

GILBERTO DIAS DE ALKIMIN

**TOXICIDADE DE CÁDMIO E ZINCO EM *Danio rerio*:
COMPARAÇÃO ENTRE VALORES PERMITIDOS EM LEGISLAÇÃO
PARA PROTEÇÃO DA VIDA AQUÁTICA E A POTENCIAL ATUAÇÃO
COMO INTERFERENTES ENDÓCRINOS**

Sorocaba
2016

GILBERTO DIAS DE ALKIMIN

**TOXICIDADE DE CÁDMIO E ZINCO EM *Danio rerio*:
COMPARAÇÃO ENTRE VALORES PERMITIDOS EM LEGISLAÇÃO
PARA PROTEÇÃO DA VIDA AQUÁTICA E A POTENCIAL ATUAÇÃO
COMO INTERFERENTES ENDÓCRINOS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fracácio Francisco

Sorocaba
2016

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia – Câmpus de Sorocaba

Alkimin, Gilberto Dias de.

Toxicidade de cádmio e zinco em *Danio rerio*: comparação entre valores permitidos em legislação para proteção da vida aquática e a potencial atuação como interferentes endócrinos / Gilberto Dias de Alkimin, 2016.

100 f.: il.

Orientador: Renata Fracácio Francisco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba), 2016.

1. Toxicidade - Testes. 2. Histologia. 3. Histoquímica. 4. Cadmio. 5. Zinco. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba). II. Título.

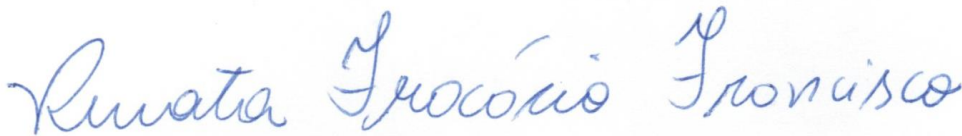
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Toxicidade de cádmio e zinco em Danio rerio: comparação entre valores permitidos em legislação para proteção da vida aquática e a potencial atuação como interferentes endócrinos..

AUTOR: GILBERTO DIAS DE ALKIMIN

ORIENTADORA: RENATA FRACACIO FRANCISCO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS AMBIENTAIS, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. RENATA FRACACIO FRANCISCO
Coordenação de Curso de Engenharia Ambiental - ICTS/ UNESP / UNESP - Sorocaba



PROFESSOR DOUTOR EVALDO LUIZ GAETA ESPINDOLA
Departamento de Hidráulica e Saneamento / ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS-USP



Prof.Dra. EVELISE NUNES FRAGOSO DE MOURA
Hidrobiologia / CCBS,UFUSCAR, Campus São Carlos

Sorocaba, 19 de fevereiro de 2016

A minha avó Hilda (*in memoriam*),
pessoa que não mediu esforços para
me ajudar a conquistar meus
objetivos e é responsável por parte da
criança, do homem e do pesquisador
que hoje sou.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a força Divina que rege a natureza, nos guarda e nos guia, pois sem ela nada disso seria possível.

A minha mãe Regina que sempre me apoiou e foi a base para que eu pudece concluir mais essa etapa da minha vida. Mãe, à senhora sou muito grato!

A Profa. Dra. Renata Fracácio, por acreditar no meu potencial mesmo quando eu não “sabia nada” de ecotoxicologia, pela paciência e pelos ensinamentos ao longo desse percurso. Re, muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Paulo Tonello, pelos diversos momentos de risada na sala dele ou no corredor, pela atenção e pelos ensinamentos durante esses dois anos.

Ao meu avô Waltides, que mesmo sem entender o que eu faço sempre se interessou em saber “como as coisas estão indo” e me incentivou a continuar. Valeu vô!

As minhas irmãs, Viviane, Regiane e Daniela e aos meus cunhados Danilo e Alex, pelos diversos momentos de incentivo, apoio, risadas e companheirismo que tornaram essa caminhada mais suave.

A Naty e ao Re, casal de amigos mais que especial, com quem pude dividir momentos de choro, de desespero, de alegria, risadas e gargalhadas e também de muitas gordices.

Ao Neto por ser um amigo, companheiro de balada e aventuras e por aturarem minhas chatisses nesse período (risos).

Ao Alison, pelo companheirismo inigualável nesses últimos meses!

A Paula, pela preocupação nos momentos difíceis, pelas risadas, pela confiança e pela comilança de japa e doces.

A Ju Polloni pelo apoio a esta caminhada, pelos finais de semana e feriados no laboratório e pelas coisas que fomos aprendendo juntos que propiciaram a realização deste trabalho.

Aos amigos de graduação (não citarei nomes pra não cometer injustiças) da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira/UNESP, que mesmo com o passar do tempo e a distância, sempre que possível se fizeram presentes me lembrando o quão bom foram e são os momentos ao lado deles e me deram forças pra continuar!

Ao Edilzo, Benildo e José Paulo, amigos de intercâmbio, que mesmo na outra ponta do país estiveram ao meu lado durante o mestrado, sempre com risada garantida e uma palavra amiga.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histologia (LATHIS) pelos momentos de descontração e pela ajuda na realização desta pesquisa.

Aos diversos “zebrinhas” (*Danio rerio*) que foram sacrificados nesta pesquisa em prol da ciência na busca por um mundo melhor com o meio ambiente mais saudável.

Ao Prof. Dr. André Henrique Rosa por permitir a utilização dos equipamentos do seu laboratório para leitura dos metais e a Cláudia por realizar as mesmas.

A Profa. Dra. Viviane Moschini Carlos pelo empréstimo do microscópio/câmera fotográfica e ao Fred pelo auxílio no manuseio.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba/UNESP, aos professores e seus funcionários, em especial os da pós-graduação, por proporcionarem estrutura e suporte para que essa etapa fosse concluída.

A todos aqueles aqui não citados que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo: 2012/14583-5) pelo recurso financeiro que deu suporte a esta pesquisa.

*“Sonhar, nunca desistir
Ter fé, pois fácil não é nem vai ser
Tentar até se esgotar suas forças (...)”*

Mc Gui

ALKIMIN, G. D. Toxicidade de cádmio e zinco em *Danio rerio*: comparação entre valores permitidos em legislação para proteção da vida aquática e a potencial atuação como interferentes endócrinos. 2016. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba, UNESP - Univ Estadual Paulista, Sorocaba, 2016.

RESUMO

A contaminação dos ambientes aquáticos por metais é uma preocupação mundial, pois são elementos bioacumulativos e persistentes. Diversos desses compostos possuem a capacidade de alterar o sistema endócrino (denominados interferentes endócrinos – IE), sendo o cádmio (Cd) e o zinco (Zn) suspeitos dessa atuação, segundo a literatura. Para verificação dessa potencialidade algumas análises biológicas são indicadas como: 1) a realização do teste de dessorção no auxílio ao posterior cálculo do fator de bioconcentração (FBC), para detecção do real valor incorporado do contaminante pelo organismo e predição dos efeitos tóxicos causados; 2) análises histológicas de órgãos como as gônadas e o fígado e 3) análise de vitelogenina (VTG) no fígado de machos. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi averiguar a atuação endócrina dos metais Cd e Zn em concentrações permitidas em ambientes aquáticos para a proteção da vida aquática por meio de: a) estudo do tempo de dessorção de Cd e Zn da parte externa do organismo; b) determinação do FBC de Cd e Zn em *D. rerio* após exposição crônica; c) avaliação da possibilidade de Cd e Zn provocarem alterações histológicas em gônada e fígado de machos e fêmeas de *D. rerio* e d) análise da capacidade de Cd e Zn em induzir a produção de VTG no fígado de machos de *D. rerio*. Para a realização do teste de dessorção, organismos adultos de *D. rerio*, foram expostos por 72 horas a Cd (1 µg de Cd/L) e Zn (180 µg de Zn/L) seguindo-se a lavagem do organismo-teste em ácido nítrico 2% por diferentes tempos (0h; 5; 60; 90; 120; 150 e 180 minutos) e posterior construção da curva de dessorção. As análises de FBC, histologia e histoquímica foram realizadas após exposição crônica (21 dias) em regime semi-estático, com troca total da solução a cada 72 horas, em separado a concentrações permitidas por legislação nacional (1 µg de Cd/L e 180 µg de Zn/L) e internacional (0,25 µg de Cd/L e 120 µg de Zn/L) para proteção da vida aquática. Desse modo, após o final da exposição organismos foram levados a digestão, leitura da concentração do contaminante e o FBC foi calculado, bem como machos e fêmeas foram sacrificados e passaram por procedimento de preparo histológico, corados com hematoxilina e eosina e análise qualitativa de gônada e fígado e machos após preparo histológico sofreram marcação histoquímica para detecção de VTG no fígado. Pelos resultados obtidos, verificou-se que a dessorção dos metais apresentou diferença, sendo a dessorção de Cd realizada em 90 minutos e a de Zn em 60 minutos; a bioconcentração de Cd foi semelhante nas duas concentrações de exposição e a de Zn foi inversamente proporcional à concentração exposta. As análises histológicas mostraram que Cd e Zn provocam alterações de forma pronunciada tanto em gônadas quanto em fígados de fêmeas, enquanto gônadas de machos não sofreram graves alterações e os fígados apresentaram lesões que podem comprometer o funcionamento do órgão, além disso, observou-se a produção de VTG no fígado de machos de *D. rerio* expostos a Cd e Zn. Por fim, a união das técnicas utilizadas comprova que Cd e Zn, mesmo em concentrações permitidas por legislação são capazes de atuarem como IE em *D. rerio*, necessitando de mudanças na legislação para valores mais restritivos com a finalidade de garantir a saúde endócrina dos organismos aquáticos.

Palavras-chave: Toxicidade - Testes. Histologia. Histoquímica. Cadmio. Zinco.

ALKIMIN, G. D. Cadmium and zinc toxicity in *Danio rerio* comparison of values allowed in law for protection of aquatic life and potential actions as endocrine disruptors. 2016. 100 f. Dissertation (Master's degree Environmental Sciences) – Institute of Science and Technology of Sorocaba, UNESP - Univ Estadual Paulista, Sorocaba, 2016.

ABSTRACT

The contamination of aquatic environments by metals is a global concern because they are bioaccumulative and persistent elements. Several such compounds have the ability to change the endocrine system (called endocrine disruptors - ED), and cadmium (Cd) and zinc (Zn) that suspicious activity, according to the literature. To verify the potential some biological analyzes are given as: 1) the realization of the desorption test to aid the subsequent calculation of bioconcentration factor (BCF), for determining the real corporate value of the contaminant by the body and prediction of toxic effects; 2) histological analysis of organs such as the gonads and liver and 3) analysis of vitellogenin (VTG) in the liver of males. Thus the aim of this study was to determine the endocrine actions of Cd and Zn in allowed concentrations in aquatic environments for the protection of aquatic life through: a) study time desorption of Cd and Zn from outside the body; b) determination of CBF of Cd and Zn in *D. rerio* after chronic exposure; c) assessment of the possibility of Cd and Zn cause histological changes in the liver and gonads of males and females of *D. rerio* d) analysis of the ability of Cd and Zn in inducing the production of VTG in the liver of males of *D. rerio*. To perform the desorption test, adult organisms of *D. rerio* were exposed for 72 hours Cd (1 µg/L of Cd) and zinc (180 µg/L of Zn) followed by washing of the organism under test 2% nitric acid for different times (0 h, 5, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes) and subsequent construction of desorption curve. The analyses of BCF, histologic and histochemical were performed after chronic exposure (21 days) under semi-static system, with complete exchange of the solution every 72 hours in separate concentrations allowed by national legislation (1 µg of Cd/L and 180 µg of Zn/L) and international (0.25 µg Cd/L and 120 µg Zn/L) for protection of aquatic life. Thus, after the end of exposure organisms were taken digestion, of the contaminant concentration of the reading and the CBF was calculated as well as males and females were euthanized and underwent histological preparation procedure, stained with hematoxylin and eosin and qualitative analysis of gonads and liver histological was performed and males after preparing suffered histochemical staining VTG detection in the liver. This way the desorption of metals it was different, with desorption of Cd performed in 90 minutes and Zn in 60 minutes, the bioconcentration of Cd was similar in both exposure concentration and the Zn was inversely proportional to the concentration exposed, histological analyzes show that Cd and Zn cause pronounced changes in both gonads, as in female livers, but the gonads of male suffered no serious changes and livers showed lesions that can compromise the function of organ, besides, it was observed VTG production in the liver *D. rerio* males exposed to Cd and Zn. Finally, the union of techniques shows that Cd and Zn, even at concentrations allowed by law are able to act as IE in *D. rerio*, requiring changes in legislation for more stringent values in order to ensure the endocrine health organisms water.

Keywords: Toxicity - Tests. Histology. Histochemistry. Cadmium. Zinc.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1.1 A PROBLEMÁTICA AMBIENTAL: ÊNFASE PARA INTERFERENTES ENDÓCRINOS	4
1.2 METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS: ÊNFASE PARA CÁDMIO E ZINCO	10
CAPÍTULO 2: APLICAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO FATOR DE BIOCONCENTRAÇÃO DOS METAIS CÁDMIO E ZINCO SOBRE <i>DANIO RERIO</i>: É POSSÍVEL GERAR UM PROTOCOLO AFIM DE SE DETECTAR UM VALOR REAL EM TESTES LABORATORIAIS?.....	19
RESUMO.....	19
2.1 INTRODUÇÃO	19
2.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	22
2.2.1 Bioconcentração de cádmio e zinco em adultos de <i>Danio rerio</i>	22
2.2.2 Teste de desorção para cádmio e zinco da parte externa de <i>Danio rerio</i> - Proposta metodológica	23
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
2.4 CONCLUSÕES	29
CAPÍTULO 3: HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO E GÔNADA DE <i>DANIO RERIO</i> EXPOSTO AO CÁDMIO E ZINCO EM CONCENTRAÇÕES PERMITIDAS PELA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA E NORTE AMERICANA	31
RESUMO.....	31
3.1 INTRODUÇÃO	31
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.2.1 Animais	34
3.2.2 Químicos	34
3.2.3 Exposição.....	35
3.2.4 Teste de Reprodução.....	35
3.2.5 Histologia.....	36
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.4 CONCLUSÕES	67
CAPÍTULO 4: ANÁLISE DE VITELÓGENINA POR MÉTODO HISTOQUÍMICO COMO INDICADOR DE EFEITO ESTROGÊNICO EM <i>DANIO RERIO</i> EXPOSTO A CÁDMIO E ZINCO	68
RESUMO.....	68

4.1 INTRODUÇÃO	68
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	71
4.2.1 Peixes e manutenção	71
4.2.2 Substâncias químicas	71
4.2.3 Exposição	72
4.2.4 Análise histoquímica	72
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.4 CONCLUSÕES	79
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
APÊNDICE A – PROCEDIMENTOS BÁSICOS PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE DESSORÇÃO DE METAIS DA PARTE EXTERNA DE <i>DANIO RERIO</i>	82
APÊNDICE B – PROCEDIMENTOS PARA MARCAÇÃO HISTOQUÍMICA DE VITELOGENINA (VTG)	83
REFERÊNCIAS	85

APRESENTAÇÃO

A qualidade dos ecossistemas, em especial o aquático, vem sendo alterada nas últimas décadas e intensificada ao longo delas, principalmente por meio de ações antrópicas decorrentes da industrialização após a revolução industrial. Essa alteração ocorre em parte pela contaminação dos corpos d'água por produtos químicos orgânicos e inorgânicos levando a perda dos seus usos múltiplos e ameaçando a sobrevivência dos organismos aquáticos.

Dentre os elementos encontrados no ambiente aquático pode-se destacar os metais potencialmente tóxicos, que são divididos em duas categorias, os essenciais, aqueles que apresentam função biológica definida, e os não-essenciais, aqueles que não apresentam significado metabólico conhecido. Porém, ambas as categorias apresentam importância ecológica devido ao potencial de acumulação biológica e possível desencadeamento de toxicidade em função desses elementos serem persistentes no ambiente.

Recentemente as pesquisas científicas têm destacado a possibilidade de diversas substâncias químicas, incluindo-se metais essenciais e não essenciais, atuarem como interferentes endócrinos (IE). Por definição, IE é toda substância que possui a capacidade de afetar o sistema endócrino do organismo causando prejuízos a ele e/ou a sua prole, mesmo em baixas concentrações e por um longo período de exposição, considerando o ciclo de vida do organismo (OECD, 2012a).

Nesse sentido, considerando-se que os metais potencialmente tóxicos apresentam a capacidade de persistência no ambiente, ampla distribuição global e concentrações-traço nas águas superficiais, merecem destaque quanto à investigação da possibilidade de atuarem como IE's. Tal avaliação deve ser realizada com organismos-teste de diversos níveis tróficos e em concentrações representativas tanto de ambientes naturais, quanto com aquelas consideradas protetivas à vida aquática, por legislações vigentes.

Diante do exposto, a presente pesquisa buscou contribuir com informações acerca da temática “Metais potencialmente tóxicos e a (possível) atuação como IE” de modo a responder as seguintes questões: 1) os metais potencialmente tóxicos Cd e Zn atuam como IE em organismos representativos de água (por meio de testes de toxicidade com o

organismo-teste *Danio rerio*)? e 2) as concentrações permitidas em legislação nacional e internacional asseguram a integridade endócrina, considerando períodos crônicos de exposição?

Para tanto, fez-se uso do organismo-teste *Danio rerio* e dos metais potencialmente tóxicos, cádmio (Cd) (metal não essencial) e zinco (Zn) (metal essencial), como substâncias-teste.

Afim de facilitar o entendimento da pesquisa por meio dos resultados obtidos, a dissertação foi estruturada na forma de capítulos-artigos, da seguinte maneira:

- Capítulo 1: **Revisão bibliográfica.** Neste capítulo explora-se a problemática da contaminação de ambientes aquáticos por metais potencialmente tóxicos, enfatizando-se a potencial capacidade de atuarem como IE e discute-se sobre a segurança de exposição da biota em concentrações limites estabelecidas em legislações nacionais e internacionais para proteção da vida aquática;
- Capítulo 2: **Aplicação ecotoxicológica do fator de bioconcentração dos metais cádmio e zinco sobre *Danio rerio*: é possível gerar um protocolo afim de se detectar um valor real em testes laboratoriais?.** Neste capítulo são expostos os resultados obtidos na presente pesquisa, destacando-se os valores de bioconcentração dos metais no organismo-teste exposto as concentrações testadas, com base na legislação nacional - CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005, Cd = 1µg/L e Zn = 180µg/L) e internacional (Cd = 0,25µg/L - USEPA, 2001 - e Zn = 120 µg/L - USEPA, 1995) e faz-se uma proposta metodológica para suprir a falta de técnicas que se preocupem com o contaminante adsorvido na parte externa do organismo-teste para cálculos do fator de bioconcentração;
- Capítulo 3: **Histopatologia de fígado e gônada de *Danio rerio* exposto ao cádmio e zinco em concentrações permitidas pela legislação brasileira e norte americana.** Apresenta os resultados qualitativos de histologia dos tecidos de gônada e fígado de machos e fêmeas de *D. rerio* expostos a Cd e Zn (mesmas concentrações testadas no capítulo 2), como biomarcadores morfológicos para avaliar a potencial IE dos metais.
- Capítulo 4. **Análise de vitelogenina por método histoquímico como indicador de efeito estrogênico em machos de *Danio rerio* expostos a cádmio e zinco.** Último capítulo da dissertação e expõe dados obtidos através da realização da histoquímica

do fígado de machos de *D. rerio* para detecção da possível presença de vitelogenina. Essa proteína é um biomarcador específico para detectar IE quando presente em machos. Trata-se de uma abordagem pouco utilizada na literatura, mas, com capacidade de fornecer informações importantes sobre a atuação de contaminantes ambientais, como IE, a baixos custos.

Por fim a dissertação apresenta uma conclusão geral, levando em consideração o embasamento teórico apresentado no capítulo 1 e os resultados da pesquisa obtidos nos capítulos 2, 3 e 4, fornecendo assim dados importantes sobre a atuação de metais como possíveis IE e que possam contribuir com dados literários existentes a auxiliar órgãos governamentais na tomada de decisões quanto a valores permitidos de metais na legislação para proteção da vida aquática assegurando a integridade endócrina dos organismos.

CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica

1.1 A problemática ambiental: ênfase para interferentes endócrinos

Os múltiplos usos das águas, destacando-se a proteção da vida aquática, estão ameaçados nas próximas décadas principalmente em função da contaminação química. O ambiente aquático é altamente susceptível a poluição, em parte porque é local considerável e intencional de liberação de produtos químicos, através de lançamentos de efluentes de esgoto doméstico e industrial, além de receber descargas acidentais de produtos químicos através de derramamentos, run-off, deposição atmosférica, vazamento de fossas sépticas e aterros (SUMPTER, 2005; BURKHARDT-HOLM, 2010).

Desde o século XIX até o presente, o desenvolvimento industrial crescente e a expansão dos grandes centros urbanos propiciou a intensificação e diversificação da produção industrial para diferentes fins (AMÉRICO et al., 2012; FERNICOLA; BOHRER-MOREL; BAINY, 2004; TUNDISI, MATSUMURA-TUNDISI, 2011). Tanto o processo produtivo quanto o consumo de tais produtos pela sociedade tem acarretado a entrada acelerada de resíduos químicos nos sistemas aquáticos, desencadeando impactos à saúde ambiental a curto, médio e longo prazo (HACON, 2004). Nos Estados Unidos da América (EUA) registram-se de 1.200 a 1.500 novas substâncias químicas por ano (FONTENELE et al. 2010) e mundialmente apenas em 2014 foram registradas mais substâncias químicas que o período de 1965 a 1990 (CAS, 2015) dentre essas, algumas com comprovada atividade hormonal e outras com ausência desse conhecimento.

Nesse contexto, quando uma substância ou grupo químico atua mimetizando um hormônio, estimulando ou bloqueando a atuação normal de um hormônio nos sistemas biológicos, ele é conhecido como interferente endócrino (IE). Dessa maneira, há grande interesse científico internacional de investigar quais grupos químicos podem atuar no ambiente aquático como tal (IE) (BILA; DEZOTTI, 2007).

Existem diferentes definições para IE. A Organização Mundial da Saúde – OMS (BERGMAN et al., 2012) define como substâncias exógenas que alteram a função do sistema endócrino e conseqüentemente causam efeitos adversos sobre a saúde de um organismo intacto, de sua progênie e de suas populações, definição essa também adotada

pela Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico – OECD (OECD, 2012a).

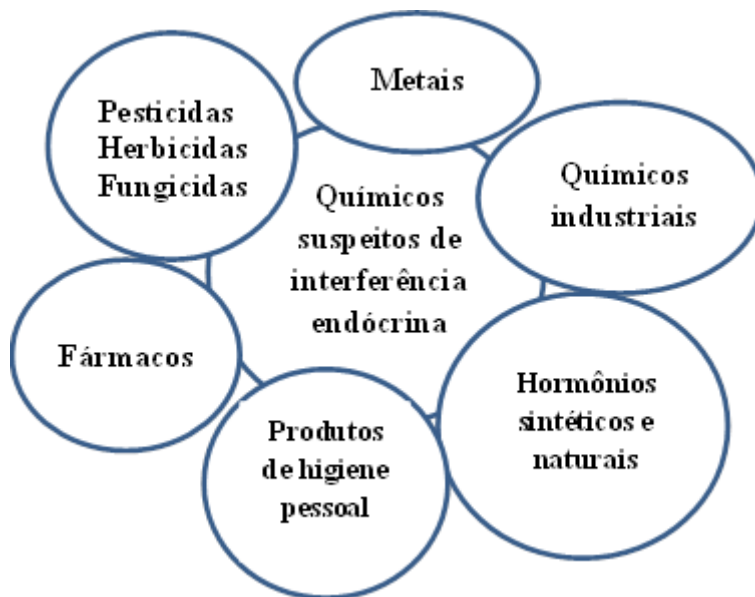
O Programa Internacional de Segurança Química - IPCS define como substâncias ou misturas presentes no ambiente capazes de interferir nas funções do sistema endócrino, causando efeitos adversos em um organismo intacto ou na sua prole (FONTENELE, 2010).

Para a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) IE são substâncias químicas capazes de mimetizar um hormônio natural enganando o corpo e o levando a responder a estímulos em excesso ou de forma inadequada, ou ainda bloqueiam o efeito de determinados receptores hormonais e aquelas que estimulam ou inibem diretamente o sistema endócrino causando superprodução ou subprodução de hormônios (USEPA, 2015), ressaltando que os diversos produtos possuem efeitos variáveis (ANDRADE-RIBEIRO et al., 2006).

De acordo com Chichizola (2003) o número de substâncias químicas investigadas em relação a sua toxicidade hormonal, ou seja, seus efeitos no sistema endócrino é mínimo, levando-se em consideração o número de substâncias com possível efeito endócrino, em humanos ou animais como mostra a Figura 1 que apresenta diversas classes de compostos químicos como metais (DYER, 2007), hormônios (VANDENBERG et al., 2012), pesticidas (MNIF et al., 2011), fármacos (CALIMAN; GAVRILESCU, 2009) e até mesmo produtos de higiene pessoal (WITORSCH; THOMAS, 2010) que possuem suspeita e investigação acerca da possível atuação como IE.

Sodré et al., (2007) ainda destacam outros grupos de potenciais substâncias consideradas IE no meio aquático como: a) os plastificantes (ftalatos e bisfenol-A); b) os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA); c) as bifenilas policloradas; d) os estrogênios naturais e artificiais e e) os retardantes de chamas bromados. Segundo os autores, tais substâncias atingem os corpos de água por meio de fontes pontuais e difusas de poluição, tornando os IE um problema crônico nestes ambientes.

Figura 1 - Possíveis substâncias químicas com efeito endócrino.



Fonte: Adaptado de DNRPWTD (2007).

