSTON, T.A. & FUDGE, R.J.P. 2001. Effects of environmental and maternally derived methylmercury on the embryonic and larval stages of walley (*Stizostedion vitreum*). *Environmental Pollution*, 111: 139–148.
- LEBLOND, V. S. & HONTELA, A. 1999. Effects of *in vitro* exposures to cadmium, mercury, zinc, and 1-(2-Chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on steroidogenesis by dispersed interrenal cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 157: 16–22.
- LECH, J.J. & VODICNIK, M.J. 1985. Biotransformation. Pp. 526–557. In: G.M. Rand, S.R. Petrocelli. (eds.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA. 666p.

- LEE, R. F. & STEINERT, S.A. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544: 43-64.
- LEONZIO, C. & FOSSI, M.C. 1993. Nondestructive biomarkers strategy: perspectives and applications. Pp. 297-312. In: M.C. Fossi and C. Leonzio. (eds.). Nondestructive biomarkers in vertebrates. Lewis Publ., London. 368p.
- LOW, K.W. & SIN, Y.M. 1996. In vivo and in vitro effects of mercury chloride and sodium selenite on some non-specific immune responses of Blue Gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). *Fish and Shellfish Immunology*, 6: 351-362.
- MARACINE, M. & SESNER, H. 1998. Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: importance of the cellular glutathione status. *Comparative Biochemistry Physiology A*, 120: 83-88.
- MATSUMOTO, F.E. & CÓLUS, I.M.S. 2000. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide and vinblastine sulfate. *Genetic Molecular Biology*, 23: 489-492.
- MCKIM, J.M.; OLSON, G.F.; HOLCOMBE, G.W. & HUNT, E.P. 1976. Long-term effects of methylmercury chloride on three generation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*): Toxicity, accumulation, distribution and elimination. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33: 2726-2739.
- MELA, M. 2004. *Uso de biomarcadores na avaliação dos efeitos do metilmercúrio em Hoplias malabaricus (Block, 1794) (traíra)*. Dissertação de Mestrado do Instituto de Biologia. Curitiba, PR, UFPR. 123p.
- MELA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E. & OLIVEIRARIBEIRO, C.A. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68: 426-435.
- MIRANDA, A.L.; ROCHE, H.; RANDI, M.A.F.; MENEZES, M.L.; OLIVEIRARIBEIRO, C. A. 2008. Bioaccumulation of organochlorine pesticides, PCBs, HCB and DDT in tropical freshwater fish species *Hoplias malabaricus* related to histopathological, physiological and immunological findings. *Environment International*, 34: 939-949.
- NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A. & LEITE, M.B. 2006. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. 413-431. In: P.Azagatto & E. Bertolotti. (eds.). *Ecotoxicologia Aquática- Princípios e Aplicações*. São Paulo. 478p.
- NEPOMUCENO, J.C.; FERRARI, I.; SPANO, M.A. & CENTENO, A.J. 1997. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. *Environment and Molecular Mutagenesis*, 30: 293-297.
- OLIVEIRARIBEIRO, C.A. & TORRES, R.F. 1995. Acute effects evaluation of inorganic mercury on epidermis of *Trichomycterus brasiliensis*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 32: 260-266.
- OLIVEIRARIBEIRO, C.A.; FANTA, E.; TURCATTI, N.M.; CARDOSO, R.I. & CARVALHO, C.S., 1996. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis*. *Biocell*, 20: 171-178.
- OLIVEIRARIBEIRO, C.A.; FERNANDES, L.N.; CARVALHO, C.S.; CARDOSO, R.I. & TURCATTI, N.M. 1995. Acute effects of inorganic mercury on olfactory epithelium of *Trichomycterus brasiliensis*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 31: 104-109.
- Oliveira Ribeiro, C.A.; Filipak, N.F.; Mela, M.; Silva, P.H.; Randib, M.A.F.; Rabitto, I.S.; Alves Costa, J.R.M. & Pelletier, E. 2006. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environmental Research*, 101: 74-80.
- OLIVEIRARIBEIRO, C.A.; MESMER-DUDONS; GONZALEZ, P.; YANNICK, D.; BOURDINEAUD, J. ; BOUDOU, A. ; MASSABUAU, J. C. 2008. Chronic and trophic effects of methylmercury on zebrafish muscle fibers. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25: 304-305.
- Oliveira Ribeiro, C.A.; Pelletier, E.; Pfeiffer, W.C. & Rouleau, C. 2000. Comparative gill damages and bioaccumulation of inorganic mercury on tropical and nordic fish. *Environmental Research A*, 83: 286-292.
- PAX-Y-MINÔ. C.; DÁVALOS, M.V.; SÁNCHEZ, M.E.; ARÉVALO, M. & LEONE, P.E. 2002. Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay. *Mutation Research*, 516: 57-61.
- POLEZA-LOPES, S.C.G. 2004. *Avaliação do efeito do metilmercúrio (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) em Hoplias malabaricus através da frequência de aberrações cromossômicas e do ensaios cometa e micronúcleo*. Instituto de Biologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 54p.
- Porto, J.I.R.; Araújo, C.S.O. & FelbergE. 2005. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, 97: 287-292.
- Prá, D.; Guecheva, T.; Franke, S.I.R.; Knakievicz, T.; Erdtmann, B. & Henriques, J.A.P. 2006. Toxicidade e Geonotoxicidade do sulfato de cobre em planárias de água doce e camundongos. *Journal Brazilian Ecotoxicology*, 2: 171-176.
- RABITTO, I.S.; COSTA, J.R.M.A.; SILVADEASSIS, H.C.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F.M.; ANJOS, A.; RANDI, M.A.F. & OLIVEIRARIBEIRO, C.A. 2005. Effects of dietary Pb (II) and TBT (tributyltin) on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: Histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 147-156.
- RÉGINE, M.B, GILLES, D.; YANNICK, D. & BOUDOU, A. 2006. Mercury distribution in fish organs and food regimes: Significant relationships from twelve species collected in French Guiana (Amazonian basin). *Science of the Total Environment*, 368: 262-270.
- REISFILHO, R.W.; ARAÚJO, J.C. & Vieira, E.M. 2006. Hormônio sexuais estrógenos: Contaminante bioativos. *Química Nova*. 29 (4), 817-822.