Corroborando a Figura 1, Sumpter (2005) destaca que é sabido a existência no meio ambiente de muitos produtos químicos capazes de causar perturbações endócrinas, estes podem ter diferentes tipos de atividade (por exemplo, estrogênica, anti-androgênica), e fazer com que os seus efeitos sejam expressos através de diferentes mecanismos de ação (ou seja, ser agonistas ou antagonistas, endógeno a hormônios, ou afetar a síntese de hormônios e/ou metabolismo).

Além disso, os efeitos dessas substâncias sobre os organismos dependem da intensidade do estresse, do tempo de contato com o organismo, da frequência a que este organismo é exposto, da biologia, da fase de vida e da etapa do ciclo reprodutivo da espécie (KENDALL et al., 1998), sendo o período de desenvolvimento, gestação e lactação os mais susceptíveis (KAVLOCK et al., 1996).

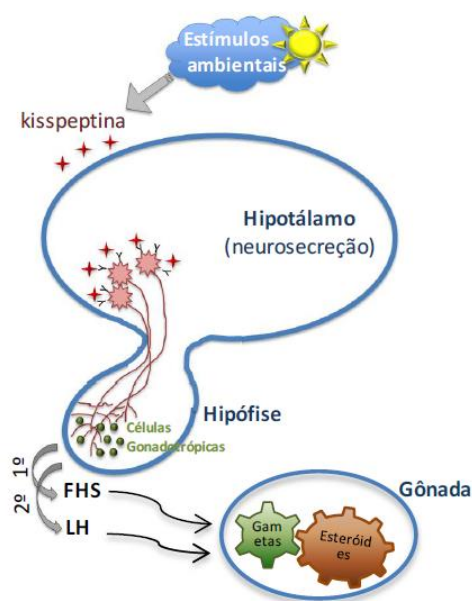
Isso ocorre porque o sistema endócrino é um dos componentes indispensáveis do processo de adaptação do organismo às mudanças nos meios internos e externos. É um dos sistemas mais complexo e diverso, pois possui mecanismos variados e sofisticados que controlam diversas funções nos organismos. Entre essas funções estão a síntese, a liberação

e a ativação hormonal, o transporte na circulação, bem como o metabolismo e a distribuição para a superfície ou o interior das células nas quais atuam (SANCHEZ, 2006).

Esse sistema apresenta íntima interação com o sistema nervoso, e ambos juntos controlam a homeostase e a resposta orgânica às diferentes situações ambientais. O sistema nervoso informa o sistema endócrino sobre o meio externo, e o sistema endócrino regula a resposta orgânica à condição informada (CHACON; LUCHIARI, 2011).

Portanto, ambos controlam e regulam as funções orgânicas. As principais glândulas que constituem o sistema são: hipotálamo, hipófise, tireóide, adrenais, pâncreas e gônadas (CHACON; LUCHIARI, 2011) e o principal link entre elas é o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal que é o componente mais complexo do sistema endócrino (Figura 2).

Figura 2 - Funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em peixes.



Fonte: Almeida (2013).

Dessa forma, os estímulos favoráveis (externos e internos) estimulam regiões do hipotálamo provocando a secreção de GnRH (hormônio liberador de gonadotropina), que estimula as células gonadotrópicas da hipófise, secretando assim os hormônios gonadotrópicos (FSH e LH) (Weltzien et al., 2004).

Estes hormônios interagem com seus receptores gonadais e influenciam a produção de esteróides sexuais (andrógenos, progestágenos e estrógenos), responsáveis por manter o funcionamento gonadal. Nas fêmeas, estes esteróides (estrógeno), estimulam o fígado a

produzir a proteína vitelogenina (VTG) que posteriormente será incorporada aos oócitos no ovário, auxiliando na maturação e desenvolvimento gonadal, bem como no desenvolvimento embrionário em uma etapa seguinte.

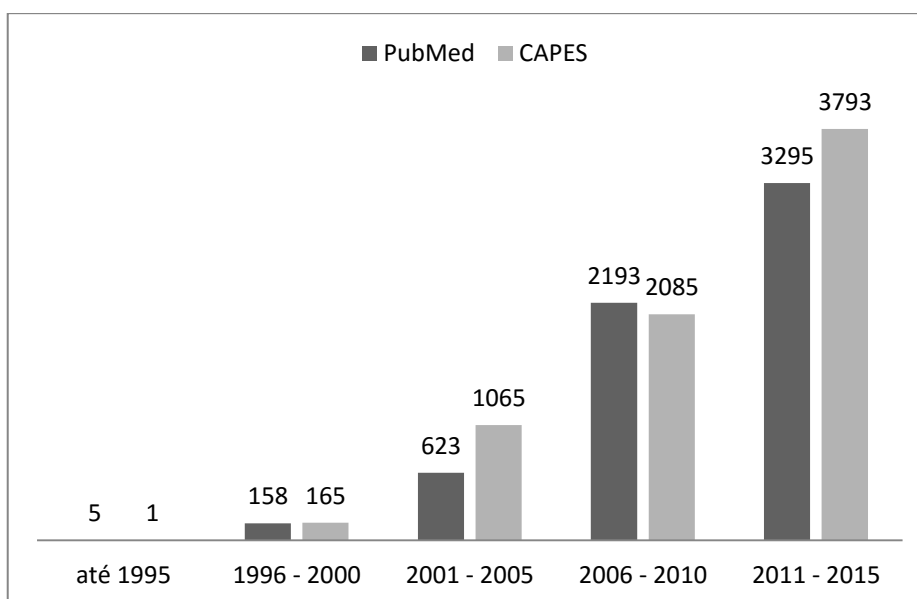
Além disso, os esteróides sexuais realizam um controle em diferentes estruturas do eixo, como no encéfalo e hipófise, controlando dessa forma o processo reprodutivo. Porém esses diversos estímulos podem sofrer interferência de compostos químicos, provocando alterações endócrinas, ou seja, agindo como interferentes endócrinos.

As características dos fatores abióticos (compostos químicos), as propriedades físico-químicas dos IE, bem como as condições ambientais em que eles se encontram, determinam o seu modo de ação refletindo no funcionamento endócrino (TILLITTI et al., 1998). Desta maneira, as funções reprodutivas, o desenvolvimento, o comportamento, a imunidade e a sobrevivência, nos diferentes organismos, podem ser comprometidos (NICHOLS et al., 2011).

Por outro lado, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação dessas substâncias (SODRÉ et al., 2007), fato comprovando em revisão bibliográfica onde pode-se observar a falta de trabalhos que elucidassem esses mecanismos, uma vez que metais ainda são pouco estudados como possíveis interferentes endócrinos. Porém, este é um fator de extrema importância para o entendimento dos compostos químicos que atuam como IE.

Sabe-se que o sistema endócrino é complexo e variável de acordo com a espécie, além de ser precursor de diversas funções biológicas, dificultando assim o entendimento dos mecanismos de ação dessas substâncias (TARRANT et al., 2005) fator chave para prevenção de seus efeitos.

De acordo com Crisp et al. (1998), a preocupação com esse tipo de substância química visando a possível perturbação do sistema endócrino de seres humanos e animais remonta a década de 1990, e vem crescendo com o passar dos anos como mostra o Gráfico 1, onde é possível perceber que até o ano de 1995, de acordo com o portal e periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES apenas um artigo havia sido publicado com o termo “interferente endócrino” – do inglês “endocrine disruptor” – dando um salto para mais de 3700 trabalhos apenas no último quinquênio (2011 – 2015).

Gráfico 1 - Número de publicações indexadas com o termo “endocrine disruptor”.

Fonte: o autor.

Tal revisão reforça que nos últimos anos vários trabalhos vem sendo realizados na tentativa de comprovar os efeitos causados a exposição aos IE frente a biota, principalmente aquática, uma vez que a maioria dos compostos tem como destino final esses ambientes.

Pode-se afirmar que pouco se sabe sobre a ação dos IE, e quais os compostos que possuem tal capacidade. Existe a suspeita de muitas substâncias, porém, poucos com ação confirmada, sendo a comprovação dessas substâncias dificultadas, isso porque o sistema aquático é uma mistura complexa de substâncias, onde as mesmas podem interagir e sua forma de ação sofrer alguma modificação, podendo agir de forma agonista ou antagonista. Vale ressaltar que no Brasil não existe legislação vigente pertinente a proteção da vida aquática com vista a atuação endócrina de substâncias químicas.

Em relação à pesquisa científica, mais estudos precisam ser elaborados visando esclarecer o papel dos contaminantes ambientais sobre os diversos distúrbios endócrinos e metabólicos, certos tipos de câncer, entre outras enfermidades, cabendo à comunidade científica, por meio de suas sociedades, fornecer informações seguras aos órgãos governamentais e à população em geral. Assim, medidas cabíveis, como alteração da legislação, aumento da fiscalização e mudanças na forma de despejo de rejeitos químicos

poderão ser empregadas de modo a minimizar os potenciais danos atribuíveis aos IE sobre o meio ambiente e a saúde do homem (FONTENELE et al., 2010), uma vez que este problema da vida moderna pode colocar a existência de muitas espécies em risco (SIMÕES et al., 2014).

Por fim, de acordo com Tundisi e Matsumura-Tundisi (2011) a interferência endócrina de substâncias químicas deverá ser foco e um dos principais objetivos de pesquisa científica dos próximos 25 anos.

1.2 Metais potencialmente tóxicos: ênfase para cádmio e zinco

Pesquisas sobre IE possuem o foco em compostos orgânicos como inseticidas, detergentes, solventes, hormônios, retardantes de chama e outros produtos que estão presentes nos corpos d'água em detrimento de compostos inorgânicos, como é o caso dos metais, que também estão presentes nos referidos sistemas e caracterizam-se por serem persistentes, bioacumulativos e potencialmente tóxicos, (BIANCHINI; MARTINS; JORGE, 2009).

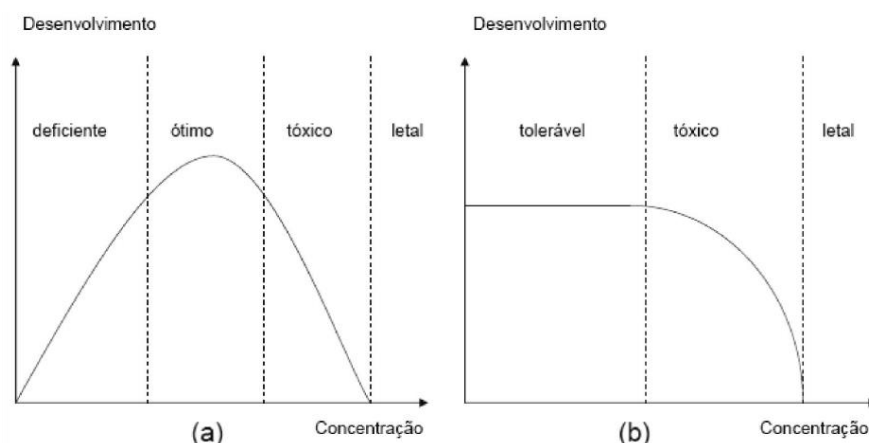
Assim, uma vez no ecossistema aquático, os metais são distribuídos nos diversos compartimentos do ambiente, como solo, sedimento, plantas e animais (SANTANA; BARRONCAS, 2007), sendo que a sua possível toxicidade depende de inúmeros fatores como a sintomatologia específica varia de acordo com o metal em questão, a dose total absorvida e se a exposição foi aguda ou crônica (ADAL; WIENER, 2014), bem como a via de exposição, podendo os efeitos distribuírem-se pelo organismo, afetando vários órgãos, alterando processos bioquímicos, organelas e até mesmo membranas celulares (NAKANO, ÁVILA-CAMPOS, 2009).

Dentre os metais, alguns como o ferro, zinco e cobalto são essenciais aos seres vivos, pois mesmo em pequenas concentrações apresentam importante papel no funcionamento do metabolismo, uma vez que participam dos processos fisiológicos. Por outro lado, metais como o cádmio, mercúrio e chumbo (não-essenciais) não possuem função biológica conhecida e são geralmente tóxicos a uma variedade de organismos (MASSABNI, 2006).

A figura 2 apresenta o comportamento desses elementos no desenvolvimento dos organismos em relação a concentração de exposição. Pode-se perceber que mesmo o metal

essencial (Figura 3) em uma determinada concentração pode apresentar toxicidade, fato esse corroborado por Esteves e Guariento (2011), assim como o metal não essencial (Figura 3) não apresenta fases de deficiência e ou concentração ótima, apenas concentração tolerável, aquele em que o organismo consegue sobreviver sem ser afetado e a fase tóxica a qual o organismo sofre efeito da exposição.

Figura 3 - Comportamento de metais no organismo.



Fonte: Modificado de Martin; Sigal (1980 citado por Silva, 2002).

Legenda: A) Metal essencial e B) Metal não-essencial.

No ambiente aquático os metais podem se apresentar na forma iônica, particulada, dissolvida e/ou complexada distribuindo-se por diferentes compartimentos através de vários processos, tais como: 1) interações iônicas simples; 2) associação com partículas; 3) nucleação e aglomeração; 4) oxidações e reduções químicas e biológicas; 5) complexação com ligantes; 6) adsorção e absorção por microorganismos, e sua disponibilidade química depende também da sua forma/espécie e características do meio como pH e o potencial de oxi-redução do próprio meio (PEDROZO; KUNO, 2008; BIANCHINI; MARTINS; JORGE, 2009; ESTEVES; GUARIENTO, 2011).

Dessa maneira, um organismo aquático, pode apresentar dois tipos básicos de comportamento em relação aos metais: ou é sensível à ação tóxica de um determinado metal, ou não é sensível mas o bioacumula, potencializando seu efeito nocivo através das cadeias alimentares de forma a colocar em risco organismos situados nos topos destas cadeias (VIARENGO, 1989), por isso, a toxicidade dos metais é algo que vem sendo discutido e estudado a muitos anos (JULA, 1971).

Em relação ao efeito de interferência endócrina dos metais os autores Iavicoli; Fontana; Bergamaschi (2009) fazem quatro recomendações:

(1) identificar os mecanismos de ação, porque no momento só alguns foram elucidados. Neste contexto, a possível presença de hormese necessita de ser determinado, como atualmente isso foi relatado exclusivamente para a exposição Cd e arsênio (As); (2) estudar o possível efeito aditivo, sinérgico, ou antagonista sobre o sistema endócrino, após a exposição a uma mistura de metais, uma vez que há uma falta de disponibilidade destes estudos, e em ambientes ocupacionais ou gerais; (3) avaliar os potenciais efeitos adversos sobre o sistema endócrino de exposições de baixo nível para os metais, uma vez que a maioria das informações disponíveis atualmente sobre os químicos disruptores endócrinos provém de estudos em que os níveis de exposição foram particularmente elevados; e (4) avaliar os efeitos de outros metais presente no ambiente em geral sobre os sistemas endócrino e reprodutivo (p. 206).

Na visão de Salgado (2008), um dos metais que merece destaque é o Cd, visto que o mesmo é colocado em oitavo na lista prioritária de substâncias listadas como sendo perigosas.

O Cd é um metal encontrado na natureza associado a sulfetos de minérios de Zn, Cu e Pb. As fontes naturais de Cd na atmosfera são a atividade vulcânica, a erosão de rochas sedimentares e fosfáticas e os incêndios florestais (CETESB, 2012a), porém as fontes antropogênicas como mineração, produção de metais, combustão de combustíveis fósseis e deposição inadequada de produtos que utilizam Cd em sua constituição, por exemplo baterias de Ni-Cd, e emissões industriais são as maiores responsáveis pela contaminação por Cd e o aumento da sua concentração no ambiente (UNEP, 2010).

Determinados sais e complexos de Cd são solúveis e apresentam significativa mobilidade na água, enquanto as formas não solúveis ou adsorvidas ao sedimento apresentam pouca mobilidade. O Cd adsorvido a argila ou material orgânico pode entrar na cadeia alimentar, sendo o íon Cd a forma mais comum de disponibilidade para os organismos aquáticos e sua absorção influenciada pela dureza da água (SALGADO, 2008).

Ramírez (2002) destaca que o Cd é um dos maiores agentes tóxicos associados a contaminação industrial e ambiental porque reúne características importantes relacionadas a possibilidade de atuação como elemento tóxico: 1) acarreta efeitos adversos no homem e no meio ambiente; 2) bioacumulável; 3) persistente no meio ambiente e 4) capaz de se locomover por grandes distâncias através do vento ou de corpos d'água.

Os efeitos observados em animais aquáticos expostos a Cd são variados, como mostra a Tabela 1, onde podemos observar efeitos como a redução na taxa de natação de organismos aquáticos, diminuição enzimática, alterações histológicas em diferentes órgãos e espécies, entre outros efeitos.

A mesma Tabela ainda auxilia na percepção de que os efeitos tóxicos provocados por Cd dependem de diferentes fatores como a concentração de exposição e a espécie em questão, afirmação corroborado por Gomes et al. (2009) quando determinada a $CL_{50} - 96h$ para curimatã (*Prochilodus vimboides*) e piaçu (*Leporinus macrocephalus*), e encontra valores de sensibilidade diferentes ($CL_{50} - 96h$ de 3,16 e 7,42 mg/L respectivamente), sendo o curimatã, aproximadamente duas vezes mais sensível a esse elemento em relação ao piaçu.

As diferentes concentrações estudadas nas pesquisas acima podem não causar a morte do organismo, mas os efeitos observados são prejudiciais e de modos diferentes podem influenciar na sobrevivência e/ou no desenvolvimento da espécie e até mesmo na reprodução. Alterações no tecido branquial (GARCIA-SANTOS, 2007) podem diminuir a capacidade respiratória e conseqüentemente causar mudanças no comportamento do organismo e em um período prolongado a morte por insuficiência respiratória, assim como a mudança do comportamento de fuga, tornando o organismo mais susceptível a predadores ou alterações nos níveis energéticos (SORNOM et al., 2012), bem como alterações nos gametas (MOREIRA, 2010) que influenciam na capacidade reprodutiva.

Tabela 1 - Efeitos tóxicos detectados em diferentes organismos aquáticos quando expostos à concentrações de cádmio em diferentes tempos de exposição.

Organismo	Concentração(ões) estudada	Tempo de exposição	Efeito(s) observado(s)	Autor(es)
<i>Rhamdia quelen</i> (peixe)	170 e 340 µg/L	7 e 14 dias	Alterações enzimáticas e metabólicas	Pretto (2008)
<i>Dikerogammarus villosus</i> (camarão)	500 µg/L	4 minutos e 24 horas	Efeito celular tóxico, mudanças no comportamento de fuga a curto prazo e afetou as reservas energéticas	Sornom et al. (2012)
<i>Gammarus aequicauda</i> (anfípoda)	240 e 280 µg/L	48 horas	Diminuição na atividade de natação no período noturno	Morillo-Velarde et al. (2010)
<i>Lymnaea luteola</i> (caracol)	32, 100, 320, 560 e 1000 µg/L	7 semanas	Redução no crescimento e nas taxas de consumo	Das; Khangarot (2010)

			alimentar	
<i>Tanytarsus dissimilis</i> (quíronomídeo)	3,8 µg/L	10 dias	Redução no crescimento e na sobrevivência	Anderson et al. (1980)
<i>Achatina fulica</i> (caracol)	500 e 1000 µg/L	48 horas	Alterações bioquímicas na glândula digestiva e no rim	Chandran et al. (2005)
<i>Gymnotus carapo</i> (peixe)	30 e 40 µM	Entre 24 e 96 horas	Alterações histológicas na gônada, morfológicas no fígado e no rim e deformidade nos espermatozoides	Moreira (2010)
<i>Oreochormis niloticus</i> (peixe)	25000 µg/L	96 horas	Alterações histológicas nas brânquias	Garcia-Santos (2007)
<i>Ophiocephalus striatus</i> (peixe)	630 µg/L	96 horas	Alterações histológicas nas brânquias, fígado, estômago e intestino	Bais; Lakhand (2012)
<i>Esomus danricus</i> (peixe)	6,36; 63,6; 636,3 µg/L	28 dias	Alteração histológica no intestino	Das; Gupta (2013)

Fonte: o autor.

Através dos estudos acima é possível perceber a periculosidade apresentada pelo Cd com vista a seus efeitos tóxicos, que podem ser observados em organismos bentônicos, algas a peixes de grande porte, apresentando toxicidade diferente em relação aos diferentes organismos, e concentração de exposição. Sendo assim, e aliando a ampla distribuição de Cd nos ambientes aquáticos faz-se necessário o estudo da possível atuação como IE de tal elemento para assegurar a proteção da vida aquática.

Além do Cd, considerado um metal não-essencial, sabe-se da existência de metais com importância para o funcionamento dos sistemas e apresentam função biológica definida, em contra partida também sabe-se que em determinadas concentrações podem ser tóxicos (SILVA, 2002).

Esse metal é o vigésimo quarto elemento mais abundante na crosta terrestre e pode ser encontrado no ar, através de emissões vulcânicas e incêndios florestais, na água e no solo através de processos erosivos, uma vez que é um metal encontrado em diversas rochas, minerais e sedimentos carbonáticos e possui distribuição contínua e facilitada devido a diversidade de processos ambientais que o mesmo sofre, porém, em escala global,

as atividades antropogênicas são as maiores responsáveis pelo aumento de sua concentração no ambiente (ATSDR, 2005; ICZ, 2014; IZA, 2014).

Além disso, Zn pode combinar-se com outros elementos formando compostos de Zn, apresentando assim muitos usos na indústria automobilística, de construção civil e de eletrodomésticos (CETESB, 2012b). Essas indústrias geram enorme quantidade de resíduos por parte da população, representados pelo descarte inadequado de restos de equipamentos acima citados. O zinco também é utilizado no processo de galvanização do aço e/ou do ferro e em cosméticos, como protetores solares (BIANCHINI; MARTINS; JORGE, 2009).

Destaca-se que no Brasil existem legislações que dispõem sobre o descarte de efluentes (BRASIL, 2011), como de resíduos sólidos (BRASIL, 2010), obrigando as indústrias a fornecerem um destino final adequado aos seus rejeitos na tentativa de não contaminação do ambiente, seja ele terrestre ou aquático.

Nos organismos aquáticos, em especial peixes, existem dois mecanismos distintos pelo qual o Zn causa efeitos tóxicos. Em concentrações subletais (variável de acordo com a espécie) pode causar hipocalcemia diminuindo funções renais e causando efeitos ósseos, a perda de Na^+ e Cl^- que também pode interferir nas funções renais, bem como a inibição da anidrase carbônica nas brânquias causando prejuízos ao transporte de CO_2 e nas células sanguíneas alteram o controle do pH. Já em níveis letais, o mecanismo de toxicidade está associado à hipóxia causada por dano nas brânquias uma vez que elevados níveis de Zn causam a separação do epitélio branquial das lamelas levando a diminuição da pressão parcial de oxigênio do sangue aórtico, podendo resultar em morte (BIANCHINI; MARTINS; JORGE, 2009).

Além dos efeitos citados, como é possível observar na Tabela 2, o Zn, assim como Cd, é responsável por diversos outros efeitos em diferentes organismos, mantendo-se o padrão de diferentes efeitos, nos diferentes organismos. Levando-se em consideração a possibilidade de atuar como IE deve-se destacar que Zn diminuiu a atividade metabólica da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (BRITO, 2011) e diminuição de ovos de copépodo calanoíde *Acartia tonsa* (IHARA; PINHO; FILLMAN, 2010), fatores que interferem diretamente na manutenção das espécies do ambiente.

Tabela 2 - Efeitos tóxicos detectados em diferentes organismos aquáticos quando expostos à concentrações de zinco em diferentes tempos de exposição.

Organismo	Concentração(ões) estudada	Tempo de exposição	Efeito(s) observado(s)	Autor(es)
<i>Lithobates catesbeianus</i> (rã)	27,8; 278 e 2780 µg/L	13 dias	Alterações em parâmetros hematológicos	Marcantonio et al. (2011)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (microalga)	392 µg/L	72h	Redução do crescimento e diminuição da atividade metabólica	Brito (2011)
<i>Mysidopsis juniae</i> (misidáceo)	19; 38; 75; 150 e 300 µg/L	7 dias	Diminuição no número de fêmeas com ovos	Figueiredo et al. (2013)
<i>Acartia tonsa</i> (copépodo calanoíde)	500; 750; 1000; 1500; 2000 e 2500 µg/L	48 horas	Diminuição na produção de ovos	Ihara; Pinho; Fillman, (2010)
<i>Tanytarsus dissimilis</i> (quironomídeo)	38,8 µg/L	10 dias	Redução no crescimento e na sobrevivência	Anderson et al. (1980)
<i>Achatina fulica</i> (caracol)	500 e 1000 µg/L	48 horas	Alterações bioquímicas na glândula digestiva e no rim	Chandran et al. 2005
<i>Labeo rohita</i> (peixe)	2000 µg/L	10 e 28 dias	Alterações morfológicas e histológicas no fígado	Bhatikar (2011)
<i>Oreochromis niloticus</i> (peixe)	2000, 4000 e 6000 µg/L	7 e 28 dias	Alterações histológicas no fígado	Abdel-Warith et al. (2011)
<i>Carassius gibelio</i> (peixe)	100, 500, 1000, 1500 e 2000 µg/L	96 horas	Alterações histológicas nas brânquias	Velcheva; Arnaudo; Georgieva (2010)
<i>Labeo rohita</i> (peixe)	5000 e 10000 µg/L	5 e 15 dias	Alteração histológica no cérebro	Logonathan et al. (2006)

Fonte: o autor.

Assim, de modo geral os metais são fontes importantes de danos causados aos ambientes aquáticos, e segundo Castro (2006) demanda ações do poder público e da sociedade, no sentido de reduzir os teores desses contaminantes tóxicos lançados, visando à recuperação do ecossistema, porém para isso é necessário adequar os níveis permitidos pelas legislações nacionais e internacionais, assim como maior empenho por parte do Estado (JULA, 1971).

Dessa forma, a legislação nacional - CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) e internacional (USEPA, 1995 e 2001), estabelecem limites máximos permissíveis de diferentes compostos para fins de proteção da vida aquática, considerando-se efeitos

tóxicos agudos (com base na CL50 - concentração letal a 50% da população exposta) e crônicos (com base nos valores de CENO – concentração de efeito não observado e CEO – menor concentração de efeito observado), valores esses distintos entre a legislação brasileira e norte americana conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Valores dos contaminantes permitidos de acordo com a legislação.