- Romão, S.; Donatti, L.; Freitas, O.M.; Teixeira, J. & Kusma, J. 2006. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49: 441–448.
- RUDIGER, H.W. 1999. Biomonitoring in occupational medicine. Pp.1027-1039. In: Marquart H, Schäfer SG, McClellan R, Welsch F, (eds.), *Toxicology*. San Diego: Academic Press. 1330p.
- Samson, J.C. & Shenker, J. 2000. The teratogenic effects of methyl mercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 48: 343–354.
- Schlenk, D. 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin*, 39: 48–53.
- Sewry, C.A.; Muller, C.; Davis, M.; Dwyer, J.S.M.; Dove, J.; Evans, J.; Schroder, R.; Furst, D.; Helliwell, T.; Laing, N. & Quinlivan, R.C.M. 2002. The spectrum of pathology in central core disease, *Neuromuscular Disorders*, 10-12: 930-938.
- Skak, C. & Baatrup, E. 1993. Quantitative and histochemical demonstration of mercury deposits in the inner ear of trout, *Salmo trutta*, exposed to dietary methyl mercury and dissolved mercuric chloride. *Aquatic Toxicology*, 25: 55–70.
- SOUZA, T.S. & FONTANETTI, C.S. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.
- SPIES, R.B.; STEGEMAN, J.J.; RICE, D.W.Jr.; WOODLIN, B.; THOMAS, P.; HOSE, J.E.; CROSS, J.N. & PRIETO, M. 1990. Sublethal responses of *Platichthys stellatus* to organic contamination in San Francisco Bay with emphasis on reproduction. Pp. 87-122. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 471p.
- Stegeman, J.J. & Hann, M.E. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. Pp. 87-206. In: D.C. Malins & G.K. Ostrander. (eds.). *Aquatic toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 560p.
- STILLER-WINKLER, R.; HADNAGY, W.; LENG, G.; STRAUBE, E.; IDEL, H. 1999. Immunological parameters in humans exposed to pesticides in the agricultural environment. *Toxicology Letters*, 107: 219–224.
- Stohs, S.J. & Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 2: 321–336.
- Teh, S.J.; Adams, S.M. & Hinton, D.E. 1997. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*, 37: 51–70.
- USEPA(United States Environmental Protection Agency). 1992. *Report on ecological risk assessment guidelines: strategic planning workshop*. EPA/630/R-92-002. Washington, DC. 57p.
- Usuki, F.; Ysutake, A.; Matsumoto, M. & Higuchi, I. 2001. Chronic low-dose methylmercury administration decreases mitochondrial enzyme activities and induces myopathic changes in rats. *Journal of Health Science*, 47: 162–167.
- VanDer Oost, R.; Beyer, J. & Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57–149.
- Voccia, I.; Krzystyniak, K.; Dunier, M.; Flipo, D. & Fournier, M. 1994. In Vitro Mercury-Related Cytotoxicity and Functional Impairment of the Immune Cells of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 29: 37–48.
- WEEKS, B.A.; ANDERSON, D.P.; DUFOUR, A.P.; FAIRBROTHER, A.; GOVEN, A.J.; LAHVIS, G.P. & PETERS, G. 1992. Immunological biomarkers to assess environmental stress, Pp 221-234. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr. Bergman, H.L. (eds.), *Biomarkers: Biochemical, physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI. USA, 347p.
- WESTER, P.W., VETHAAK, D., VAN MUISWINKEL, W.B. 1994. Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology*, 86: 213–232.
- WHO. Environmental Health Criteria (EHC 101). 1990. Methylmercury. Geneva, 143p.
- WIENER, J.G.; KRABENHOFT, D.P.; HEINZ, G.H. & SCHEUHAMMER, A.M. 2003. Ecotoxicology of mercury, Pp. 409-463. In: D.J. Hoffman, B.A. Rattner, G.A. Burton, Jr., & J. Cairns, Jr. (eds.), *Handbook of Ecotoxicology*, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1312p.
- WIENER, J.G. & SPRY, D.J. 1996. Toxicological significance of mercury in freshwater fish. Pp. 297-339. In: Beyer, W.N.; Heinz, G.H; Redmon-Norwood, A.W. (eds.), *Environmental contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentration*. Florida: Lewis Publishers; Boca Raton, 494p.
- Winzer, K.; Winston, G.W.; Becker, W.; VanNoorden, C.J.F. & Kocheler, A. 2001. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicology*, 52: 143–155.