Legislação Metal	Água		
	CONAMA (357/05)	USEPA	
		agudo	Crônico
Cádmio	1µg/L	2,0 µg/L	0,25 µg/L
Zinco	180 µg/L	120 µg/L	120 µg/L

Fonte: BRASIL (2005) e USEPA (1995 e 2001).

Por outro lado, não há na legislação uma concentração permitida de metais potencialmente tóxicos levando-se em consideração a integridade endócrina dos organismos aquáticos, situação essa que pode comprometer a perpetuação das espécies e causar desequilíbrios ambientais. Neste contexto algumas pesquisas científicas abordam a possibilidade desses elementos atuarem como possíveis IE (CHICHIZOLA, 2003; ANDRADE-RIBEIRO et al., 2006; BILA; DEZOTTI, 2007; TOGNON, 200-?; IAVICOLI; FONTANA; BERGAMASCHI, 2009; GEORGESCU et al., 2011; ALBÈ, 2013).

Dentre esses autores Iavicoli; Fontana; Bergamaschi (2009) reúnem em seu artigo diversas informações sobre os efeitos de metais potencialmente tóxicos em seres humanos e mostram a importância de tais estudos para a população, bem como exploram a falta de trabalhos com o enfoque de comprovar a possível atuação como IE dos metais e a falta de estudos em diferentes níveis tróficos pensando no ambiente como um todo. Nesse sentido, trabalhos que abordem os metais potencialmente tóxicos com esses possíveis danos são necessários de serem realizados, na tentativa de propor valores e/ou frações do contaminante para segurança da vida aquática e integridade endócrina dos sistemas biológicos mantendo a reprodução e perpetuação das espécies no ambiente, uma vez que determinar a toxicidade crônica baseado apenas na sobrevivência da espécie não é suficiente para caracterização da toxicidade de algumas substâncias (ARENZON et al., 2013).

Diante do exposto é possível inferir que os metais em questão possuem efeito tóxico à biota aquática mesmo em baixas concentrações, como foi possível observar nas Tabelas 1 e 2. Nas mesmas tabelas também é possível verificar que não existem trabalhos que enfoquem a possível atuação de metais como IE, porém dados desse nível poderiam ser extraídos das pesquisas, uma vez que foram investigadas alterações histológicas nas gônadas (MOREIRA, 2010), diminuição do número de ovos (FIGUEIREDO et al., 2013) e diminuição na produção de ovos (IHARA; PINHO; FILLMAN, 2010), faltando trabalhar os dados na perspectiva de possível atuação como IE embora alguns dados já demonstrem essa característica.

Deste modo, deve-se incentivar trabalhos com essa visão, merecendo atenção dos pesquisadores, principalmente com o avanço da tecnologia e a inovação de diversas técnicas, podendo assim investigar diversos efeitos até mesmo em nível molecular, bem como dos governantes em relação aos valores permitidos no ambiente aquático com a finalidade de proteção da biota aquática. Isso porque o sistema endócrino garante a reprodução e perpetuação das espécies, bem como o bom funcionamento da cadeia alimentar, não causando, dessa forma, desastres ecológicos, ou seja, não perdendo nenhum elo na cadeia alimentar, garantindo que todos os níveis tróficos tenham alimento suficiente para a sobrevivência em equilíbrio das espécies animais e vegetais.

CAPÍTULO 2: Aplicação ecotoxicológica do fator de bioconcentração dos metais cádmio e zinco sobre *Danio rerio*: é possível gerar um protocolo afim de se detectar um valor real em testes laboratoriais?

Resumo

Objetivo deste trabalho foi determinar o Fator de Bioconcentração (FBC) de *Danio rerio* após exposição crônica aos metais Cd e Zn e determinar o tempo de dessorção dos mesmos da parte externa do organismo. Organismos adultos de *D. rerio* foram expostos a concentrações permitidas em legislação de Cd (0,25 e 1 µg/L) e Zn (120 e 180 µg/L) por 21 dias em regime semi-estático, ao final da exposição os mesmos foram digeridos e a leitura da concentração dos contaminantes foi realizada e o FBC foi calculado. A dessorção dos metais da parte externa do organismo foi realizada após exposição por 72 horas a Cd e Zn seguindo-se a lavagem de cada organismo-teste em ácido nítrico 2% por diferentes tempos (0h; 5; 60; 90; 120; 150 e 180 minutos). A bioconcentração de Cd foi semelhante nas duas concentrações de exposição e a de Zn foi inversamente proporcional à concentração exposta. Em relação a dessorção dos metais os mesmos apresentaram diferenças, sendo a dessorção de Cd realizada em 90 minutos e a de zinco em 60 minutos, comportamento que pode estar associado a característica de não-essencialidade e essencialidade dos respectivos metais. Dessa forma, FBC é uma ferramenta importante em toxicologia ambiental por indicar as concentrações incorporadas pelos organismos e o teste de dessorção destaca-se como a proposta de uma nova ferramenta no auxílio a realização do mesmo, para que assim, em testes laboratoriais, seja possível inferir a real concentração do contaminante capaz de causar efeito nocivo ao organismo, auxiliando na estimativa de concentração segura de exposição visando a proteção da vida aquática.

Palavras-chave: Metais potencialmente tóxicos. CONAMA 357/05. USEPA. Fator de bioconcentração. Dessorção.

2. 1 INTRODUÇÃO

Uma das principais preocupações ambientais na atualidade refere-se à presença de poluentes nos ambientes aquáticos e o seu reflexo na perda dos usos desejáveis para o referido recurso (PONS-BRANCHU et al., 2015). Nesse contexto, elementos metálicos potencialmente tóxicos e metalóides, por serem estáveis e com propriedades de se bioacumularem na biota, têm sido amplamente estudados em termos químicos e toxicológicos.

Considerando-se a presença dos metais nos ambientes aquáticos, destaca-se o cádmio (Cd), por ser um elemento extensivamente utilizado em atividades antrópicas de amplo alcance ambiental, tais como 1) atividades de mineração de metais não ferrosos e refino; 2) na produção e aplicação de fertilizantes fosfatados; 3) na queima de

combustíveis fósseis e incineração de resíduos; 4) na produção de pigmentos e 5) na produção de plásticos (ATSDR, 2012). Tal elemento não é considerado essencial para as atividades fisiológicas, e tem sido classificado como tóxico para diferentes grupos de organismos, em diferentes níveis tróficos (GAUTAM, et al., 2014), em baixas concentrações (na ordem de $\mu\text{g/L}$), destacando-se na literatura os efeitos toxicológicos sobre espécies de peixes, reportados a décadas (EIFAC, 1977).

Segundo literatura (SKIDMORE, 1964; IAVICOLI; FONTANA; BERGAMASCHI, 2009), outro metal que destaca-se e recomenda-se em termos de estudos ambientais é o zinco (Zn). É sabido que esse elemento está presente naturalmente nos ambientes, porém, sua entrada nos corpos de água tem sido acelerada em função de atividades antropogênicas variadas, destacando-se dentre elas: 1) atividades de mineração; 2) purificação de minérios; 3) queima de carvão e 4) queima de resíduos (WHO, 2001; ATSDR, 2005).

Esse elemento, apesar de ser essencial aos sistemas biológicos como, por exemplo, sua atuação como cofator de mais de 300 enzimas de 50 tipos diferentes (VALLE; FALCHUK, 1993) e cerca de 20 metaloenzimas como anidrase carbônica e fosfatase alcalina (WATANABE; KIRON; SATOH, 1997); além de auxiliar na prevenção ao estresse oxidativo, como na prevenção da peroxidação de lipídios (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; MORALES; SANZ, 2005, etc), pode causar efeitos tóxicos em função da relação entre a concentração, o tempo de exposição e sensibilidade da espécie exposta. Na literatura, tais efeitos são destacados para peixes, e algumas alterações biológicas relatadas são diminuição na eclosão de ovos e atividade larval (CHEN et al., 2014), redução no consumo de oxigênio pelas brânquias (DOBREVA; TSEKOV; VELCHEVA, 2008), alterações histológicas no fígado (NUNES et al., 2015) e alterações hematológicas (WITESKA; KOSCIUK, 2003).

Considerando-se que os endpoints biológicos são respostas variáveis em função da concentração incorporada pelos sistemas biológicos, o estudo da bioconcentração é uma ferramenta ecotoxicológica que pode fornecer informações precisas sobre a concentração capaz de afetar os organismos. Segundo Davies e Dobbs (1984), fator de bioconcentração (FBC) é o termo usado para quantificar a tendência de um composto se concentrar em um organismo aquático. Por meio da comparação do FBC, inter e intra espécies é possível averiguar alguns parâmetros toxicológicos, dentre eles a vulnerabilidade de diferentes

espécies a um mesmo contaminante ou de uma mesma espécie a diferentes contaminantes, assim, torna-se viável predizer valores de contaminantes no ambiente aquático que realmente protejam a vida aquática.

Devido a importância deste tipo de análise para a proteção da vida aquática diferentes agências governamentais, entre elas a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (USEPA), Escritório de Segurança Química e de Prevenção da Poluição (OCSPP) e Ministério japonês da Agricultura, Florestas e Pescas (JMAFF) (CRETON et al., 2013) trazem guias normatizados para a realização desse teste com diferentes espécies de peixe, entre elas *Danio rerio*, *Pimephales promelas*, *Cyprinus carpio*, *Oryzias latipes*, *Poecilia reticulata*, *Lepomis macrochiru*, *Oncorhynchus mykiss* e *Gasterosteus aculeatus* (USEPA, 1996; OECD, 2012b), porém normas como a proposta da USEPA (1996) não contempla a forma que o organismo deve ser utilizado, seja ele a nível de órgãos ou inteiro e não faz um alerta sobre o poluente adsorvido na parte externa do mesmo.

Desse modo, as diversas pesquisas determinam o FBC com partes do organismo, em especial o músculo, porém os peixes mais utilizados para testes toxicológicos laboratoriais com fins de predição da qualidade ambiental são peixes de pequeno porte, destacando-se na atualidade a espécie *D. rerio*. Em função da condição biológica anteriormente citada, a prática de separação total dos órgãos para o estudo do FBC torna-se de difícil manuseio e com elevados riscos de perdas de tecidos. Dessa maneira a alternativa viável para esse tipo de estudo, visando minimizar os erros, seria o uso do organismo na íntegra para análise da incorporação de poluentes, alternativa corroborada por Davies e Dobbs (1984).

O FBC tem uma representatividade ecológica importante, uma vez que o contaminante incorporado ao organismo pode não causar prejuízos ao mesmo, mas em termos ambientais pode levar a morte o seu predador e/ou pode ser transferido a estágios de desenvolvimento mais susceptíveis, como ovos de peixe, causando prejuízos a prole. Um fator importante que deve ser considerado ao se utilizar o organismo-teste como um todo para a análise de bioconcentração em escala laboratorial, é não quantificar o poluente adsorvido na parte externa do organismo. O cálculo para a interpretação da toxicidade individual deve ser feito com valores reais da concentração do contaminante de fato incorporado no organismo.

Por fim, destaca-se que em escala laboratorial o contaminante adsorvido a parte externa do organismo não deve ser levado em consideração pois os estudos são feitos com base nas respostas biológicas e endpoints individuais, diferente de estudos *in situ*, uma vez que peixes são elo da cadeia trófica servindo como alimento para espécies maiores que ingerem o organismo inteiro biomagnificando o contaminante. Neste caso a bioconcentração, além de feita com o organismo inteiro também deve levar em consideração o adsorvido a parte externa.

Diante do exposto, a presente pesquisa teve por objetivo responder as seguintes questões: 1) É possível utilizar métodos de dessorção com banho ácido para eliminar metais da parte externa dos organismos-teste a fim de gerar o FBC efetivo? 2) Tal método pode ser utilizado como padrão para remover metais essenciais e não-essenciais?; 3) Considerando-se exposição do organismo-teste *Danio rerio* à baixas concentrações de metais ($\mu\text{g/L}$) o FBC é um indicativo relevante em termos de toxicidade ambiental e 4) A geração de valores permitidos por legislação, para a proteção da vida aquática devem ser revistos diante desse indicador?

2.2 DESENHO EXPERIMENTAL

2.2.1 Bioconcentração de cádmio e zinco em adultos de Danio rerio

Organismos adultos de *D. rerio*, obtidos de forma comercial no Pet Shop Águia de outro na cidade de Sorocaba/SP foram submetidos a teste de toxicidade crônica com os metais Cd e Zn, separados, por 21 dias, em regime semi-estático (troca da solução a cada 72 horas), seguindo-se as recomendações de OECD (2010), adaptada para o tempo de exposição. Utilizaram-se duas concentrações nominais de Cd ($1\mu\text{g/L}$ e $0,25\mu\text{g/L}$) e duas concentrações de Zn ($180\mu\text{g/L}$ e $120\mu\text{g/L}$), preparadas a partir de sulfato de Cd ($\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$, Dinâmica®, pureza 99% - 102%) e sulfato de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Dinâmica®, pureza 99% - 103%), respectivamente. As maiores concentrações de cada metal foram baseadas na legislação brasileira CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) e as menores concentrações, na legislação norte-americana (USEPA, 1995 para o zinco e USEPA, 2001 para o cádmio), todas estabelecidas visando a proteção da vida aquática. O controle experimental foi montado com a água de cultivo, a partir de água de abastecimento (ABNT, 2015) previamente desclorada e tratada com filtro de carvão em pó ativado. Para cada condição experimental utilizou-se aquários de vidro (2L) recobertos

com sacos plásticos descartáveis e 5 réplicas contendo 3 organismos-teste em cada (n=15). O experimento foi mantido em ambiente climatizado, com temperatura e fotoperíodo controlado para 25°C±1°C e 12h:12h – claro:escuro, respectivamente. A alimentação foi composta de ração comercial (TetraMin®) “*add libitum*” uma vez ao dia.

Ao final do período de exposição, em média 12 organismos-teste foram selecionados aleatoriamente, sacrificados por introdução direta em álcool PA e encaminhados para estufa de secagem a 60°C, por 48 horas, de modo a assegurar um total de 1g de peixe seco, quantidade requerida para o processo de digestão ácida e posterior cálculo do FBC. As amostras biológicas desidratadas foram alocadas em tubos de ensaio seguindo-se a adição de 10 ml de ácido nítrico (Sigma-Aldrich®, pureza ≥99%) e 240 ml de água destilada. Esse preparado foi destinado para placa aquecedora (90°C a 130°C), até redução do volume para aproximadamente 2 ml. Em seguida adicionou-se 5 ml de ácido nítrico, seguindo-se a filtragem em balão volumétrico e correção do volume para 25ml, com água destilada (HSEU, 2004). As leituras do Zn foram realizadas em Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Plasma Indutivamente acoplado (720 series) e as leituras do Cd foram realizadas em Espectrofotômetro de Absorção Atômica – Forno de Grafite (Varian – 240Z). O fator de bioconcentração (FBC) foi calculado de acordo com Buratini e Brandelli (2006) seguindo a Equação 1:

$$FBC = \frac{\text{concentração do contaminante nos organismos } (\mu\text{g/g})}{\text{concentração do contaminante na água } (\mu\text{g/ml})} \quad (1)$$

2.2.2 Teste de dessorção para cádmio e zinco da parte externa de Danio rerio- Proposta metodológica

Cinco aquários foram montados com três organismos-teste em cada, para três situações experimentais: 1) controle (apenas água de cultivo); 2) Solução-teste de Cd (1µg/L) e 3) solução-teste de Zn (180µg/L) (valores máximos permitidos pela legislação brasileira - BRASIL, 2005), com duração de 72 horas (tempo máximo entre as trocas de soluções-teste no experimento A, descrito acima). Em seguida os peixes foram submetidos a um banho ácido em recipientes plásticos contendo 30 ml de ácido nítrico 2%, onde permaneceram por diferentes tempos estabelecidos de forma prévia (Cd - 0h; 5; 60; 90; 150 e 180 minutos; Zn - 0h; 5; 60; 120; 150 e 180 minutos). Ao final de cada tempo os peixes foram removidos do recipiente e o ácido foi preservado em refrigerador (5°C) até a leitura das concentrações de metais (conforme descrito no item anterior). Com as

concentrações obtidas para cada tempo de exposição, construiu-se uma curva de dessorção objetivando-se avaliar o melhor tempo para remover cada metal da parte externa dos organismos sem digerir tecidos. Nessa proposta, o ponto de estabilização da concentração de metal dessorvido foi utilizado como indicativo para tomada de decisão acerca do tempo ideal de dessorção do metal do exterior do corpo do organismo.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a leitura dos metais no presente estudo e a realização dos cálculos do FBC, para *D. rerio*, utilizando-se o organismo inteiro, foi possível obter os seguintes resultados: para Cd a concentração detectada nos organismos foi de 0,1037 µg/g e 0,02505 µg/g para os expostos a concentração de 1µg/L e 0,25µg/L em ordem, e o FBC foi 103,7 e 104,5 respectivamente. Para Zn o detectado no organismo foi 78,54 µg/g para as concentrações de 180µg/L e 120µg/L respectivamente e o FBC de 436,3 e 618,5 em ordem.

Sendo assim, tanto para Cd quanto para Zn as concentrações encontradas no presente estudo, ao analisar *D. rerio* inteiro são maiores que os encontrados nos diversos estudos apresentados na Tabela 1, principalmente pelo fato de ter sido realizado com o organismo inteiro. Este fato então merece destaque e deve-se ressaltar a necessidade desse tipo de análise para entender a acumulação total do composto químico no organismo.

Dessa forma, o FBC de Cd (103,7 – CONAMA; 104,5 - USEPA) em ambos os casos de exposição dessa pesquisa foi maior que o encontrado por Voigt et al. (2015), chegando a ser 100 vezes maior quando comparado ao valor encontrado no músculo de *Geophagus brasiliensis* que foi 1,0 para Cd. Em relação aos valores encontrados em *D. rerio*, o cádmio possui FBC semelhante (103,7 – CONAMA; 104,5 - USEPA), resultado que pode ser atribuído pelo que se chama de “faixa tolerável” de metais não essenciais, ou seja, uma faixa de concentração que o organismo consegue acumular e apesar de não ser um elemento essencial ele sobrevive.

Porém pode ser uma concentração capaz de ativar mecanismos de defesa como os complexos de metalotioneína (ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001), uma vez que os organismos são capazes de controlar as concentrações de metal em certos tecidos corporais para minimizar o dano das formas reativas dos mesmos, bem como controlar a utilização de metais essenciais (VIJVER et al., 2004).

O FBC de Zn para o músculo de *G. brasilienses* é 3040,1 (VOIGT et al., 2015), valor maior que o encontrado no presente estudo em *D. rerio* (436,3 – CONAMA; 618,5 - USEPA), essa diferença pode acontecer por características das espécies, já que são peixes de grupos distintos, bem como o tempo de exposição dos organismos que no ambiente natural não pode ser avaliado. Além disso, com este resultado pode-se inferir que em altas concentrações Zn pode ser bloqueado pelas brânquias de entrar no organismo, pois estas tem função de impedir a entrada de excesso de metais ou após entrar no organismo ele é metabolizado mais rápido e conseqüentemente seu excesso é excretado mais rápido na tentativa de manter a homeostase do organismo (HEATH, 1995), uma vez que na menor concentração de exposição encontrou-se o maior FBC, apresentando assim uma relação inversa sobre a concentração no ambiente aquático e o FBC.

A falta de informações sobre a concentração de exposição ao contaminante e FBC, como mostra a Tabela 1 fragiliza as pesquisas científicas, por impossibilitar a comparação dos valores de incorporação de contaminantes em organismos aquáticos e os respectivos prejuízos causados. A mesma tabela também mostra a ampla utilização de espécies de peixes de porte grande, com as concentrações de contaminantes detectadas por órgãos e não no organismo como um todo. Porém, diversas normas internacionais (OECD, 1992; OECD, 2000; ABNT, 2015) preconizam a utilização também de espécies de porte pequeno como bioindicadoras da qualidade ambiental, em especial *D. rerio*. Dessa maneira a separação em órgãos é passível de erro por danos nos tecidos e o FBC deve ser calculado com base no contaminante acumulado pelo organismo todo.

Tabela 1 - Estudos da concentração de metais em organismos aquáticos, seus valores e Fator de Bioconcentração (FBC).

Espécie	Parte do organís.	Concentração do metal em cada parte do organís. ¹		Concentração do metal no ambiente aquático ²		Fator de bioconcentração		Autor(es)
		Cd	Zn	Cd	Zn	Cd	Zn	
<i>Danio rerio</i>	Inteiro	0,1037	78,54	0,001	0,18	103,7	436,3	Este estudo
		0,02505	74,22	0.00025	0,12	104,5	618,5	
<i>G. brasiliensis</i>	Músculo	0,002 ^a	23,11 ^a	0,0026	-	1,0	3040,1	Voigt et al. (2015)
	Brânquias	0,05 ^a	80,25 ^a			19,0	10.506	
	Fígado	0,17 ^a	47,66 ^a			64,4	6070,1	
<i>Silurus glanis</i>	Músculo	0,0004	19,62	NI	NI	NA	NA	Jovičić et al. (2015)
	Brânquias	0,036	80,42					
	Fígado	0,177	93,14					
	Rim	0,893	120,4					
	Cérebro	0,001	33,73					
	Gônada	0,008	134,3					
	Vertebra	0,005	67,34					
Baço	0,042	74,83						

	Coração	0,006	106,6					
	Moela	0,011	84,3					
<i>Sardinella gibbosa</i>	Músculo	0,65	6,59	NI	NI	NA	NA	Ahmed et al. (2015)
<i>Merluccius merluccius</i>	Músculo	ND	3,69					
	Brânquias	ND	29,4					
<i>Lophius budegassa</i>	Músculo	ND	5,88	NI	NI	NA	NA	Olgunoğlu; Artar; Olgunoğlu (2015)
	Brânquias	ND	14,47					
<i>Helicolenus dactylopterus</i>	Músculo	ND	4,5					
	Brânquias	ND	32,96					
<i>Chlorophthalmus agassizi</i>	Músculo	ND	5,37					
	Brânquias	ND	33,84					
<i>Carassius carassius</i>	Músculo	<0,002	6,757 ^a	0,197 ^a	0,005 ^a	NA	NA	PuYang; Gao, Han (2015)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>		<0,002	5,75 ^a					
<i>Plotosus canius</i>	Tecidos	0,15	43,03	NI	NI	NA	NA	Idriss; Ahmad (2015)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tecidos	0,22	47,70					
<i>Lobotes surinamensis</i>	Tecidos	0,10	23,73					
<i>Nemapteryx caelatus</i>	Tecidos	0,18	51,77					
<i>Penaeus indicus</i>	Músculo	0,163	31,95	NI	NI	NA	NA	Giri; Singh (2015)
<i>Mystus gulio</i>		0,054	55,46					
<i>Labeo rohita</i>		0,08	64,39					
<i>Clarias gariepinus</i>	Brânquias, intestino e tecidos	1,5a	118,16a	0,015a	0,34a	NA	NA	Omozokpi et al. (2015)
<i>Micromesistius poutassou</i>	Músculo	0,04a	13,60a	NI	NI	-	-	Ronggui et al. (2015)
<i>Pelecus cultratus</i>	Músculo	ND	55,86	102	14.350			Subotić et al. (2015)
	Fígado	0,05	63,32					
	Brânquias	ND	81,25					
	Gônadas	ND	45,05					
<i>Gymnocephalus cernua</i>	Músculo	ND	33,80					
	Fígado	0,72	76,6					
	Brânquias	ND	67,31					
	Gônadas	ND	130,38					
<i>Perca fluviatilis</i>	Músculo	ND	18,89					
	Fígado	ND	77,66					
	Brânquias	ND	64,82					
	Gônadas	ND	68,06					
<i>Liza klunzingeri</i>	Tecidos	1,35 ^a	25,4 ^a	NI	NI	NA	NA	Bastami et al. (2015)
<i>Carassius auratus</i>	Músculo	<0,05	50,5 ^a	NI	NI	NA	NA	Zhang et al. (2015)
<i>Cyprinus caspio</i>		<0,05	35,1 ^a					
<i>Channa argus</i>		<0,05	27,5					

Fonte: o autor.

¹ Valores expressos em µg.g por peso seco

² Valores expressos em mg/L

^a Valores médios em relação aos apresentados no artigo

NI – não informado

NA – não analisado

Outra crítica em relação a determinação da concentração de metal em peixes com partes do organismo é que o valor encontrado é algo do momento em que o mesmo foi sacrificado, pois fisiologicamente sabe-se que por metabolização do metal, o mesmo pode sofrer uma dinâmica e ser transportado para outro compartimento biológico ou ser excretado (OGA; FARSKY; MARCOURAKIS, 2008).

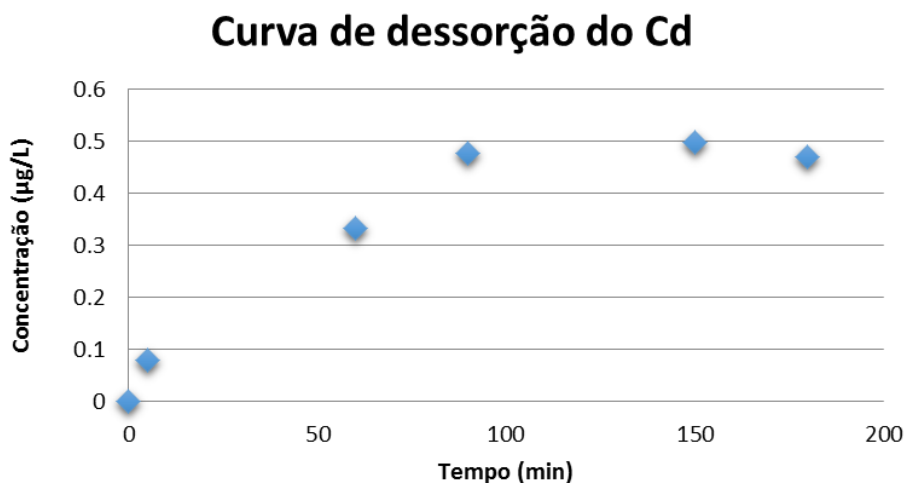
Além disso, análises posteriores, como histologia, histoquímica e bioquímica são importantes, pois assim teremos um respaldo da real concentração capaz de causar efeito prejudicial ou não ao organismo e elencar os possíveis danos, já que existem substâncias, como os interferentes endócrinos, que não causam a morte do organismo, mas podem interferir na reprodução e/ou na prole, podendo levar uma determinada espécie a ser extinta do local, destacando a possibilidade de metais atuarem dessa maneira (KORTENKAMP, 2011).