*Submetido em 31/07/2008.*  
*Aceito em 19/10/2008*

Apêndice II. Localização dos açudes de coleta dos espécimes de traíras utilizada nos experimentos.

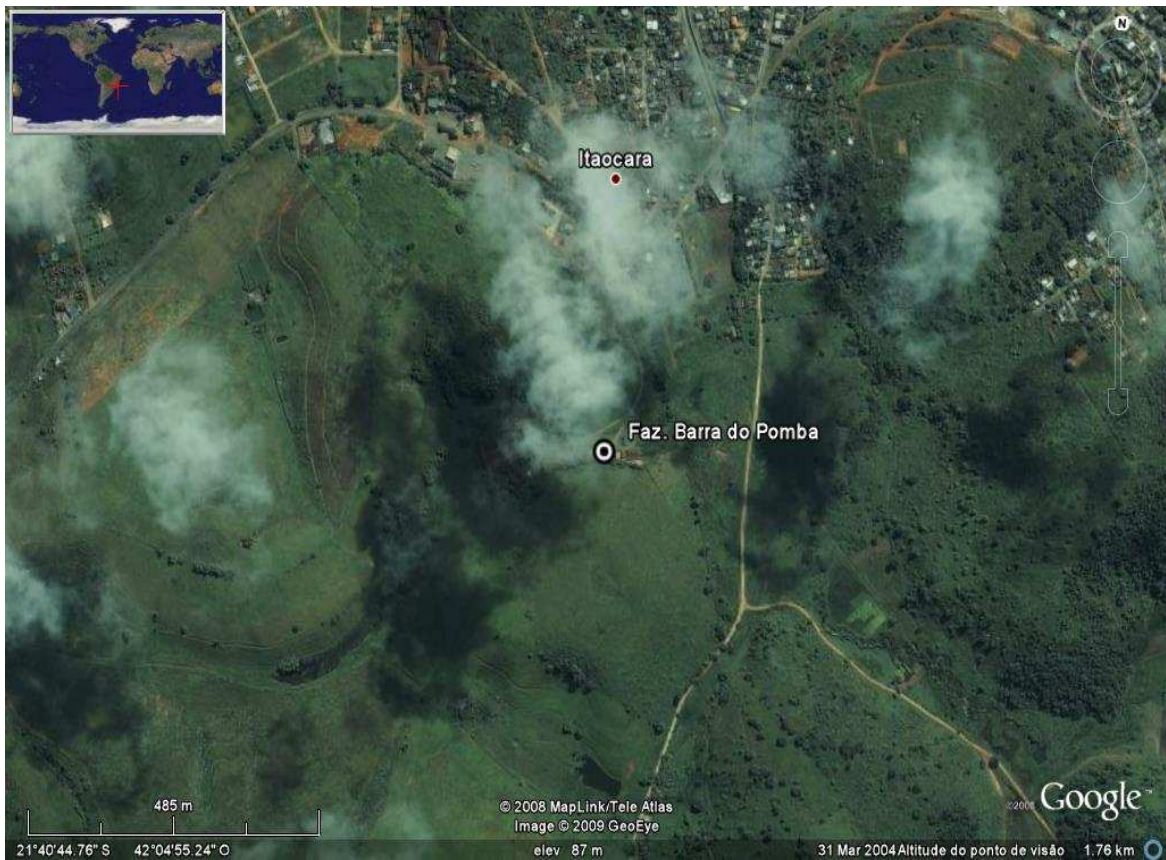


Figura 1. Localização dos açudes na Fazenda Barra do Pombo, município de Itaocara, noroeste do Estado Rio de Janeiro (21°40'44''S e 42° 04' 53'' W).