Apesar de ser importante complementar os estudos que demonstrem a relação do FBC com o efeito, uma problemática metodológica que deve ser considerada, é a impregnação de metais na parte externa dos organismos. Nesse sentido, quando digere-se organismos inteiros, parte dos metais não incorporados acaba sendo contabilizada e associada aos efeitos, causando uma interpretação errônea. Desta maneira, o teste de dessorção é uma proposta metodológica nova e necessária para investigar a real concentração de incorporação dos poluentes nos organismos aquáticos usados em testes toxicológicos usando organismos inteiros, tentando assim suprir essa problemática.

No Gráfico 1 observa-se a curva de dessorção para o metal Cd, onde evidencia-se um crescimento exponencial na concentração do referido metal até o tempo de 90 minutos. Nos tempos subsequentes, observa-se uma estabilidade nos valores detectados, até 180 minutos onde apresenta uma queda. Esses resultados indicam que para a realização de toda a dessorção de Cd da parte externa do organismo, de modo a não interferir no cálculo do FBC, um banho de ácido nítrico (2%) de 90 minutos deve ser utilizado. Outro ponto a ser destacado no Gráfico 1 é o início da queda da concentração removida da parte externa do organismo aos 180 minutos, indicando a tendência a remoção total do Cd uma vez que é um metal não-essencial e os primeiros órgãos a serem digeridos são as escamas (quando for o caso) e a pele, órgãos esses que não contém Cd, portanto a queda nos níveis do mesmo, já que o Cd fica preso no organismo, principalmente na corrente sanguínea e nos

rins no complexo Cd-metalotioneína que funciona como proteção à toxicidade do elemento (RAMÍREZ, 2002).

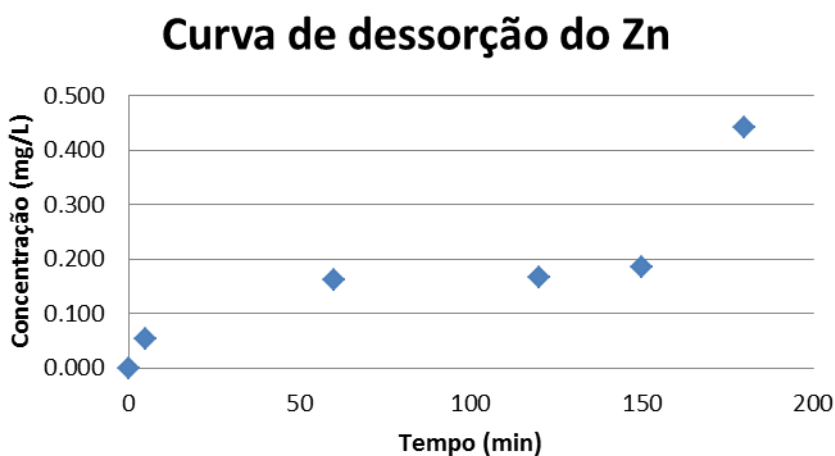
Gráfico 1 - Curva de dessorção de Cd da parte externa de adultos de *D. rerio*, após banho ácido (ácido nítrico 2%) em diferentes tempos.



Fonte: o autor.

Por outro lado, Zn é um metal essencial, por isso apresenta comportamento diferente do Cd. Dessa forma no Gráfico 2 e através do comportamento da curva, podemos dizer que 60 minutos é o tempo ideal de banho ácido para remoção do Zn da parte externa do organismo-teste em questão, uma vez que nesse tempo e nos tempos subsequentes (120 e 150 minutos) o padrão de remoção, em termos de concentração, é semelhante, apresentando ligeiro aumento em 150 minutos e crescimento exponencial em 180 minutos que pode ser entendido como o início da digestão do organismo já que Zn é um metal essencial e está presente nas escamas (quando for o caso), na pele e no músculo, apêndice epidérmico e órgãos que possuem Zn em sua composição natural. Após 150 min provavelmente o ácido nítrico (2%) faz contato inicial com os referidos órgãos liberando Zn desses tecidos e não mais o adsorvido. Portanto, pensando em redução de custos e tempo, 60 minutos é adequado para dessorção de Zn de *D. rerio* e posterior utilização em análises de bioconcentração para averiguar efeitos biológicos em testes laboratoriais.

Gráfico 2 - Curva de desorção de Zn da parte externa de adultos de *D. rerio*, após banho ácido (ácido nítrico 2%) em diferentes tempos.



Fonte: o autor.

A análise feita apresenta praticidade para realização, utilização de poucos materiais, tempo curto de execução e respostas iniciais adequadas. Dessa forma o teste de desorção mostrou-se como uma ferramenta a ser empregada anteriormente a digestão dos organismos-teste para fins de cálculo do FBC na tentativa de definir valores reais que possam causar danos a biota aquática levando-se em consideração o organismo de forma individual, podendo assim ser gerado um protocolo (Apêndice A) para análise de FBC em laboratório que analise a real concentração incorporada no organismo e outros testes para detecção de efeitos nocivos possam ser utilizados e suas respostas obtidas com maior grau de confiabilidade a partir dessa real concentração.

Por fim, as análises aqui apresentadas, FBC e desorção, causam implicações laboratoriais e ambientais, principalmente no que tange o meio acadêmico e governamental, isso porque, *Danio rerio* é um organismo modelo, utilizado nas mais diversas pesquisas, por diversas agências de proteção ambiental internacionais no auxílio a tomada de decisões ambientais, como a proposição de valores para a proteção da vida aquática.

2.4 CONCLUSÕES

Comparando-se os metais estudados o Zn bioconcentrou-se de maneira mais intensa do que o Cd. Para as duas concentrações de Cd testadas, o FBC apresentou-se com valores semelhantes, enquanto o Zn apresentou-se com valores inversamente proporcionais às

concentrações de exposição. Dessa forma conclui-se que esta análise é um indicativo relevante de toxicidade ambiental e deve ser empregado nas pesquisas científicas com mais frequência;

O método de dessorção testado para os metais Cd e Zn apresentou-se como uma possível ferramenta para avaliar a real concentração do contaminante em *D. rerio* em testes laboratoriais indicando tempos de lavagens diferentes para cada metal.

Evidenciou-se que metais essenciais e não-essenciais apresentam diferenças tanto na incorporação biológica (concentração total e FBC) como na sua remoção da parte externa dos organismos, fator que influencia diretamente na possível toxicidade do elemento e conseqüentemente nos possíveis danos causados ao organismo.

Recomenda-se a realização de pesquisas sobre métodos de dessorção incluindo diferentes ácidos, tempos de banho e contaminantes, como outros metais, e diferentes compostos orgânicos, por fim, sugere-se a revisão dos valores de metais permitidos em ambientes aquáticos pelas legislações estudadas na presente pesquisa.

CAPÍTULO 3: Histopatologia de fígado e gônada de *Danio rerio* exposto ao cádmio e zinco em concentrações permitidas pela legislação brasileira e norte americana

Resumo

A contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais é uma preocupação mundial, pois são elementos bioacumulativos e que não se degradam no ambiente, tornando-se um grave problema ambiental. Recentemente levantou-se ainda a suspeita para a atuação dos metais como interferentes endócrinos, ou seja, serem capazes de provocar danos no sistema endócrino. Dentre as ferramentas indicadas para a verificação dessa possibilidade encontra-se a realização de análises histológicas, por exemplo, em *Danio rerio*, organismo aquático utilizado como bioindicador. Dessa forma, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a possibilidade de cádmio e zinco atuarem como substâncias interferente endócrinas, após exposição crônica (21 dias) de *D. rerio* a concentrações permitidas em legislação nacional (1 µg de Cd/L e 180 µg de Zn/L) e internacional (0,25 µg de Cd/L e 120 µg de Zn/L), através de análises histológicas de gônada e fígado de machos e fêmeas. Após exposição e análise de resultados foi possível observar alterações histológicas de forma pronunciada tanto em gônadas quanto em fígados de fêmeas. Gônadas de machos apresentaram alterações pontuais e os fígados apresentaram lesões que podem comprometer o funcionamento do órgão. Conclui-se que Cd e Zn em concentrações permitidas por legislação são capazes de provocar efeitos endócrinos em machos e fêmeas de *D. rerio* após exposição crônica.

Palavras-chave: CONAMA 357/05; USEPA; Interferente endócrino; Metal potencialmente tóxico. Histologia.

3.1 INTRODUÇÃO

Apesar dos metais estarem naturalmente presentes nos ambientes aquáticos o aumento populacional e a economia crescente, por meio de ações antropogênicas, propicia sua entrada acelerada nesses sistemas (SPARKS, 2005; TCHOUNWOU et al., 2012), tornando-se, assim, problema social e ambiental (GAUTAM et al., 2014). Uma das preocupações com a presença de metais antropogênicos nos ambientes aquáticos refere-se à tendência de serem persistentes no ambiente (VAROL; SEN, 2012) e com a sua capacidade de bioacumularem na cadeia alimentar (GAO; CHEN, 2012), causando danos aos organismos aquáticos devido a sua toxicidade e conseqüentemente podendo levar ao desequilíbrio ambiental (BABY et al., 2010).

Os aspectos toxicológicos relacionados à exposição biológica aos metais pode ser atribuída à disfunção fisiológica que ocorre a partir da interação dos metais com estruturas

celulares inapropriadas (DEB, 1999). Essa atuação toxicológica depende de diversos fatores como a concentração do poluente metálico no meio ambiente, vias de exposição, outras espécies químicas presentes, bem como a idade, sexo, genética e o estado nutricional do indivíduo exposto (TCHOUNWOU et al., 2012).

Dessa forma, há décadas a problemática da contaminação ambiental por metais é discutida e sabe-se que tais elementos são tóxicos. Sendo assim, os estudos devem não apenas tratar sobre a toxicidade do mesmo, mas também devem buscar encontrar concentrações seguras que protejam o ambiente aquático e não afete nenhum dos seus múltiplos usos (KATZ, 1973).

Além dos diversos efeitos tóxicos causados por metais já comprovados, os mesmos passaram a receber atenção dos cientistas quanto a possibilidade de atuarem como interferentes endócrinos (IE) (DIAMANTI-KANDARAKIS, 2009), abrindo caminho para um novo ramo de pesquisa no que tange a problemática metais, poluição ambiental e efeitos endócrinos causados.

Assim, IE é toda substância química exógena (não natural) ou mistura de substâncias que interfere em qualquer aspecto na ação hormonal sobre o sistema biológico (GORE et al., 2014). A preocupação com esse tipo de substância remonta a década de 1990 (CONNOR; PETERSON, 2012), uma vez que as mesmas podem afetar os organismos e causar danos como: a) má formação no desenvolvimento, b) aumento no risco de câncer, c) interferência na reprodução e d) distúrbios nas funções dos sistemas imune e nervoso (USEPA, 2015), sendo seus efeitos relatados em uma variedade de peixes e populações de animais selvagens (MPCA, 2008).

Dentre os metais, o cádmio (Cd) merece destaque, pois encontra-se no ambiente aquático através de diferentes fontes. As naturais incluem a dissolução de rochas e minerais e as antropogênicas incluem: a) operações de mineração e fundição, b) operações industriais, c) queima de combustíveis fósseis, d) aplicação de fertilizantes e e) lixiviação de aterros sanitários (NSE, 2008). Além disso, Cd não é essencial para o crescimento e desenvolvimento dos organismos e possui uma diversidade de efeitos tóxicos destacando-se nefrotoxicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade (GOERING; WAALKS; KLAASSEN, 1995) além de comprovada toxicidade endócrina (DENIER et al., 2009; JIMÉNEZ-ORTEGA et al., 2012; PAPA et al., 2015).

Por outro lado, zinco (Zn) é um metal essencial, ou seja, apresenta função definida nos sistemas biológicos, por exemplo, importante atuação na reprodução de machos e fêmeas relacionados a ejaculação e desenvolvimento ovocitário (BEDWAL; BAHUGUNA, 1994), é indispensável a vida e está duas vezes mais presente em todos os tecidos quando comparado ao ferro (Fe) (GEORGESCU et al., 2014). O Zn encontra-se em todos os compartimentos ambientais e as atividades antropogênicas são as maiores responsáveis pelo aumento no seu nível de contaminação (ATSDR, 2005) que vem aumentando ao longo dos anos, assim como a preocupação com os efeitos tóxicos por ele causado.

Sendo assim, análises histológicas são recomendadas como um dos biomarcadores seguros para a detecção de efeitos causados por possíveis IE (OECD, 2010), isto porque respostas histológicas são relativamente fáceis de serem reconhecidas, desde que, dados de referência e controle estejam disponíveis (HINTON, 1994). As alterações detectadas a nível celular/morfológico nos indivíduos são mais preditivas em termos ambientais, e consequentemente mais protetivas a longo prazo.

Esse conhecimento, embora não utilizado para gerar limites de exposição segura à vida aquática, reflete a atuação imediata do poluente. Sempre que ocorre a toxicodinâmica, ou seja, o efeito biológico diante da exposição à agentes tóxicos, significa que houve uma interação do contaminante com a célula e consequentemente modificações fisiológicas e morfológicas diversas que a longo prazo podem implicar em perda de capacidade reprodutiva dentre outros efeitos, que culminam com a perda de espécies (FATIMA; USMANI; HOSSAIN, 2014).

Dessa forma, alterações histológicas com efeitos endócrinos vêm sendo relatadas na comunidade científica (TRAMUJAS et al., 2006; AMEL; MYRIAM, 2010; DUMITRESCU et al., 2010; ARAÚJO, 2012; MENDEZ, 2012; KELLOCK, 2013; ARMILATO, 2014) e a utilização de tal técnica recomendada por organizações governamentais (USEPA, 2008; OECD, 2010), ressaltando a importância de realizar esse tipo de análise na predição de efeitos nocivos das substâncias químicas para assegurar concentrações limites restritivas dessas substâncias e garantir a integridade endócrina nos organismos com fins à proteção da vida aquática.

Dentre os organismos utilizados para esse tipo de análise, as organizações governamentais, como a Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico – OECD recomenda a utilização de peixes pequenos, entre eles *Danio reio* (OECD, 2010), popularmente conhecido como paulistinha ou zebrafish, este que é um excelente modelo biológico para se estudar o efeito de possíveis interferentes endócrinos (SEGNER, 2009; TRUONG et al., 2013), porém, tem seu potencial ainda pouco explorado (SEGNER, 2009).

Após o exposto a presente pesquisa tem como objetivo responder as seguintes questões: a) a exposição crônica a Cd e Zn em valores permitidos por legislação são capazes de provocar efeito endócrino em *D. rerio*?; b) Cd e Zn provocam alterações histológicas no desenvolvimento gonadal de fêmeas e machos de *D. rerio*?; c) Cd e Zn são capazes de provocar alterações histológicas no fígado de fêmeas e machos de *D. rerio*? e d) O uso de gônada e fígado como biomarcador histológico é uma ferramenta útil para detecção de substâncias com potencial de atuação como interferente endócrino?

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Animais

Adultos de *D. rerio* obtidos de forma comercial do Pet Shop Águia de Ouro na cidade de Sorocaba/SP foram aclimatados e mantidos em condições laboratoriais controladas de acordo com norma (ABNT, 2015), utilizando-se água de abastecimento público previamente filtrada (filtro de carvão ativado e por tela do tipo silk screen com abertura de malha de 25 µm) e desclorada, alimentados uma vez ao dia com ração comercial tetramim® com 97% de proteína bruta, “*add libitum*” e mantidos em temperatura de 26°C ± 1°C e fotoperíodo controlado de 12h:12h claro:escuro.

3.2.2 Químicos

Foi utilizado no preparo das soluções de trabalho de Cd(II) e Zn(II) sulfato de Cd (CdSO₄.8/3H₂O, Dinâmica®, pureza 99% - 102%) e sulfato de Zn (ZnSO₄.7H₂O, Dinâmica®, pureza 99% - 103%) respectivamente e a concentração estudada foi somente a do respectivo metal em cada sal.

3.2.3 Exposição

Machos e fêmeas adultos (entre 3 e 4 meses) de *D. rerio* foram submetidos a um teste de exposição crônica (21 dias) seguindo-se recomendações de OECD (2010 – adaptado para o tempo de exposição) em regime semi-estático (troca total da solução a cada 72 horas) aos metais Cd e Zn de forma separada para duas concentrações nominais de Cd (1µg/L e 0,25µg/L) e duas concentrações de Zn (180µg/L e 120µg/L) permitidas pela legislação brasileira CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) e norte americana (USEPA, 1995 e 2001) respectivamente, além disso, um controle experimental foi montado com a água de cultivo, a partir de água de abastecimento (ABNT, 2015).

Para cada condição experimental utilizou-se aquários de vidro (2L) recobertos com sacos plásticos descartáveis. Os organismos foram mantidos separados por sexo e cinco réplicas contendo 3 organismos-teste em cada (n=15) foram montadas para machos e 4 réplicas contendo 3 organismos-teste (n=12) para as fêmeas, mantendo-se as mesmas condições de cultivo descritas acima.

De acordo com instruções recebidas da Comissão de Resíduos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba/UNESP a solução-teste de cada troca foi descartada descartada como resíduo comum, decisão essa tomada pois as concentrações estudadas se enquadram dentro da legislação brasileira e são menores que as encontradas nos rios do Estado de São Paulo não acarretando em maiores prejuízos ao ambiente em comparação aos que já acontecem.

3.2.4 Teste de Reprodução

Dos organismos expostos, 6 machos e 3 fêmeas, aleatoriamente escolhidos, foram introduzidos em aquários de acasalamento os quais possuíam água contaminada com os metais estudados e suas respectivas concentrações, em separado, mantendo-se as concentrações utilizadas na exposição crônica. Cada aquário teve a proporção de 2 machos para 1 fêmea, totalizando 3 recipientes de acasalamento, ou seja, 3 réplicas.

Para a montagem dos aquários foram utilizadas rede de nylon como proteção de fundo para que após a postura dos ovos os adultos não tivessem contato com os mesmos evitando assim a predação, bem como aquecedores aumentando a temperatura em até 2°C da temperatura que os mesmos foram mantidos durante todo o teste.

A união dos casais aconteceu no final da tarde e a separação no dia seguinte, logo pela manhã, após aproximadamente 30 minutos do início do período de luz (ABNT, 2015).

Na sequência os adultos eram sacrificados, conservados em formol 10% durante 18 horas, lavados e posteriormente transferidos para álcool 70%. Os ovos eram peneirados, lavados e transferidos para placas de petri onde permaneciam até o sexto dia pós-fertilização e então os parâmetros, 1) a quantidade de ovos postos por fêmeas, 2) taxa de eclosão e 3) sobrevivência das larvas eclodidas até o sexto dia foram analisados. Durante esses seis dias os ovos fungados eram descartados e as larvas separadas para uma segunda placa de petri.

3.2.5 Histologia

Após a exposição seis machos e seis fêmeas de cada condição experimental foram escolhidos aleatoriamente, sacrificados por introdução direta em álcool PA, sendo a cabeça e a nadadeira caudal foram cortadas e o restante fixado em formol 10% por 18 horas em temperatura ambiental, seguindo-se a lavagem em água corrente, desidratação e inclusão em parafina. Os cortes (4 μ m) foram obtidos com navalha de aço, em micrótomo (micron HM340E) e corados com hematoxilina-eosina (HE). A análise qualitativa dos tecidos foi em microscópio de luz e as alterações gonadais baseadas em OECD (2010) e as hepáticas em Takashima e Hibiya (1995).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com o teste de reprodução não sofreram análises estatísticas, pois, apesar de repetir o mesmo duas vezes não foi possível obter número de réplicas suficientes, dessa forma os resultados serão apresentados na forma de porcentagem com os dados obtidos. Apesar da primeira tentativa de realização do teste ter sido validada com a postura de ovos pelas fêmeas do controle nos tratamentos houve morte de fêmeas. Elas ficaram presas a rede de separação dos ovos ou pularam do aquário e ainda ultrapassaram a rede de separação e se alimentaram dos ovos e o segundo teste não foi validado uma vez que o controle não produziu ovos.

No teste foram analisados três parâmetros, o número de ovos por fêmea, a taxa de eclosão dos ovos viáveis e as larvas sobreviventes até o sexto dia.

Em relação a postura de ovos (número bruto) obtivemos os seguintes valores, 542 (controle), 504 (Cd-USEPA), 800 (Cd-CONAMA), 187 (Zn-USEPA) e 151 (Zn-CONAMA) e para o número bruto de larvas, 509 (controle), 362 (Cd-USEPA), 567 (Cd-CONAMA), 149 (Zn-USEPA) e 145 (Zn- CONAMA). Resultados esses que não foram analisados estatisticamente por não apresentarem número suficiente de réplicas.

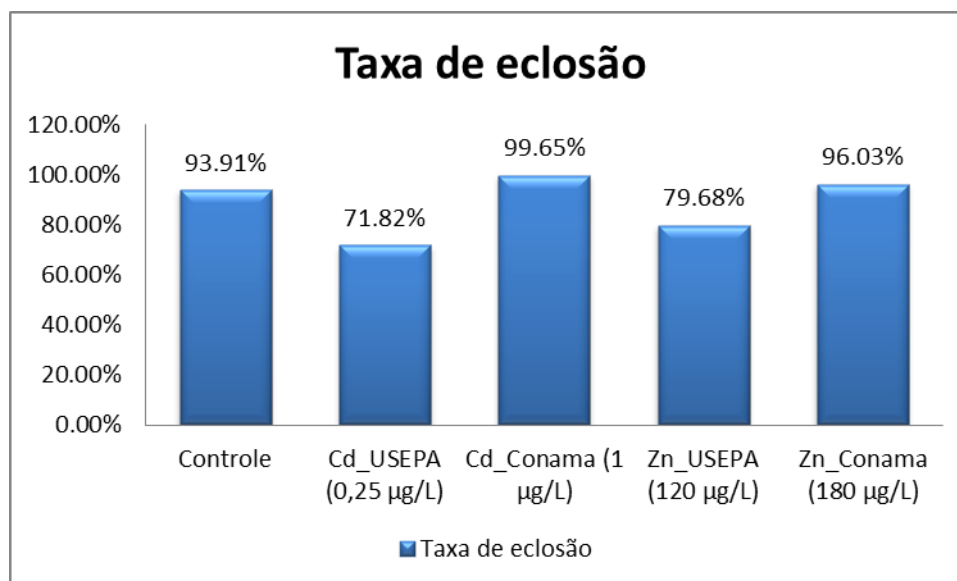
Fazendo-se uma análise crítica, existe a escassez de resultados que envolvam a reprodução (número de ovos e larvas) afetada por metais nas diferentes bases de pesquisas como Scopus, Google Acadêmico, Portal de Periódicos CAPES e ScienceDirect. Foi possível perceber nesse caso que parte dos trabalhos versam sobre o efeito do contaminante diretamente no ovo, como acúmulo, efeitos na casca e/ou desenvolvimento e tempo de eclosão, e em larvas, (má) formação e sobrevivência, esquecendo-se da postura dos ovos que também é um padrão reprodutivo importante.

Além disso, esses dados são comprovados quando analisamos os anais do maior evento brasileiro da área (XIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia) realizado no ano de 2014, o qual na sessão “Desreguladores endócrinos” apenas um trabalho (MERIDES; FRACÁCIO, 2014) trata a problemática dos metais como IE, sendo o mesmo realizado com *Ceriodaphnia dubia* e em fase de adaptações metodológicas.

Ainda sobre o evento, outra sessão que poderia abrigar trabalhos relacionados seria “Efeito de contaminantes inorgânicos” e apesar da mesma apresentar diversos trabalhos sobre o efeito de metais nos mais diferentes organismos, aquáticos ou terrestres, nenhum deles tem foco na reprodução e ou possível atuação como IE.

Como ressaltado anteriormente e fato possível de ser observado em tais anais, as atuais pesquisas sobre o tema estão focadas em compostos orgânicos, como fármacos, hormônios (sintéticos e naturais), pesticidas e outras substâncias orgânicas.

A taxa de eclosão porém, apresenta a hipótese de que seja um caso de hormese, que é um fenômeno adaptativo dose-resposta caracterizado por apresentar efeitos opostos observados em baixa concentração, quando comparado a altas concentrações para o mesmo parâmetro analisado (CALABRESE; BALDWIN, 2002; CALABRESE; BLAIN, 2011), ou seja, nesse caso as respostas opostas, como é possível observarmos no Gráfico 1, ficam por conta do aumento da taxa nas concentrações mais altas dos metais (contaminantes) estudados em relação as concentrações mais baixas.

Gráfico 1 - Comparação da taxa de eclosão entre controle e tratamentos.

Fonte: o autor.