Apêndice III. Experimento laboratorial e retirada das amostras para análise.



Figura 2. Metodologia do experimento, (a) manutenção dos peixes no sistema de aquários para o ensaio agudo, (b) coleta de sangue das traíras, (c) biometria das traíras controle e tratadas com MeHg e HgCl<sub>2</sub>, (d) necropsia das traíras, (e) retirada das brânquias, (f) retirada do músculo, (g) retirada do rim anterior, (h) biometria do cérebro.

Apêndice IV. Níveis de significância na acumulação de Hg pelos tecidos analisados de traíras tratadas com HgCl<sub>2</sub> e traíras controle, nos diferentes tempos.

Tabela 1. Nível de significância na acumulação de Hg pelo fígado de traíras tratadas com HgCl<sub>2</sub> e traíras controle, nos diferentes tempos.

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
24 horas		0,001*	0,010*	0,071
48 horas			0,672	0,430
72 horas				0,666
Controle	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*

Valores com \* correspondem a concentrações significativamente diferentes

Tabela 2. Nível de significância na acumulação de Hg pelo fígado de traíras tratadas com MeHg e traíras controle, nos diferentes tempos.

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
24 horas		0,627	0,101	0,001*
48 horas			0,319	0,002*
72 horas				0,003*
Controle	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*

Valores com \* correspondem a concentrações significativamente diferentes

Tabela 3. Nível de significância na acumulação de Hg pelo cérebro de traíras tratadas com HgCl<sub>2</sub> e traíras controle, nos diferentes tempos.

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
24 horas		0,032*	0,275	0,065
48 horas			0,001*	0,592
72 horas				0,003*
Controle	0,006*	0,001*	0,001*	0,001*

Valores com \* correspondem a concentrações significativamente diferentes

Tabela 4. Nível de significância na acumulação de Hg pelo cérebro de traíras tratadas com MeHg e traíras controle, nos diferentes tempos.

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
24 horas		0,238	0,016*	0,018*
48 horas			0,024*	0,023*
72 horas				0,721
Controle	0,002*	0,001*	0,001*	0,001*

Valores com \* correspondem a concentrações significativamente diferentes

Tabela 5. Nível de significância na acumulação de Hg pelo rim de traíras tratadas com HgCl<sub>2</sub> e traíras controle, nos diferentes tempos.

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
24 horas		0,833	0,001*	0,738
48 horas			0,003*	0,610
72 horas				0,002*
Controle	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*

Valores com \* correspondem a concentrações significativamente diferentes

Tabela 6. Nível de significância na acumulação de Hg pelo rim de traíras tratadas com MeHg e traíras controle, nos diferentes tempos.

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
24 horas		0,000*	0,258	0,085
48 horas			0,643	0,027*
72 horas				0,053
Controle	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*

Valores com \* correspondem a concentrações significativamente diferentes

Tabela 7. Nível de significância na acumulação de Hg por músculos de traíras tratadas com HgCl<sub>2</sub> e traíras controle, nos diferentes tempos.

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
24 horas		0,101	0,007*	0,188
48 horas			0,002*	0,006*
72 horas				0,009*
Controle	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*

Valores com \* correspondem a concentrações significativamente diferentes

Tabela 8. Nível de significância na acumulação de Hg por músculos de traíras tratadas com MeHg e traíras controle, nos diferentes tempos.

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
24 horas		0,298	0,522	0,000*
48 horas			0,164	0,000*
72 horas				0,035*
Controle	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*

Valores com \* correspondem a concentrações significativamente diferentes



Tabela 9. Nível de significância na acumulação de Hg em brânquias de traíras tratadas com HgCl<sub>2</sub> e traíras controle, nos diferentes tempos.

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
24 horas		0,000*	0,000*	0,001*
48 horas			0,018*	0,079
72 horas				0,428
Controle	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*

Tabela 10. Nível de significância na acumulação de Hg em brânquias de traíras tratadas com MeHg e traíras controle, nos diferentes tempos.

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
24 horas		0,222	0,001*	0,314
48 horas			0,270	0,683
72 horas				0,039*
Controle	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*