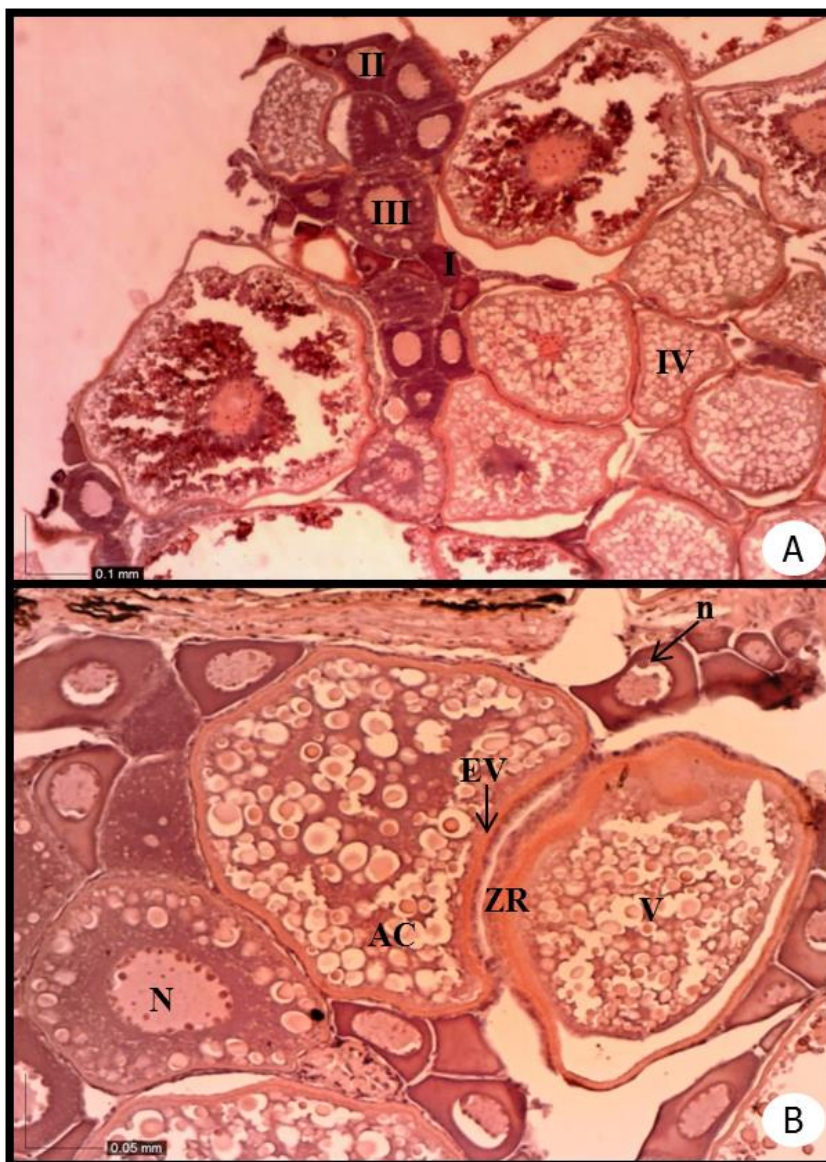
Como ressaltado por Iavicoli; Fontana; Bergamaschi (2009), casos como esse de hormese necessitam de maior elucidação e investigação já que são mais comuns do que podemos imaginar. Como reportam em seu estudo Calabrese e Blain (2004) destacam que casos de hormese são geralmente relatados entre o mais tóxico dos metais e até mesmo nos mais sensíveis órgão-alvo. Os mesmos autores fizeram um levantamento e relataram no banco de dados sobre hormese à presença de 24 e 9 endpoints envolvendo reprodução/desenvolvimento para Cd e Zn respectivamente.

Dessa forma esses resultados apesar de não serem conclusivos e possuírem um n amostral para aplicação de análises estatísticas ressaltam a necessidade de atenção para esses metais e para a realização de pesquisas com abordagem de observação de possíveis efeitos a prole. Isso porque como é possível observar no gráfico 1 a eclosão os ovos em que a geração parental foi exposta aos metais na concentração permitida pelo CONAMA estimularam a eclosão em comparação aqueles expostos as concentrações permitidas pela legislação norte americana. Destaca-se também que para CONAMA a eclosão foi maior até mesmo que o controle.

As análises histológicas das gônadas das fêmeas do controle (Figura 1) revelam um padrão normal de distribuição e maturação gonadal, mostrando células gonadais em diversos estádios de maturação gonadal de acordo com OECD (2010) e conforme características da espécie, uma vez que *D. rerio* apresenta desova assíncronica dos oócitos

(CONNOLLY et al., 2014), ou seja, em condições favoráveis apresenta desova contínua conforme maturação das células germinativas. Dessa maneira, para garantir a eficácia reprodutiva as fêmeas precisam apresentar os diversos estádios de maturação, desde a fase I (células germinativas), início da maturação gonadal, até a fase V (oócito com vitelogênese completa), estágio final de maturação, em que está apto a ser desovado.

Figura 1- Corte histológico de gônada de fêmea adulta de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias - controle.



Fonte: o autor.

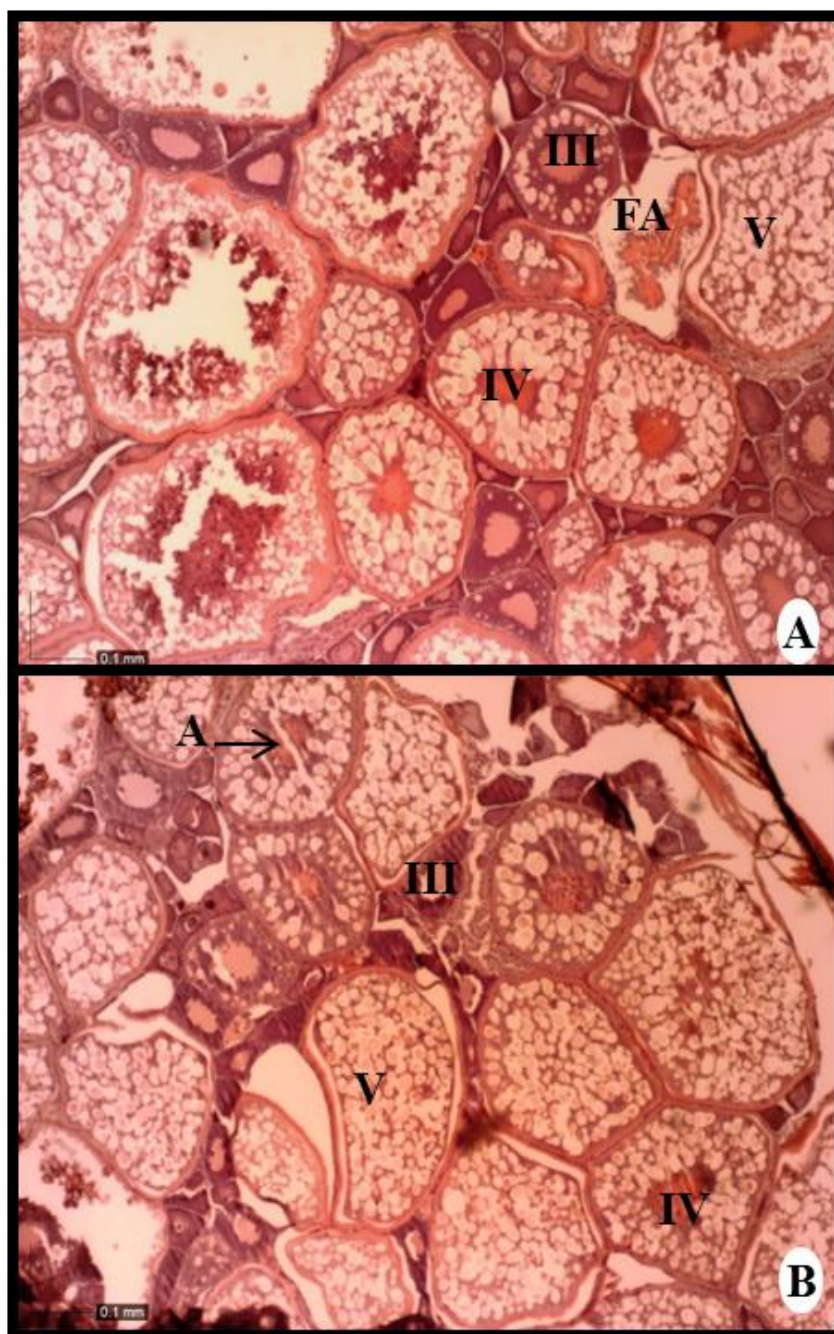
Legenda: A) ovário apresentando oócitos em diferentes fases de desenvolvimento ovocitário e B) ovário apresentando oócitos em diferentes fases de desenvolvimento e estruturas, I – Ovogonia (células germinativas – Fase I), II – oócitos estoques de reserva (Fase II), III - oócito com vitelogênese lipídica (Fase III), IV – oócito com vitelogênese lipídica e proteica, V – oócito com vitelogênese completa (Fase V), N – núcleo, n – nucléolo, AC – Alvéolo cortical, ZR – Zona radiata e EV – envelope vetelogênico.

Por outro lado, os organismos expostos cronicamente aos metais (Cd e Zn) sofreram alteração no padrão de maturação gonadal. Na Figura 2 tem-se cortes histológicos de fêmeas expostas ao Cd (0,25µg/L) onde é possível observar predomínio de estádios intermediários e finais de maturação, oócito com vitelogênese lipídica (Fase III), oócito com vitelogênese lipídica e proteica (Fase IV), oócito com vitelogênese completa (Fase V) e até mesmo folículos atrésicos (FA) que, em hipótese, podem ser consequência de mudanças fisiológicas causando degeneração nos oócitos, característica essa comumente observada nos ovários em estágio de maturação, maduros ou esvaziados parcial ou completamente (VAZZOLER, 1996).

O aumento da presença de folículos atrésicos também foi observado em *Oreochromis niloticus*, quando expostos a 0,7 mg/L de acetato de chumbo de forma crônica em 21 dias de exposição (DOAA; HANAN, 2013), além do aumento no número de folículos atrésicos causado pela exposição de 45 dias a cloreto de cádmio (6 e 9 mg/L), alterações como predomínio de fases iniciais de desenvolvimento foram observadas em *Heteropnuestes fossilis* (SHARMA et al., 2011), diferentemente do estudo em questão com *D. rerio*, diferenças que podem estar relacionadas a biologia das espécies.

Dessa maneira o predomínio de estádios finais de maturação pode causar efeitos na perpetuação de *D. rerio*. Em um determinado tempo os organismos não terão oócitos para amadurecer, desovar e continuar a reprodução de acordo com seu ciclo normal de reprodução.

Figura 2- Corte histológico de gônada de fêmea adulta de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias de exposição a 0,25 µg/L de cádmio.



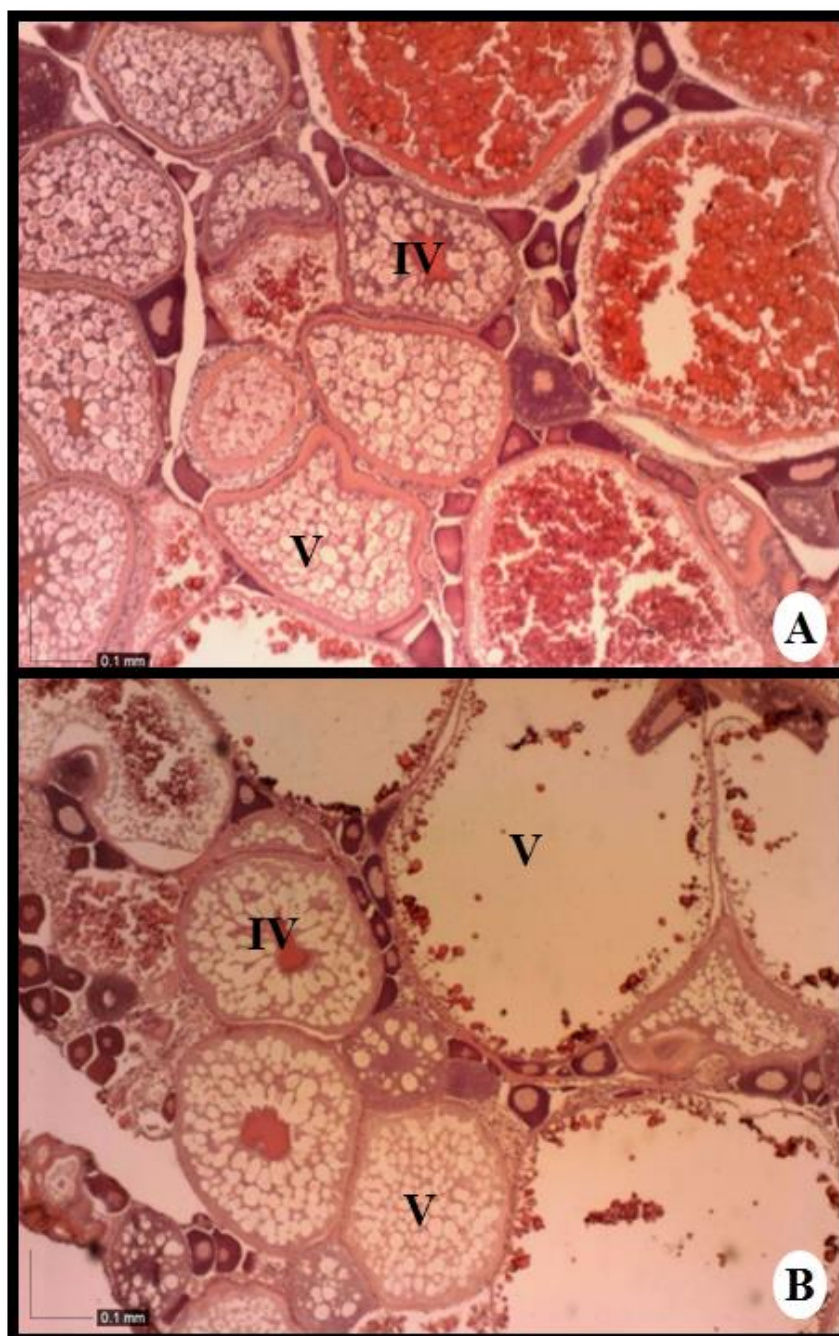
Fonte: o autor.

Legenda: A e B) ovário apresentando oócitos em diferentes fases de desenvolvimento ovocitário evidenciando o predomínio de fases intermediárias e avançadas de maturação, III - oócito com vitelogênese lipídica (Fase III), IV - oócito com vitelogênese lipídica e proteica (Fase IV), V - oócito com vitelogênese completa (Fase V), FA - Folículo atresico e A - artefato da técnica provocado pela navalha de aço.

O avanço dos efeitos nocivos a exposição ao Cd pode ser observado na Figura 3, a qual mostra cortes histológicos de gônadas de fêmeas de *D. rerio* expostas a 1µg/L de Cd,

valor permitido pela legislação brasileira (BRASIL, 2005), a qual evidencia o predomínio de oócitos com vitelogênese lipídica e proteica (Fase IV) e oócitos com vitelogênese completa (Fase V), bem como o aumento da presença de folículos atrésicos, onde quase não é possível observar ovogônias (Fase I) e oócitos estoque de reserva (Fase II) que seriam utilizados para continuar o ciclo reprodutivo assíncronico de *D. rerio*, comprometendo assim a capacidade reprodutiva da espécie e sua perpetuação no ambiente. Podemos assim dizer que quanto maior a concentração de Cd no ambiente maior será o estímulo para o desenvolvimento ovariano de *D. rerio*, não sendo esse um estímulo normal, já que impede a maturação gonadal de forma assíncronica, podendo resultar em desordens ambientais, uma vez que organismos como *D. rerio* são considerados elo da cadeia alimentar e sua falta/ausência pode provocar efeitos nos diferentes níveis tróficos. Nos níveis tróficos superiores a ausência de alimento, por exemplo, e nos níveis tróficos inferiores a falta de predação, podendo levar a uma superpopulação.

Figura 3- Corte histológico de gônada de fêmea adulta de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias e exposição a 1 µg/L de cádmio.



Fonte: o autor.

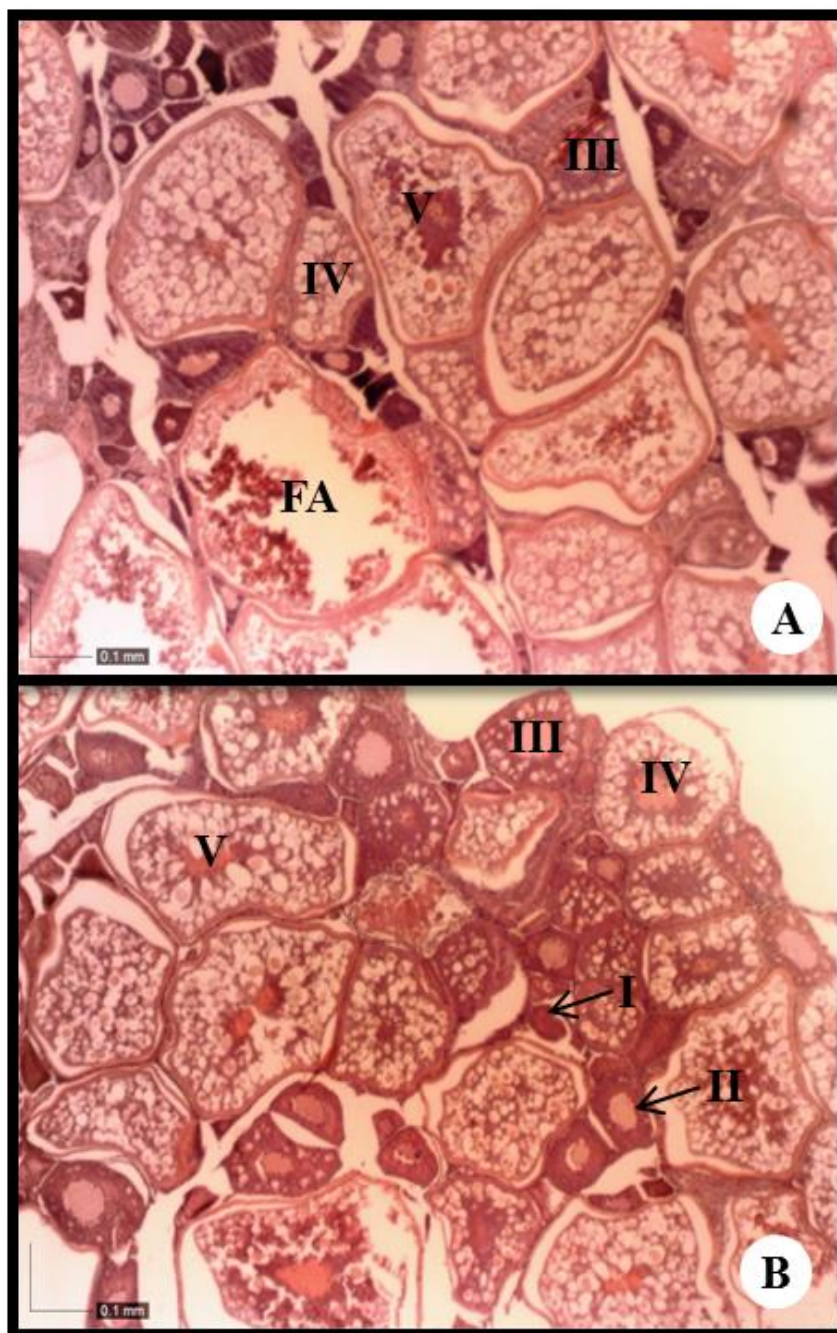
Legenda: A e B) ovário apresentando oócitos em diferentes fases de desenvolvimento ovocitário evidenciando o predomínio de fases avançadas de maturação IV – oócito com vitelogênese lipídica e proteica (Fase IV) e V – oócito com vitelogênese completa (Fase V).

Assim como Cd, bisfenol A, plastificante amplamente utilizado na indústria e que mesmo banido ainda encontra-se presente no ambiente aquático, sua toxicidade possui

semelhança com a de Cd uma vez que com o aumento da concentração de exposição leva ao aumento da presença de oócitos em estágio final de maturação e diminuição do número de oócitos em estágio inicial dificultando a ovogênese (YON; AKBULUT, 2014), podendo provocar efeitos na reprodução.

O Zn também causou alterações histológicas nas gônadas de fêmeas de *D. rerio*. como mostra a Figura 4, observa-se que os organismos apresentam as diferentes fases de maturação, com predomínio de oócito com vitelogênese lipídica e proteica (Fase IV) e oócito com vitelogênese completa (Fase V), mas também apresentam fases iniciais (menos evidente) como ovogônia (células germinativas – Fase I) e oócitos estoques de reserva (Fase II). Na figura 4-A podemos observar folículos atrésicos indicando assim a alteração na maturação gonadal das fêmeas expostas a Zn (120 µg/L).

Figura 4 - Corte histológico de gônada de fêmea adulta de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias e exposição a 120 µg/L de zinco.



Fonte: o autor.

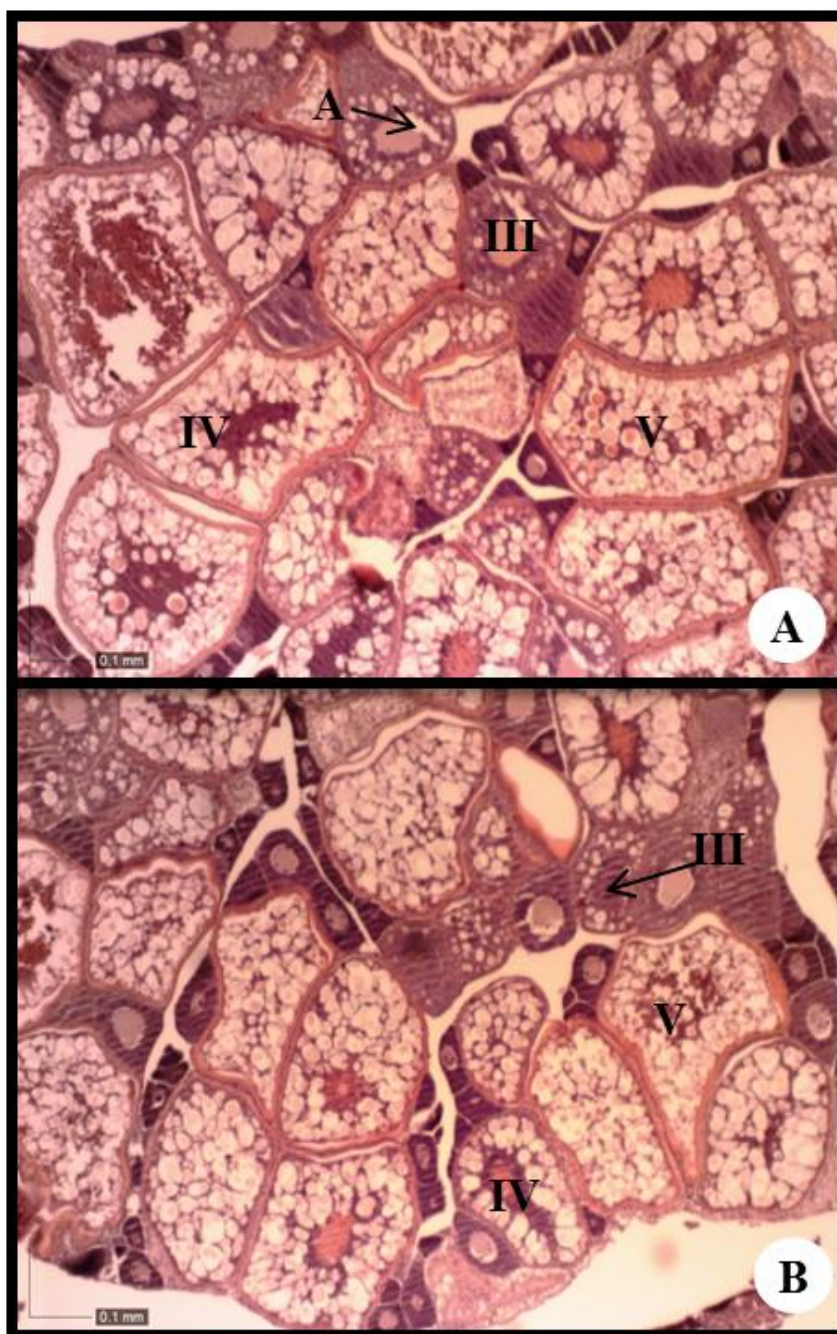
Legenda: A e B) ovário apresentando oócitos em diferentes fases de desenvolvimento ovocitário evidenciando o predomínio de fases intermediárias e avançadas de maturação, I – Ovogônia (células germinativas – Fase I), II – oócitos estoques de reserva (Fase II), III - oócito com vitelogênese lipídica (Fase III), IV – oócito com vitelogênese lipídica e proteica (Fase IV) e V – oócito com vitelogênese completa (Fase V)

O cromo, que também é um elemento metálico, também é capaz de interferir no desenvolvimento gonadal e conseqüentemente na maturação de peixes. Em *Channa*

punctatus, expostos durante 30 dias a 4 mg/L, o mesmo retardou o crescimento do ovário em comparação ao controle e provocou diminuição do diâmetro dos oócitos em fases iniciais (MISHRA; MOHANTY, 2008), mostrando assim que metais, em geral, podem afetar as gônadas de peixes fêmeas.

Entre as duas concentrações testadas de Zn não foi possível observar diferenças no padrão de alteração na maturação gonadal de fêmeas de *D. rerio*. Observa-se, na Figura 5, que apresenta cortes histológicos obtidos das fêmeas expostas cronicamente a 180 µg/L de Zn, que o padrão de maturação é semelhante ao encontrados nas fêmeas expostas a 120 µg/L (Figura 4), apresentando predomínio de oócito com vitelogênese lipídica (Fase III), oócito com vitelogênese lipídica e proteica (Fase IV) e oócito com vitelogênese completa (Fase V), alguns folículos atrésicos e de forma menos evidente ovogônia (células germinativas – Fase I) e oócito estoques de reserva (Fase II).

Figura 5 - Corte histológico de gônada de fêmea adulta de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias e exposição a 180 µg/L de zinco.



Fonte: o autor.

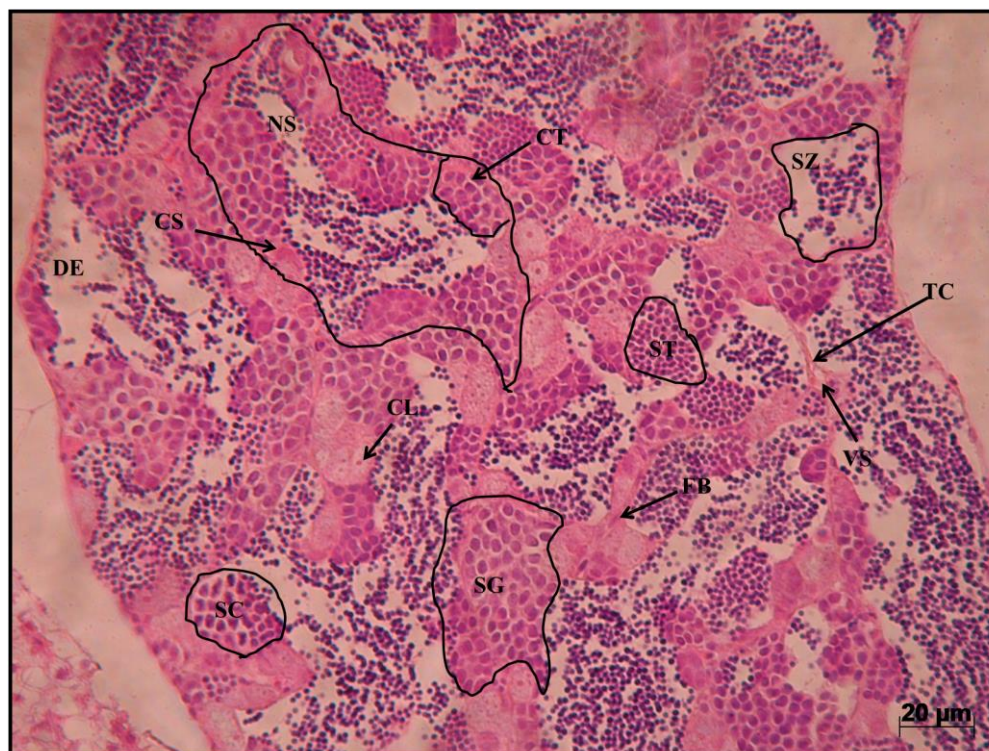
Legenda: A e B) ovário apresentando oócitos em diferentes fases de desenvolvimento ovocitário evidenciando o predomínio de fases intermediárias e avançadas de maturação, III - oócito com vitelogênese lipídica (Fase III), IV - oócito com vitelogênese lipídica e proteica (Fase IV), V - oócito com vitelogênese completa (Fase V) e A - artefato da técnica causado pela navalha de aço.

Outro metal essencial capaz de causar danos a gônada feminina é o níquel. *Oreochromis mossambicus*, expostos a 0,5 e 1 mg/L de sulfato de níquel por 30 dias, apresentaram predominância de folículos atrésicos e oócitos pré-vitelogênicos (SIOSON; HERRERA, 1996).

Além dos efeitos aqui apresentados os metais podem ser responsáveis por provocar redução no número de oócitos e diminuição da qualidade dos mesmos, efeitos que podem ser causados de forma direta ou indireta pela ação do metal provocando mudanças fisiológicas que alterem esse padrão (BRRACH; JANGU, 2015). Além disso, também podem provocar elevada atresia de oócitos, deformação na zona radiata oócitos necróticos, túnica albugínea quebrada (EL-MORSHEDI et al., 2014), vacuolização do citoplasma e fragmentação dos oócitos com forma alterada (MAGAR; BIAS, 2013), levando a problemas tanto no sucesso quanto na taxa reprodutiva.

Em relação aos machos, a análise histológica gonadal do controle (Figura 6), mostra um padrão normal de desenvolvimento ovocitário (assíncronico), sem alterações, apresentando todas as fases das células germinativas, espermatogônia (fase inicial de diferenciação), espermatócito, espermatíde e a fase final (desenvolvimento completo), espermatozoide apto a ser lançado no ducto espermático e liberado no ambiente. Além disso, apresenta células de Leydig, maior fonte de hormônios esteroides em peixes (NÓBREGA; BATLOUNI; FRANÇA, 2009) e células de Sertoli, que facilitam a sobrevivência e desenvolvimento das células germinativas de modo que a espermatogênese possa fornecer células suficientes para garantir a fertilidade (SCHULZ et al., 2015), assim como apresenta cistos em pleno desenvolvimento.

Figura 6- Corte histológico de gônada de macho adulto de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias - controle.



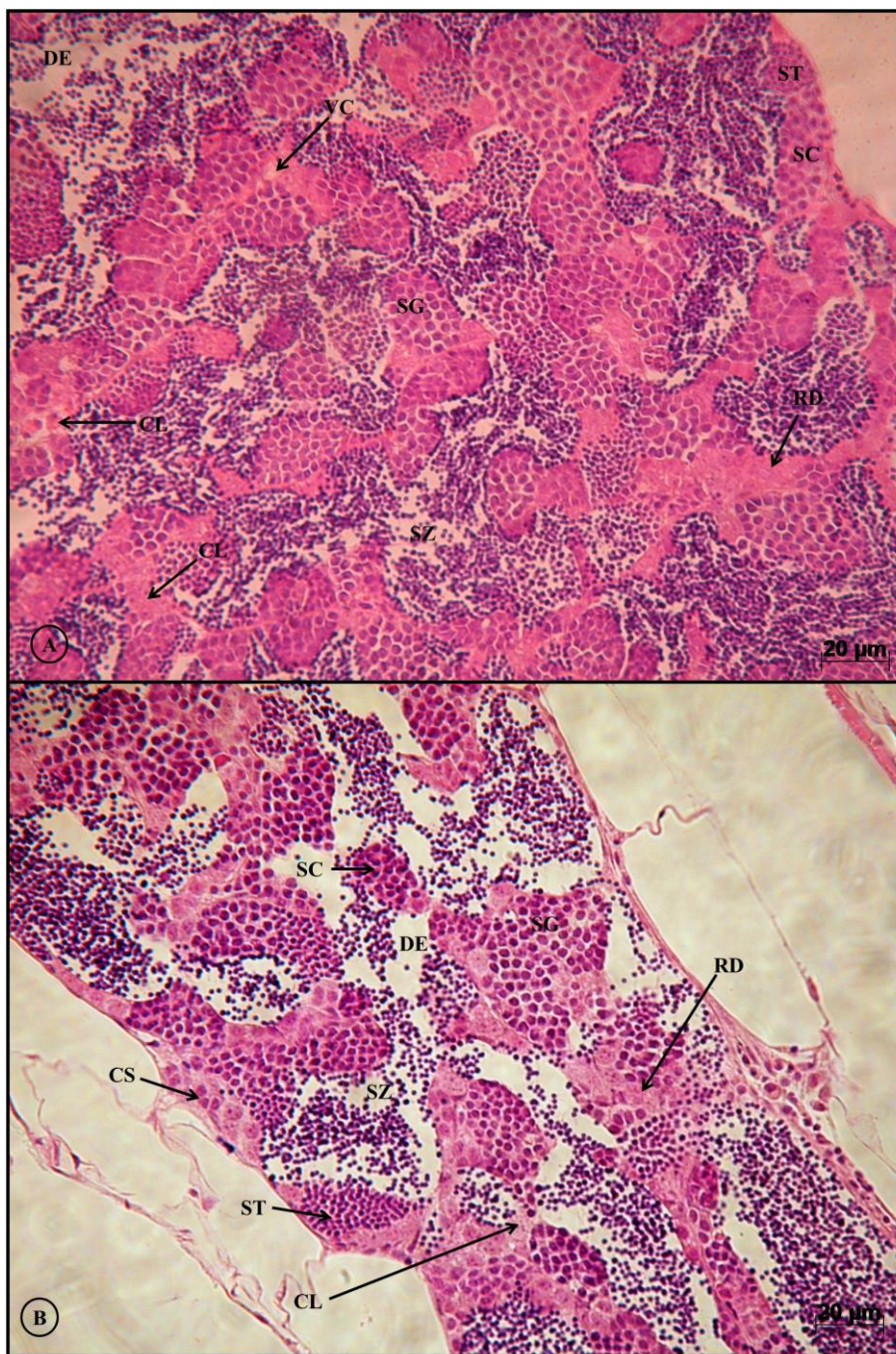
Fonte: o autor.

Legenda: SG – espermatogônia; SC – espermatócito; ST – espermátide; SZ – espermatozoide; CS – células de Sertoli; CL – células de Leydig; NS – nicho espermatogonial; DE – ducto espermático; TC – tecido conjuntivo; FB – fibroblasto; CT - cisto e VS – vasos sanguíneos.

Em relação aos organismos expostos ao Cd, nas concentrações estudadas (0,25 e 1 $\mu\text{g/L}$) observa-se pequenas regiões em degeneração como mostra a Figura 7, porém esta não é uma alteração drástica e representativa que possa comprometer o desenvolvimento gonadal e a maturação sexual de machos de *D. rerio* ou a eficiência reprodutiva do mesmo, uma vez que os organismos apresentam todas as fases de maturação espermatogonial em desenvolvimento.

Salienta-se que essas degenerações podem ser progressivas conforme aumento do tempo de exposição, bem como aumento da concentração de exposição, já que em ambientes naturais as concentrações de maneira geral encontram-se em desacordo com o permitido em legislação, onde os valores de metais encontrados no ambiente costumam ser mais altos do que o permitido (GOHER et al., 2014).

Figura 7 – Corte histológico de gônada de macho adulto de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias e exposição ao de cádmio.



Fonte: o autor

Legenda: A – Gônada de macho exposta a 0,25 µg/L de cádmio; B - Gônada de macho exposta a 1 µg/L de cádmio. SG – espermatogônia; SC – espermatócito; ST – espermátide; SZ – espermatozoide; CS – células de Sertoli; CL – células de Leydig; NS – nicho espermatogonial; DE – ducto espermático; VS – vasos sanguíneos e RD – região em degeneração.

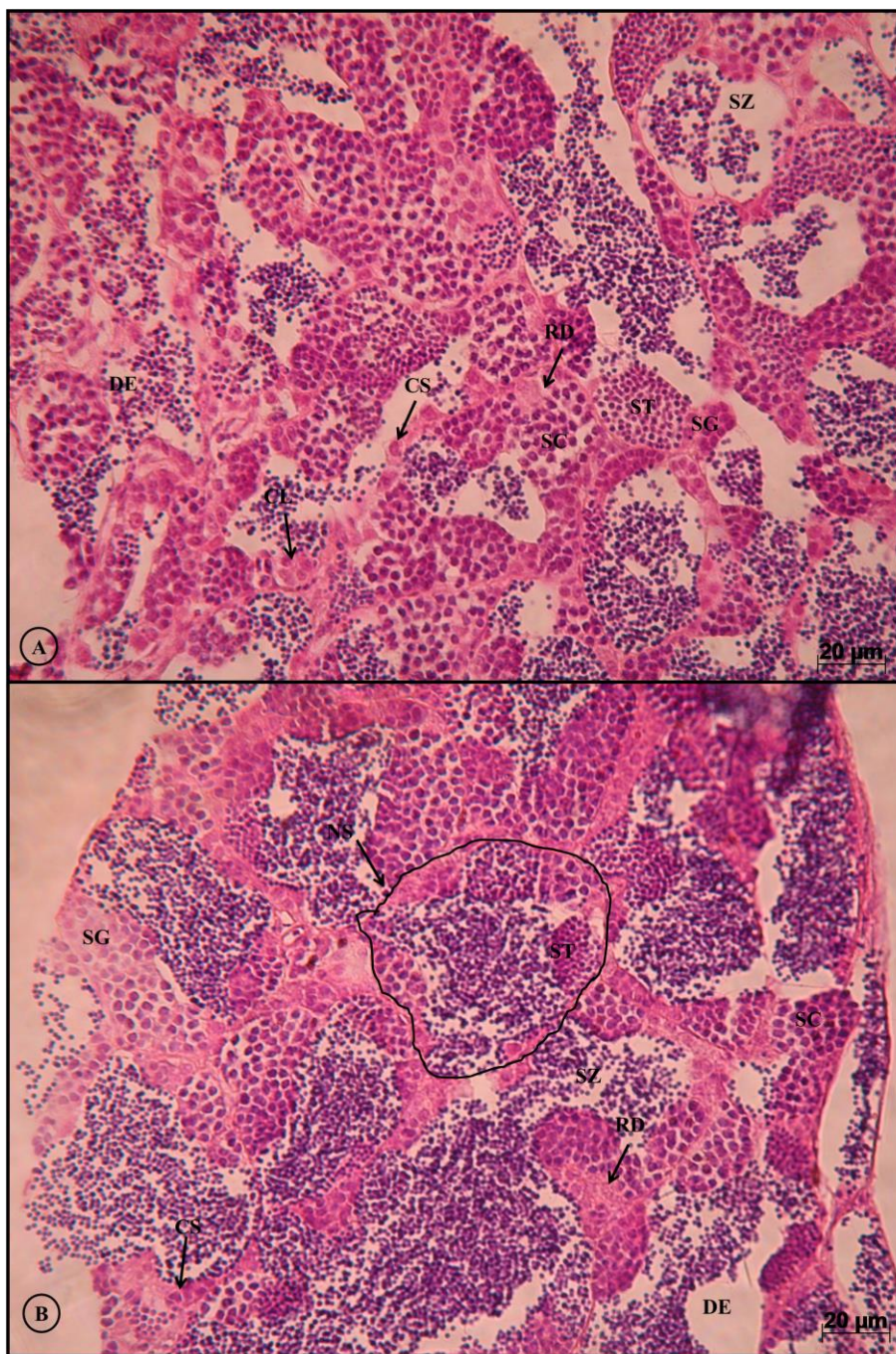
Por outro lado a exposição a 143,78 µg/L de Cd foi capaz de aumentar o número de espermátides imaturas em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após 30 dias de exposição (LUO et al., 2015) e reduzir o número de espermatogônias, alterar a forma dos

túbulos seminíferos, aglomerar espermátocitos e aumentar o número de espermátides, em machos de *Xiphophorus helleri*, após cinco dias de exposição a 100 e 500 µg/L de Cd (YÖN et al., 2015), deve-se ressaltar que a concentração capaz de causar alterações em tilápia do Nilo e *Xiphophorus helleri* é cem vezes maior que a mais alta concentração a que *D. rerio* foi submetido nesta pesquisa, sendo essa uma hipótese para Cd causar danos em tilápia do Nilo e *Xiphophorus helleri* e não em *D. rerio*.

Em ambiente natural, machos de *Oreochromis niloticus*, coletados no lago Manzala no Egito, região com alta concentração de Cd, alterações como degeneração no epitélio germinativo, vacuolização na proliferação de células germinativas, declínio nas células espermáticas e na densidade de espermatozoides foram observadas (SHALABY; ABD-EL MIGEED, 2012).

Quando comparamos os organismos expostos ao Zn (Figura 8), nas concentrações testadas (120 e 180 µg/L) com o controle (Figura 6), percebe-se que o desenvolvimento gonadal encontra-se normal, apresentando as diversas fases de desenvolvimento das células germinativas, desde espermatogônias até espermatozoides, assim como células de Sertoli e de Leydig que ajudam no funcionamento do testículo e de forma pontual apresentam regiões em degeneração nos testículos. Estas que não são representativas para comprometer a reprodução do organismo, pois, são alterações que não comprometem todo o órgão, porém, as mesmas servem como indicativo de que o Zn, em concentrações permitidas para a proteção da vida aquática a longo prazo e em exposição contínua, podem provocar danos morfológicos em *D. rerio* que comprometa a capacidade reprodutiva, uma vez que no ambiente natural são encontradas concentrações mais altas de metais do que o permitido.

Figura 8 – Corte histológico de gônada de macho adulto de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias e exposição ao zinco.



Fonte: o autor.

Legenda: A – Gônada de macho exposta a 120 µg /L de zinco; B - Gônada de macho exposta a 180 µg/L de zinco. SG – espermatogônia; SC – espermatócito; ST – espermátide; SZ – espermatozoide; CS – células de Sertoli; CL – células de Leydig; NS – nicho espermatogonial; DE – ducto espermático; VS – vasos sanguíneos e RD – região em degeneração.

Resultado diferente foi observado em machos de *Astyanax aff. bimaculatus* expostos por 96 horas em cinco concentrações diferentes de Zn (3, 5, 10, 15 e 20 mg/L)

apresentando ruptura de cisto, retardo no desenvolvimento das células da linhagem germinativa, núcleo picnótico, aglomerado celular, deslocamento da parede do cisto e vacuolização sendo as observações mais pronunciadas conforme o aumento da concentração de Zn (SANTOS et al., 2015). Ressalta-se que a concentração inicial de exposição de *A. aff. bimaculatus* é 16 vezes maior que a concentração de exposição de *D. rerio*, sendo uma hipótese para o possível dano provocado em *Astyanax aff bimaculatus* e não em *D. rerio*.

Por zinco ser um metal essencial poucas pesquisas, apesar da ampla distribuição no ambiente, levam em consideração a sua possível toxicidade ou mesmo a possibilidade de atuação como IE. Assim, determinar padrões de proteção para a vida aquática em relação ao Zn é uma tarefa difícil.

Da mesma forma, a literatura que aborda efeitos histológicos de metais em gônadas de peixe é escassa e insuficiente para atender a atual necessidade de informações, uma vez que estudos que possuem como foco a capacidade de interferência endócrina de diferentes substâncias químicas estão em ascensão no mundo acadêmico, mostrando assim que essa área de atuação é um campo promissor para novas pesquisas com tendência a crescimento, já que metais estão dispersos no ambiente aquático como um todo. Ressaltando-se assim, a necessidade não só de estudos histológicos como também histoquímicos e moleculares, bem como revisão de valores permitidos em legislação, já que, como demonstrado neste estudo, mesmo esses valores são capazes de causar efeito nocivo nas gônadas de peixe podendo comprometer a reprodução.

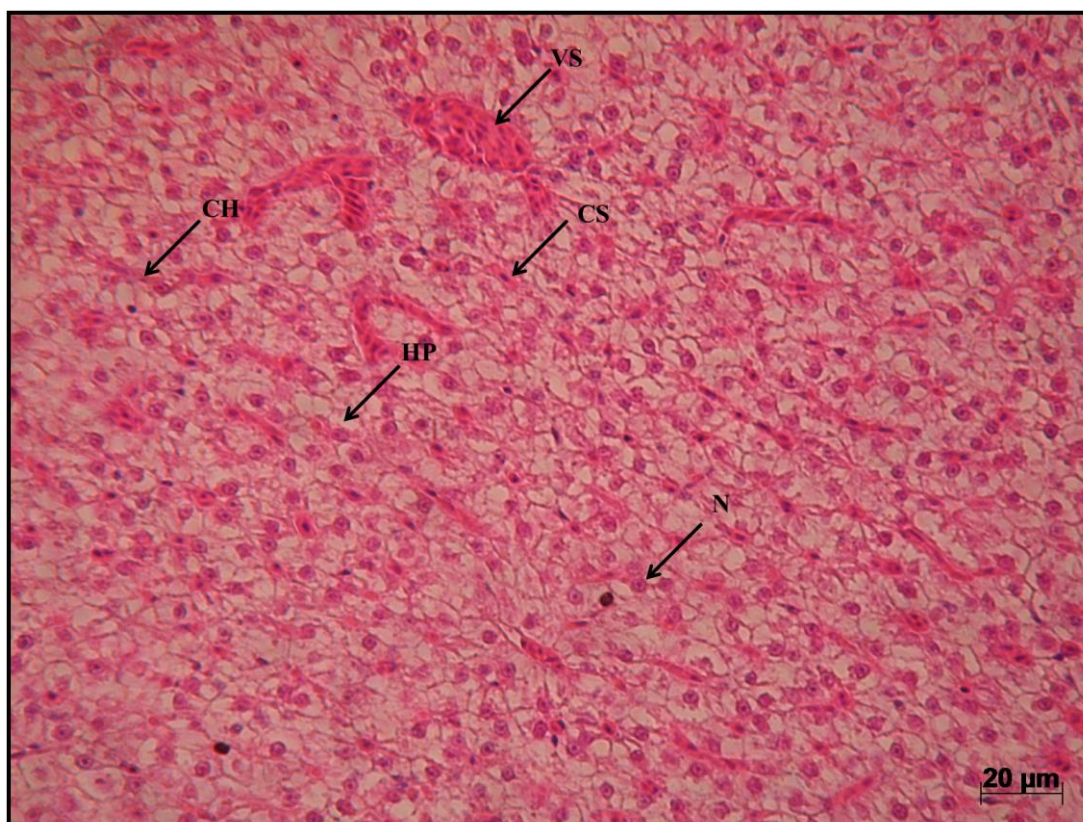
Assim, fica difícil a criação de um banco de dados com informações acerca de danos histológicos de metais em gônadas de peixes com predição a potencial atuação como IE, o que é de extrema importância já que a perpetuação das espécies depende de um bom funcionamento do sistema endócrino. Banco de dados esse que poderia auxiliar os governantes na tomada de decisão quanto a valores de metais permitidos por legislação no ambiente aquático.

Outro importante órgão para o funcionamento de todo sistema biológico é o fígado, o mesmo apresenta diversas funções vitais para a sobrevivência dos organismos e estão envolvidos de forma direta na síntese e quebra de moléculas, assim como no processo de desintoxicação do organismo (BRUSLÉ; ANADON, 1996). Dessa forma, estudar suas

alterações estruturais e morfológicas leva a compreender outras alterações apresentadas pelos organismos, entre elas alterações relacionadas a saúde endócrina.

A organização estrutural do fígado envolve um complexo arranjo de cordões hepáticos, garantindo a integridade do órgão, hepatócitos e núcleo íntegros e evidentes, vasos e células sanguíneas que irriguem e alimentem o sistema, para que dessa forma as funções do órgão possam ser desempenhadas sem prejuízo a outras funções biológicas que dependem do mesmo. Essas evidências podem ser encontradas na Figura 9, a qual representa o corte histológico de um fígado de macho adulto de *D. rerio* (controle). Por outro lado o controle de fêmeas (Figura 10), já apresenta vacuolização e algumas regiões em degeneração, porém este controle não foi eliminado uma vez que como demonstrado a seguir a exposição aos metais estudados provocou progressão nessas alterações.

Figura 9 – Corte histológico de fígado de macho adulto de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias - controle.



Fonte: o autor.

Legenda: VS – vasos sanguíneos; CH – cordões hepáticos; CS – células sanguíneas; HP – hepatócito e N – núcleo.

Figura 10 – Corte histológico de fígado de fêmea adulta de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias - controle.

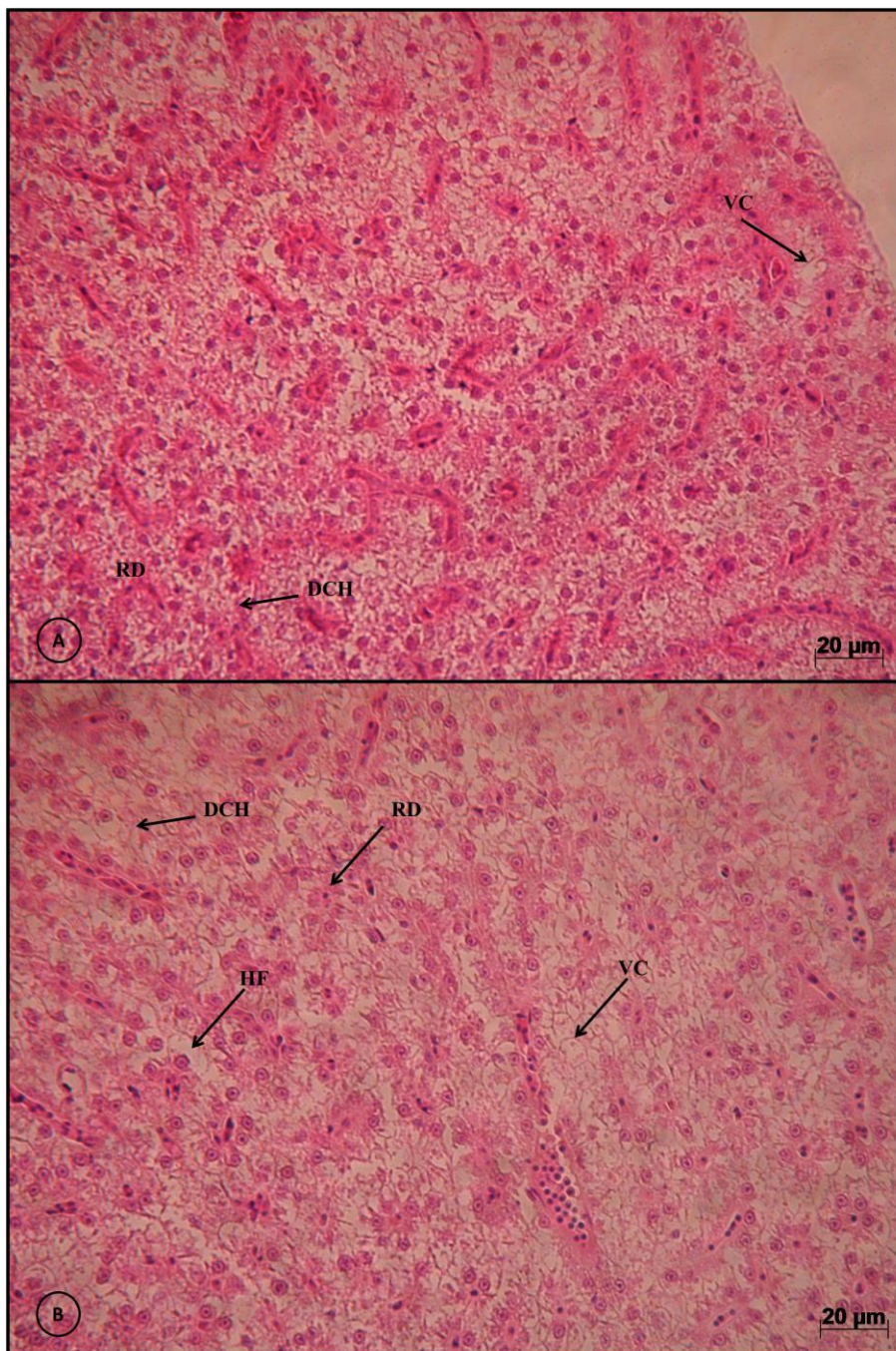


Fonte: o autor.

Legenda: VC – vacuolização; RD – região em degeneração.

A exposição crônica de machos *D. rerio* a 0,25 (Figura 11-A) e 1 μg de Cd/L (Figura 11-B) foi capaz de provocar alterações no tecido hepático, inicialmente com vacuolização dos hepatócitos progredindo a degeneração do tecido e conseqüentemente um desarranjo dos cordões hepáticos. Além disso as alterações foram progressivas com o aumento da concentração de exposição, ou seja, em geral organismos expostos a 1 μg/L de Cd apresentaram vacuolização, degeneração e desarranjo dos cordões hepáticos mais pronunciados, além de apresentarem hipertrofia dos hepatócitos, ou seja, aumento do tamanho das células, comprometendo funções básicas do fígado, relacionadas a quebra e síntese de moléculas, interferindo nas reações anabólicas e catabólicas que dependem do fígado, podendo promover desordens no sistema biológico como um todo.

Figura 11 – Corte histológico de gônada de macho adulto de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias e exposição ao cádmio.



Fonte: o autor.

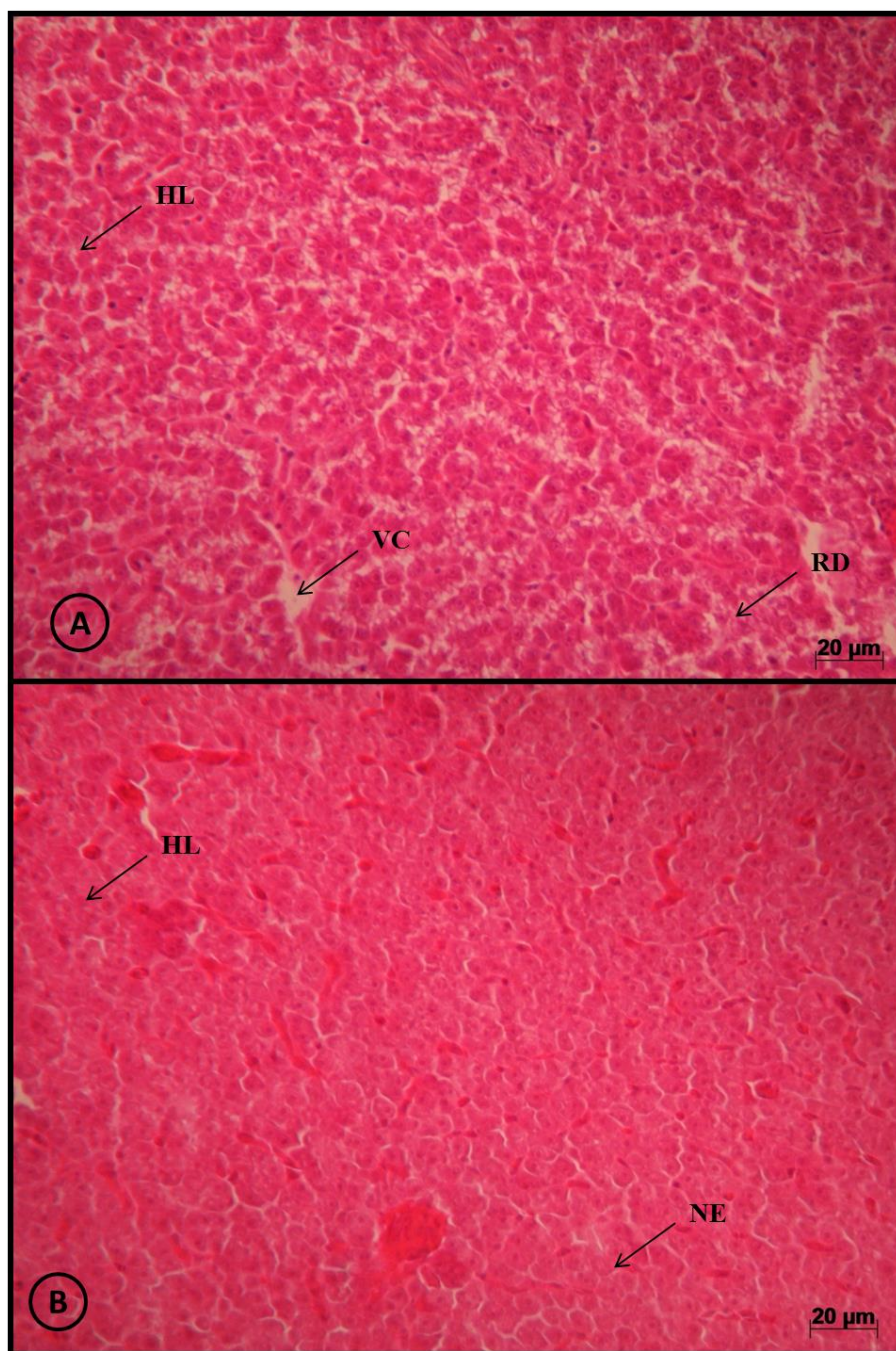
Legenda: A) Fígado de macho exposto a 0,25 µg/L de cádmio; B) Fígado de macho exposto a 1 µg/L de cádmio. VC – vacuolização dos hepatócitos; RD – região em degeneração; DCH – desarranjo dos cordões hepáticos e HF – hipertrofia dos hepatócitos.

Em fêmeas (Figura 12 e 13) as alterações provocadas por Cd foram mais pronunciadas nas duas concentrações estudadas, provocando, além de vacuolização, degeneração e desarranjo dos cordões hepáticos (também encontrado no controle) a

hiperplasia dos hepatócitos, relacionados aos estímulos e a maior necessidade de desintoxicação do fígado e agravando-se para um quadro final de necrose, provocando todo desarranjo do tecido hepático e comprometendo as funções básicas.

As alterações encontradas podem não só comprometer questões endócrinas provocando problemas relacionados ao desenvolvimento sexual e reprodução, mas também outros problemas fisiológicos, como alterações no metabolismo energético, uma das funções do fígado (RUI, 2014), dificultando a sobrevivência do organismo e o desenvolvimento de funções que façam uso de energia como as desenvolvidas pelo coração, cérebro e tecido muscular.

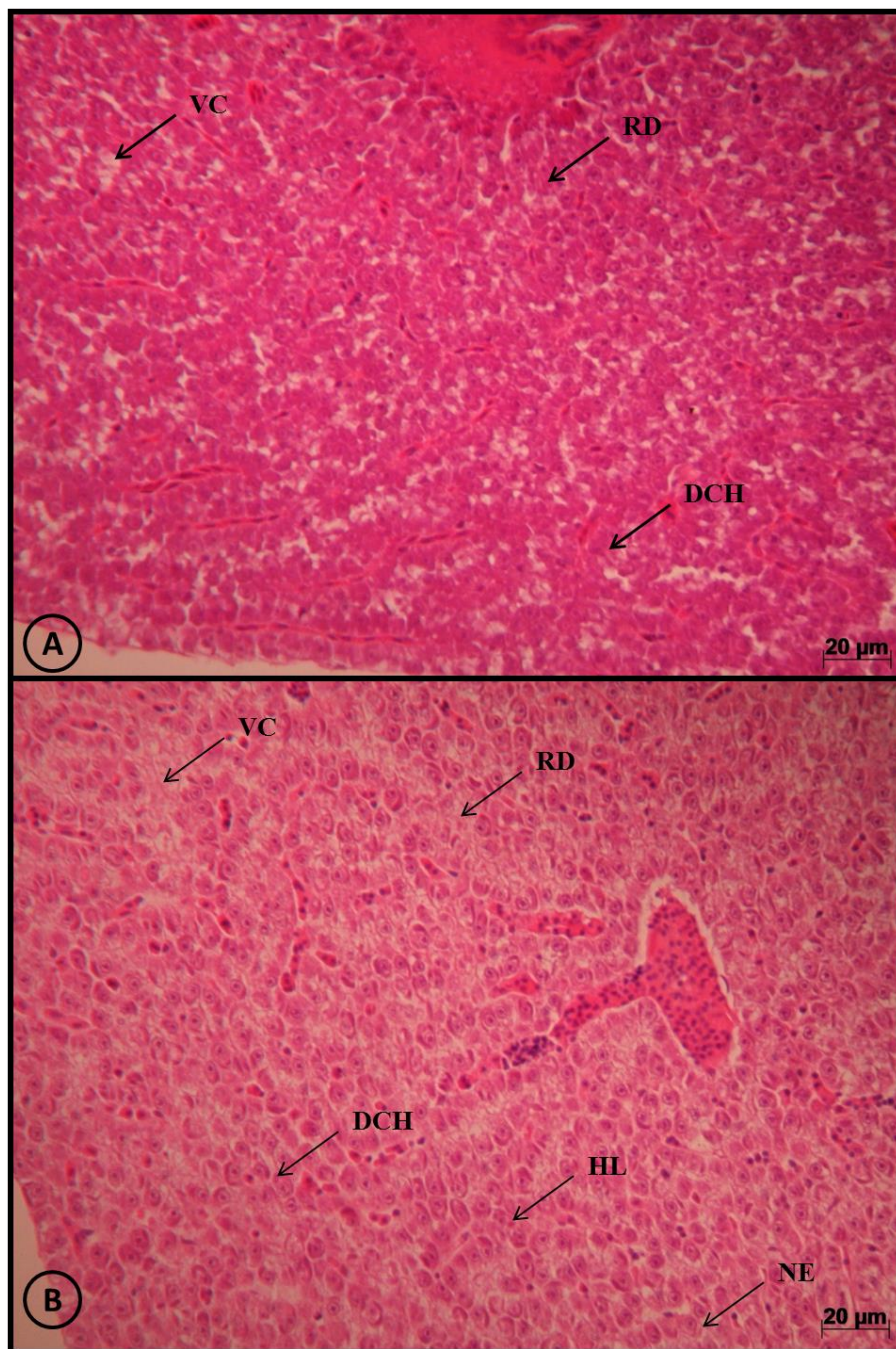
Figura 12 – Corte histológico de fígado de fêmea adulta de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias e exposição a 0,25 µg/L de cádmio.



Fonte: o autor.

Legenda: Fígado de fêmea exposta a 0,25 µg/L de cádmio. VC – vacuolização dos hepatócitos; RD – região em degeneração; DCH – desarranjo dos cordões hepáticos e HL – hiperplasia dos hepatócitos

Figura 13 - Corte histológico de fígado de fêmea adulta de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias e exposição a 1 µg/L de cádmio.



Fonte: o autor.

Legenda: A e B) Fígado de fêmea exposta a 1 µg/L de cádmio. VC – vacuolização; RD – região em degeneração; DCH – desarranjo dos cordões hepáticos; HL – hiperplasia dos hepatócitos; NE - necrose.

Em *Ophiocephalus striatus* expostos a 630 µg/L de Cd por 96 horas o referido metal foi capaz de causar diversas alterações no fígado, entre elas, degeneração, necrose e hipertrofia das células hepáticas (BAIS; LOKHANDE, 2012). A exposição por 45 dias a 800 µg/L de cloreto de Cd provocou modificações na estrutura do fígado, aparecimento de

células com núcleo picnótico, dilatação e congestionamento de vasos sanguíneos intra-hepáticos, inflamação leucocitária, vacuolização e necrose celular em *Channa striatus* (RADHAKRISHNAN; HEMALATHA, 2010).

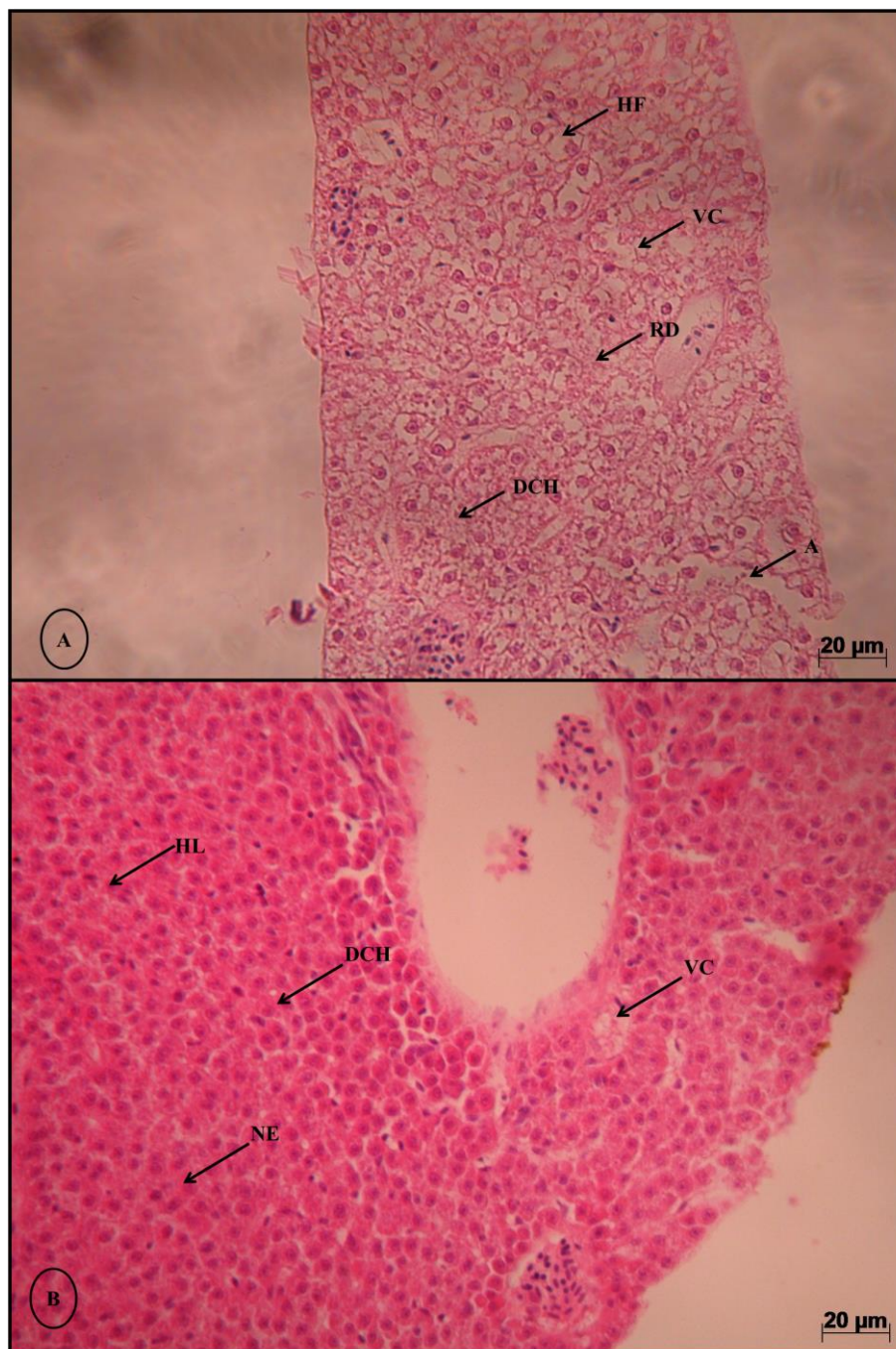
Em *Acrossocheilus fasciatus* a exposição a 50, 500 e 5000 $\mu\text{g/L}$ de cloreto de Cd por 12, 24, 36 e 48 horas causou um aumento na vacuolização celular e no bloqueio de vasos sanguíneos relacionados ao aumento da concentração e do tempo de exposição (LIU et al., 2015). O Cd também provocou alterações no fígado de *Sparus aurata* expostos a 1000 $\mu\text{g/L}$ de cloreto de Cd por 2, 10 e 30 dias, sendo elas deletérias e progressivas, mais pronunciadas a partir do décimo dia de exposição, incluindo vacuolização, migração do núcleo para a periferia do hepatócito chegando aos 30 dias de exposição a apresentar perda na organização celular, impossibilitando até mesmo a diferenciação dos cordões hepáticos, aumento no tamanho dos vacúolos e aumento de células sanguíneas no lúmen dos vasos (GUARDIOLA et al., 2013).

As alterações histológicas no fígado podem ser utilizadas como indicador de efeito dos contaminantes ambientais e refletir sobre a saúde geral da população no ecossistema (CIJI; NANDAN, 2014), porque é um órgão alvo para muitos parâmetros biológicos e ambientais e considerado um excelente modelo para estudo das interações de contaminantes ambientais e estruturas e funções hepáticas (BRUSLÉ; ANADON, 1996).

Apesar do Zn ser um metal essencial para o funcionamento do sistema biológico, o mesmo pode ser tóxico de diversas formas (ATSDR, 2005), afirmação que pode ser comprovada analisando-se a Figura 14, onde observa-se fígados de machos de *D. rerio* expostos a 120 e 180 $\mu\text{g/L}$ de Zn. Indivíduos expostos a 120 $\mu\text{g/L}$ de Zn (Figura 14-A), concentração permitida pela legislação americana (USEPA, 1995), apresentaram em seus fígados alterações como vacuolização, degeneração dos hepatócitos, desarranjo dos cordões hepáticos e hipertrofia, aumento do tamanho do hepatócito em relação ao controle, aumento esse que acontece por estímulos devido a maior demanda funcional da célula.

Essas alterações mostraram-se progressivas em relação ao aumento da concentração de exposição ao Zn, isso porque além das alterações já citadas, quando expostos a 180 $\mu\text{g/L}$ de Zn (Figura 14-B), o quadro de alteração evoluiu para uma severa e total desorganização do tecido (necrose), causando comprometimento do funcionamento do órgão como um todo.

Figura 14 – Corte histológico de fígado de macho adulto de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias e exposição ao zinco.



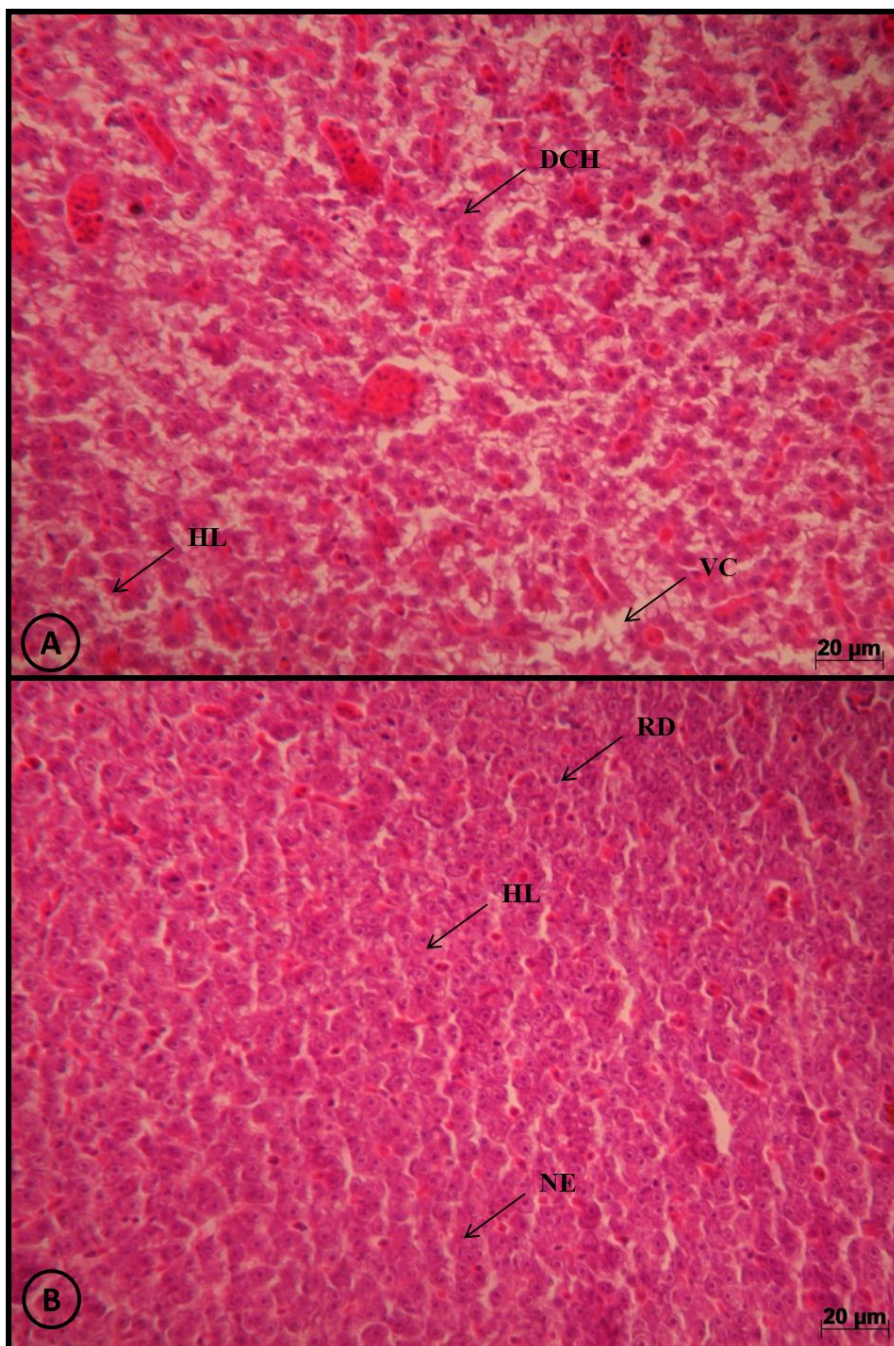
Fonte: o autor.

Legenda: A) Fígado de macho exposto a 120 µg/L de zinco; B) Fígado de macho exposto a 180 µg/L de zinco. VC – vacuolização dos hepatócitos; RD – região em degeneração; DCH – desarranjo dos cordões hepáticos; HF – hipertrofia dos hepatócitos; HL – hiperplasia dos hepatócitos; NE - necrose e A – artefato da técnica causado pela navalha de aço.

Assim como para o fígado de machos de *D. rerio*, o metal Zn mostrou-se tóxico para o fígado de fêmeas (Figura 15 e 16), causando aumento progressivo de vacuolização, degeneração e desarranjo dos cordões hepáticos em relação ao controle e as concentrações

testadas e em estágio final, a necrose de todo tecido hepático, impossibilitando a distinção dos hepatócitos, comprovando a morte do tecido e consequentemente falha das suas funções.

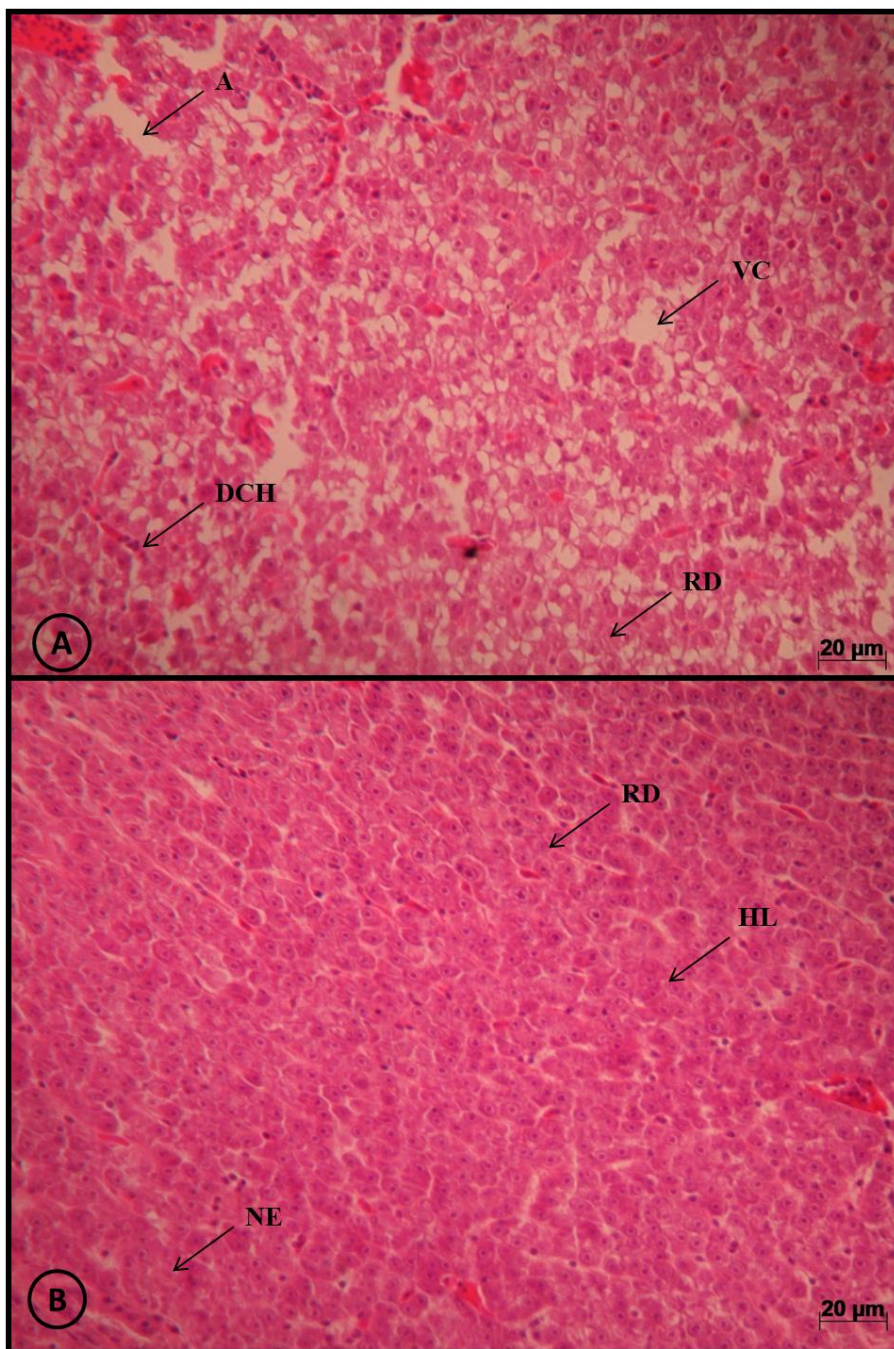
Figura 15 – Corte histológico de fígado de fêmea adulta de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias e exposição a 120 µg/L de zinco.



Fonte: o autor.

Legenda: A e B) Fígado de fêmea exposta a 120 µg/L de zinco. VC – vacuolização dos hepatócitos; RD – região em degeneração; DCH – desarranjo dos cordões hepáticos; HL – hiperplasia dos hepatócitos e NE – necrose.

Figura 16 – Corte histológico de fígado de fêmea adulta de *Danio rerio* após teste crônico de 21 dias e exposição a 180 µg/L de zinco.



Fonte: o autor.

Legenda: A e B) Fígado de fêmea exposta a 180 µg/L de zinco. VC – vacuolização dos hepatócitos; RD – região em degeneração; DCH – desarranjo dos cordões hepáticos; HL – hiperplasia dos hepatócitos e NE – necrose.

A exposição a 600, 900 e 1800 µg de Zn/L durante 3, 7, 14 e 28 dias provocou inchaço nos núcleos, degeneração e perda do núcleo dos hepatócitos no fígado de *Puntius parrah* (CIJI; NANDAN, 2014). Também foram encontradas alterações no fígado de

Schizothorax niger coletados no lago The Dal no vale do Kashmir na Índia, região com alta concentração de Zn, e conseqüentemente alta concentração de Zn no fígado dos organismos (variação em torno de 70 ppm), dentre as alterações encontradas destaca-se ruptura dos cordões hepáticos, congestionamento dos túbulos, degeneração do hepatócito e hiperplasia da células de Kupffer, variando de acordo com a época do ano em que os organismos foram coletados (YOUSUF et al., 2012).

Por outro lado, *Synechogobius hasta* apresentou correlação inversa as alterações apresentadas em relação as concentrações estudadas. O estudo teve a duração de 12 dias e coletas foram realizadas em 0, 4, 8 e 12 dias e as concentrações estudadas foram 350, 9700 e 19200 µg/L de Zn. Na menor concentração estudada (350 µg/L de Zn) o fígado dos organismos testados apresentou congestão da veia central, convergência dos sinusóides pelas células vermelhas e vacuolização citoplasmática e síndrome do fígado gordo com hepatócitos ocupados por grandes gotículas de lipídio em contrapartida, na maior concentração (19200 µg de Zn/L) todas essas alterações forma menos pronunciadas (ZHENG et al., 2011).

Os dois metais estudados (Cd e Zn) induziram alterações no fígado de *Oreochromis mossambicus* expostos durante 6, 12, 18, 24 e 96 horas e 28 dias a concentrações de 18 µg de Cd/L e 160 µg de Zn/L e 30 µg de Cd/L e 300 µg de Zn/L (em mistura) provocando grandes mudanças histológicas, incluído hialinização, congestão dos vasos sanguíneos, aumento da vacuolização associado ao acúmulo de lipídios, e inchaço celular (VAN DYK; PIETERSE; VAN VUREN, 2007).

O fígado é um órgão chave para o funcionamento do metabolismo dos peixes controlando funções vitais e desempenhando um papel proeminente na fisiologia dos mesmos - anabolismo e catabolismo (BRUSLÉ; ANADON, 1996), portanto, alterações no fígado podem desencadear respostas fisiológicas e alterar diversas respostas biológicas provocando efeitos decorrentes desse desencadeamento, como alterações endócrinas e conseqüentemente efeitos sobre o desenvolvimento e maturação sexual do organismo, como na taxa e no sucesso reprodutivo.

As concentrações estudadas nas pesquisas com fígado aqui apresentadas são concentrações elevadas em comparação ao permitido por legislações ambientais para proteção da vida aquática, fato esse que deve ser levado em consideração ao utilizar-se

desses valores como base para tomada de decisões governamentais, uma vez que os valores permitidos atualmente são capazes de provocar alterações graves que comprometem o funcionamento do órgão e colocam em risco a sobrevivência de *D. rerio*, resultados que se extrapolados para ambiente natural podem provocar morte de algumas espécies e consequentemente um desequilíbrio ambiental.

Fazendo um cruzamento (Tabela 1) dos dados obtidos entre as alterações encontradas nas gônadas de *D. rerio* com as encontradas no fígado, fica claro a influência do mesmo sobre o sistema biológico como um todo. Em machos as alterações no fígado foram menos pronunciadas, assim como as alterações nas gônadas, por outro lado em fêmeas as alterações encontradas no fígado foram bastante pronunciadas, chegando ao grau de necrose, refletindo assim sobre o desenvolvimento gonadal, pois o mesmo também sofreu efeitos, os quais podem comprometer a reprodução da espécie. Sendo assim fica claro que a associação de dados histológicos referente a gônada e fígado de peixes é uma ferramenta útil e importante para detecção de substâncias com potencial de interferência endócrina.

Tabela 1 – Cruzamento dos dados obtidos através das análises histológicas de fêmea e machos adultos de *Danio reio* após exposição de 21 dias ao cádmio e ao zinco.

Sexo do organismo	Orgão Metal - concentração	Gônada (efeitos observados)	Fígado (efeitos observados)
Fêmeas	Cádmio – 0,25 µg/L	Predomínio de fases intermediárias e avançadas de maturação (Figura 2)	Regiões em degeneração; vacuolização; hiperplasia e necrose (Figura 12)
	Cádmio – 1 µg/L	Predomínio de fases avançadas de maturação (Figura 3)	Regiões em degeneração; desarranjo dos cordões hepáticos; vacuolização, hiperplasia e necrose (Figura 13)
	Zinco – 120 µg/L	Apresenta todas as fases de maturação com predomínio de fases intermediárias e avançadas (Figura 4)	Regiões em degeneração; desarranjo dos cordões hepáticos; vacuolização; hiperplasia e necrose (Figura 15)
	Zinco – 180 µg/L	Apresenta todas as fases de maturação com predomínio de fases intermediárias e avançadas (Figura 5)	Regiões em degeneração; desarranjo dos cordões hepáticos; vacuolização; hiperplasia e necrose (Figura 16)
Machos	Cádmio – 0,25 µg/L	Regiões em degeneração (Figura 7-A)	Regiões em degeneração; desarranjo dos cordões hepáticos e vacuolização (Figura 11-A)
	Cádmio – 1 µg/L	Regiões em degeneração (Figura 7-B)	Regiões em degeneração; desarranjo dos cordões hepáticos; vacuolização e hipertrofia (Figura 11-B)
	Zinco – 120 µg/L	Regiões em degeneração (Figura 8-A)	Regiões em degeneração; desarranjo dos cordões hepáticos; vacuolização e hipertrofia (Figura 14-A)
	Zinco – 180 µg/L	Regiões em degeneração (Figura 8-B)	Regiões em degeneração; desarranjo dos cordões hepáticos; vacuolização; hiperplasia e necrose (Figura 14-B)

Fonte: o autor.

3.4 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados pode-se afirmar que Cd e Zn, nas concentrações permitidas por legislação, agem de forma diferente nas gônadas de *D. rerio*. Em fêmeas os metais provocaram alterações que podem comprometer a capacidade reprodutiva da espécie, já em machos esse efeito não foi observado.

Em relação ao fígado, Zn mostrou-se mais tóxico do que Cd, tanto para machos quanto para fêmeas de *D. rerio*, levando ao aparecimento de graves alterações histológicas como a necrose do tecido hepático. O biomarcador histológico (fígado e gônadas) mostrou-se como uma ferramenta útil na detecção de substâncias com potencial de atuação como interferentes endócrinos, reiterando-se a utilização de outras técnicas em conjunto.

Ao integrar-se os resultados obtidos pode-se afirmar que Cd e Zn em concentrações permitidas por legislação para proteção da vida aquática, são capazes de provocar efeitos endócrinos em *D. rerio*.

Dessa forma, com base em biomarcadores sensíveis da espécie *D. rerio*, deve-se atentar para a revisão de valores permitidos de metais no ambiente aquático para proteção da vida aquática uma vez que a presente pesquisa detectou potencial endócrino e consequente comprometimento do sucesso reprodutivo para manutenção das espécies.

Capítulo 4: Análise de vitelogenina por método histoquímico como indicador de efeito estrogênico em *Danio rerio* exposto a cádmio e zinco

Resumo

Diversos compostos químicos presentes no ambiente aquático possuem a capacidade de alterar o sistema endócrino dos organismos aquáticos, entre eles os metais, sendo o cádmio (Cd) e o zinco (Zn) suspeitos dessa atuação. Uma das ferramentas utilizadas para analisar esse efeito em machos é a detecção de vitelogenina (VTG), proteína com função definida na precursão do vitelo e posterior auxílio ao desenvolvimento embrio-larval, produzida apenas pelas fêmeas. Esta proteína pode ser detectada por métodos simples e baratos, como a marcação através do método histoquímico. Desse modo, esta pesquisa teve como objetivo analisar a capacidade de Cd e Zn em induzir a produção de VTG em machos de *D. rerio* e determinar se o método de marcação histoquímico é um método eficiente para estudar efeitos estrogênicos em machos de *D. rerio*. Para tanto machos adultos de *D. rerio* foram expostos cronicamente (21 dias) a 0,25 e 1 µg/L de Cd e 120 e 180 µg/L de Zn, valores permitidos por legislação para proteção da vida aquática. Posteriormente os organismos passaram por método de preparo histológico e marcação de VTG por método histoquímico para posterior análise qualitativa dos dados. Após análise foi possível observar que Cd e Zn, nas concentrações estudadas, são capazes de induzir a produção de VTG em machos de *D. rerio*, necessitando de revisão dos valores permitidos em legislação para proteção da vida aquática e confirmando a eficiência do método de marcação histoquímica para detecção de VTG e uso como indicador de efeito endócrino de compostos químicos em machos.

Palavras-chave: Cádmio. Zinco. Histoquímica. Interferente endócrino. *Danio rerio*. Histologia.

4.1 INTRODUÇÃO

Muitos compostos químicos orgânicos e inorgânicos usados diariamente pela sociedade têm o potencial de afetar o sistema endócrino dos vertebrados, que regula os processos vitais, incluindo o desenvolvimento, crescimento, metabolismo e a reprodução. Nas últimas décadas, a investigação sobre a identificação e os efeitos biológicos desses compostos tem se tornado uma importante área das ciências da saúde humana e ambiental (HIRAMATSU et al., 2005) e tende a continuar sendo foco de pesquisas científicas (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2011).

Um número cada vez maior de produtos químicos, respectivos subprodutos de degradação e produtos gerados após complexação, estão sendo reconhecidos como estrogênicos, sendo absorvidos e bioacumulados em concentrações na ordem de ng/L. Essa ordem de grandeza, segundo literatura, tem demonstrado ser suficientes para induzir

respostas fisiológicas principalmente nos grupos de peixes, que são indicativas de interferência endócrina (SUMPTER; JOBLING, 1995). Tal condição tem aumentando a necessidade de ensaios e análises biológicas precisas, em nível celular, e testes robustos para avaliação dos produtos químicos responsáveis pelos efeitos tóxicos causados (ÖRN et al., 2003).

Os produtos químicos chamados de interferentes endócrinos (IE) (HIRAMATSU et al., 2005) podem atuar nos organismos de diferentes formas: I) imitando os efeitos dos hormônios endógenos; II) antagonizando os efeitos dos hormônios endógenos; III) interrompendo a síntese e o metabolismo de hormônios endógenos, ou IV) perturbando a síntese dos receptores de hormônios específicos, levando à desregulação do sistema endócrino em múltiplos níveis nos organismos expostos (ARIS et al., 2014; DZIEWECZYNSKI; HEBERT, 2013), alguns pesquisadores ainda afirmam que qualquer elemento tóxico é capaz de causar efeitos tóxicos endócrinos secundários (PICKERING; SUMPTER, 2003).

Recentemente, o grupo químico de metais essenciais e não-essenciais, como o zinco (Zn) e o cádmio (Cd), respectivamente, tem sido apontados como poluentes potenciais para atuarem como IE (IAVICOLI; FONTANA; BERGAMASCHI, 2009). Tais elementos são facilmente assimilados por organismos aquáticos e são fortemente ligados ao sistema biológico por grupos sulfidríla de proteínas, ligação esta que altera a estrutura e as atividades enzimáticas de proteínas e causa efeitos tóxicos evidentes em todo o organismo (HODSON, 1988).

Alguns trabalhos avaliam endpoints relacionados a interferência endócrina de metais, como é o caso de Moreira (2010) que detectou alterações histológicas nas gônadas de machos de peixe (*Gymnotus carapo*) expostos a concentrações de Cd e a diminuição no número de ovos por fêmeas de *Mysidopsis juniae*, quando expostas a Zn (FIGUEIREDO et al., 2013). Além desses efeitos em animais, a exposição aos IEs está associada com a redução do sucesso reprodutivo, diminuição na taxa de sobrevivência, alteração na proporção sexual da prole, desenvolvimento de anomalias (teratogênese) e efeitos celulares e moleculares (AIT-AISSA et al., 2003). Tais efeitos vistos de forma individual, em escala laboratorial, podem refletir os efeitos em nível populacional, destacando-se os irreversíveis da capacidade reprodutiva, já relatados na literatura para uma variedade de peixes e animais selvagens (MPCA, 2008).

Porém, o sistema endócrino é complexo, envolvendo processos que operam em vários níveis de organização biológica e essa complexidade é frequentemente subestimada e simplificada pela avaliação de apenas anomalias reprodutivas e de desenvolvimento, levando a conclusões enviesadas sobre a causa de certos efeitos adversos. Devido a isso, diversos biomarcadores devem ser utilizados para uma avaliação mais realista dos efeitos dos IEs (COSTA et al., 2010).

Dessa maneira, os danos provocados pelos IEs são descritos na literatura com ênfase para espécies de peixes (nível individual) e um dos principais endpoint é a produção de vitelogenina (VTG) que é uma fosfolipoglicoproteína, precursora do vitelo (reserva energética nos ovos), sintetizada em todos vertebrados ovíparos e lançada do fígado para a corrente sanguínea para auxiliar no desenvolvimento de ovos (óvulos/oócitos) e posteriormente no desenvolvimento embrio-larval (WALLACE, 1985). Sua produção é controlada pelo hormônio 17β -estradiol, produzido principalmente em ovários em desenvolvimento (JONES et al., 2000), apresenta massa molecular variando entre 300kDa e 600kDa e é uma proteína que carrega tanto compostos lipídicos quanto iônicos (por exemplo, cálcio, zinco, cádmio, ferro, etc) (HIRAMATSU et al., 2006).

Por apresentar funções relacionadas à produção de ovos e propiciar alimento durante o desenvolvimento embrio-larval, machos e juvenis de peixes, apesar de possuírem o gene para produção de VTG, o mesmo é inativo e tal proteína não é, conseqüentemente, sintetizada (DENSLOW et al., 1999). Quando detectada a VTG nos organismos acima citados, há um indicativo de exposição e ação endócrina, portanto, trata-se de um biomarcador para exposição estrogênica (OECD, 2012c; ÖRN et al., 2003), tornando-se uma ferramenta útil para esta finalidade (WESTER et al., 2003). É importante destacar que tal biomarcador fornece informações precisas e rápidas sobre a atuação de IEs, no entanto, análises complementares de outros biomarcadores como as alterações morfológicas são requeridas para melhor compreensão da dinâmica da atuação de potenciais IEs (HIRAMATSU et al., 2006).

Para detecção da produção de VTG existem diversos métodos, entre eles hibridização “in situ”, imunohistoquímica (ELISA e western blot), cromatografia, Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR em tempo real) e histoquímica. Alguns são capazes de quantificar a VTG presente no fígado (ex.: cromatografia) e outros apenas detectam a presença ou ausência, como a histoquímica (VAN DER VEN et al., 2003).

Portanto, realizar a análise de VTG através de histoquímica torna-se uma alternativa viável para a detecção dessa alteração fisiológica, porque apresenta baixo custo e facilidade de realização. Além disso, pode-se observar alterações morfológicas pois está associada a realização da histologia do organismo, possibilidade essa que os outros métodos não fornecem, além de serem técnicas mais complexas de serem realizadas e mais caras.

Outro motivo para a recomendação da análise de VTG por histoquímica é a preocupação com meio ambiente, isso porque a quantidade produzida de VTG não é o resultado mais importante e sim se ela está ou não sendo expressa em machos, sendo que qualquer sinal de sua produção em machos é um indicativo de interferência endócrina e seu potencial efeito na reprodução, colocando em risco a espécie em questão e consequentemente o equilíbrio ecológico.

Portanto a presente pesquisa busca responder a duas principais questões: a) Concentrações permitidas por legislações nacional e internacional dos metais Cd e Zn demonstram potencial de interferência endócrina considerando-se a produção de VTG em machos de *D. rerio*?; b) o método de marcação histoquímico é um método eficiente para estudar efeitos estrogênicos em machos de *D. rerio*?

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Peixes e manutenção

Adultos de *D. rerio* obtidos de forma comercial no Pet Shop Águia de Ouro na cidade de Sorocaba/SP foram aclimatados e mantidos em condições laboratoriais controladas (ABNT, 2015), utilizando-se água de abastecimento público previamente filtrada (filtro de carvão ativado e por tela do tipo silk screen com abertura de malha de 25µm) e desclorada, alimentados um vez ao dia com ração comercial tetramim® com 97% de proteína bruta, “*add libitum*” e mantidos em temperatura de 26°C±1°C e fotoperíodo controlado de 12h:12h claro:escuro.

4.2.2 Substâncias químicas

Para o preparo das soluções de trabalho de Cd(II) e Zn(II) foi utilizado sulfato de Cd (CdSO₄.8/3H₂O, Dinâmica®, pureza 99% - 102%) e sulfato de Zn (ZnSO₄.7H₂O,

Dinâmica®, pureza 99% - 103%) respectivamente, sendo estudada somente a concentração do respectivo metal em cada sal.

4.2.3 Exposição

Machos e fêmeas adultos (entre 3 e 4 meses) de *D. rerio* foram submetidos a um teste de exposição crônica (21 dias; OECD, 2010 – adaptado para o tempo de exposição) em regime semi-estático (troca total da solução a cada 72 horas) aos metais Cd e Zn, em separado, para duas concentrações de Cd (1µg/L e 0,25µg/L) e duas concentrações de Zn (180µg/L e 120µg/L) permitidas pela legislação brasileira (BRASIL, 2005) e norte americana (USEPA, 1995 para o zinco e USEPA, 2001 para o cádmio) respectivamente. Além disso, um controle experimental foi montado com a água de cultivo, a partir de água de abastecimento (ABNT, 2015).

Para cada condição experimental e separados pelo sexo utilizou-se aquários de vidro (2L) recobertos com sacos plásticos descartáveis e 3 réplicas contendo 3 organismos-teste em cada (n=9) foram montados, mantendo-se as mesmas condições de cultivo descritas acima.

De acordo com instruções recebidas da Comissão de Resíduos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba/UNESP a solução-teste de cada troca foi descartada descartada como resíduo comum, decisão essa tomada pois as concentrações estudadas se enquadram dentro da legislação brasileira e são menores que as encontradas nos rios do Estado de São Paulo não acarretando em maiores prejuízos ao ambiente em comparação aos que já acontecem.

4.2.4 Análise histoquímica

Após exposição as concentrações testadas de Cd e Zn seis machos de cada condição experimental foram escolhidos aleatoriamente, sacrificados por introdução direta em álcool PA, a cabeça e a nadadeira caudal foram cortadas, retiradas e o restante fixado em formol 10% por 18 horas, seguindo-se a lavagem, desidratação e inclusão em parafina. Os cortes (4µm) foram obtidos com navalha de aço, em micrótomo (micron HM340E) e sofreram marcação histoquímica para VTG de acordo com metodologia proposta por Van der Ven et al., (2003), em duas etapas: 1- os cortes foram desparafinizados em séries graduadas de xilol e etanol e lavados em água destilada. As lâminas com os tecidos foram incubados em 10 mM/L de cloreto de ferro hexaidratado, por 1 hora (temperatura ambiente) para que as

fosfoproteínas presentes nas moléculas de VTG fiquem complexadas ao ferro III; 2- Coloração com o método de pearl's prussian blue, o qual cora o complexo de ferro (III) formado no passo 1 e confere tons de azul a VTG presente no fígado. Os procedimentos foram realizados de acordo com o Apêndice B e os tecidos analisados qualitativamente em microscópio óptico Zeiss – Scope A1.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de marcação histoquímica para detecção de VTG em organismos machos e conseqüentemente a detecção de efeito estrogênico de substâncias contaminantes é uma técnica descrita há mais de 10 anos no meio científico. Apesar do método não ser específico para detecção de VTG, leva vantagem pela alta concentração de grupos fosfato presente na mesma, sendo assim uma técnica recomendada (VAN DER VEN et al., 2003).

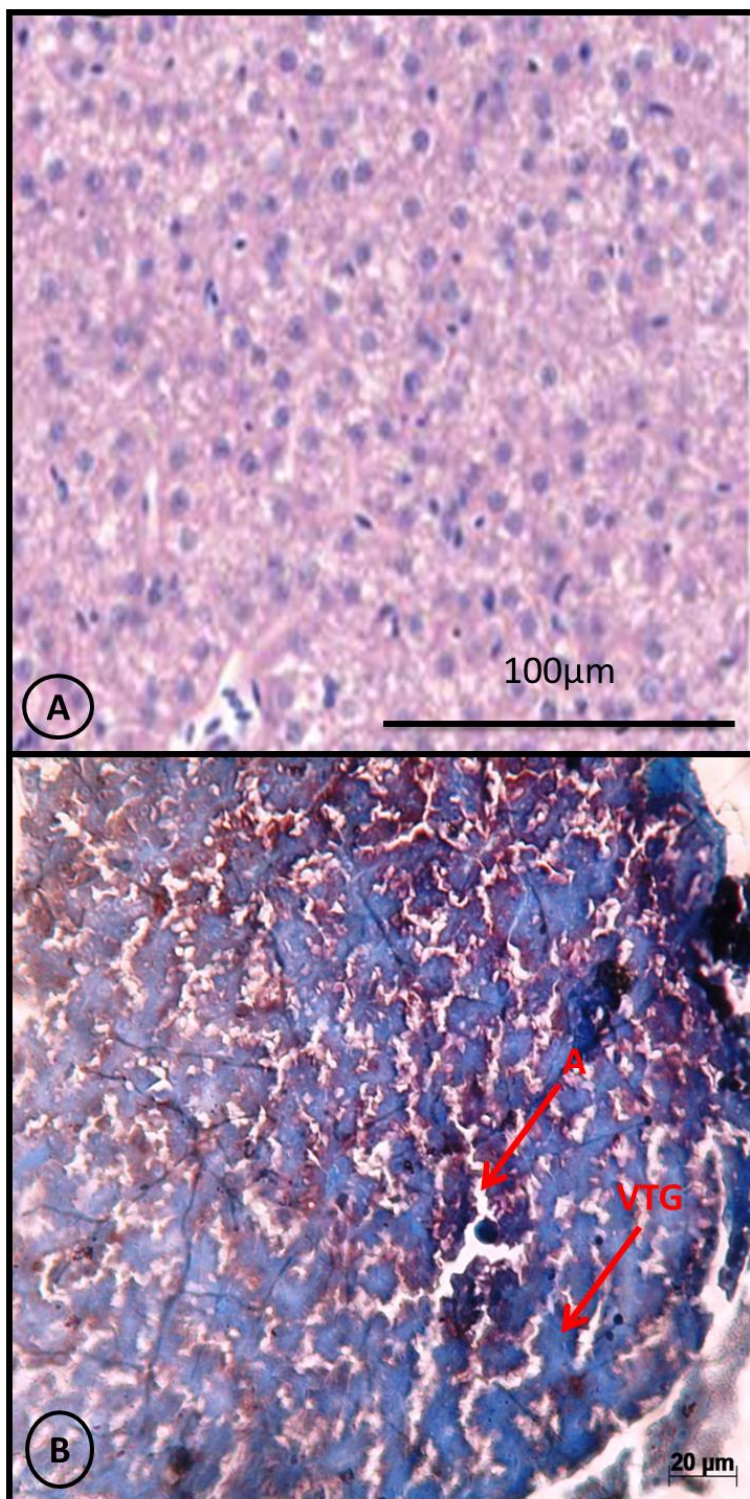
Como descrito na metodologia após método histoquímico a VTG secretada pelas células do fígado apresentar-se-á em tons de azul, dessa forma, pode-se observar na Figura 1 – A o controle de machos adultos de *D. rerio*, que normalmente não produzem VTG, a ausência de regiões em tons de azul, o contrário acontece com fêmeas (Figura 1 – B, controle) onde a produção de VTG é intensa para o auxílio na qualidade dos ovos e posterior desenvolvimento embrio-larval das próximas gerações e observa-se a dominância da cor azul na imagem.

Na seqüência, pode-se observar cortes de fígado de machos adultos de *D. rerio* expostos a concentrações testadas de Cd (0,25 µg/L de Cd - Figura 2 – A e 1 µg/L de Cd - Figura 2 – B), onde é possível observar a coloração azul, resultado da reação ocorrida pela técnica empregada, método histoquímico, comprovando a presença de VTG no fígado de machos de *D. rerio* causada pela exposição crônica ao Cd, em comparação aos controles, tanto macho (Figura 1 – A) quanto a fêmea (Figura 1 – B). O mesmo acontece com os organismos expostos as concentrações de Zn (120 µg/L de Zn - Figura 3 – A e 180 µg/L de Zn - Figura 3 – B) onde as imagens também demonstram secreções das células do fígado em tons de azul, indicando a produção de VTG pela influência a exposição ao Zn.

Conforme marcação e observação dos cortes (Figura 2 – A e B e Figura 3 – A e B), percebe-se que em todos os casos, desde a menor até a maior concentração estudada os metais Cd e Zn provocaram efeitos fisiológicos nos machos induzindo a produção de VTG, ou seja, um efeito endócrino no organismo que pode afetar a capacidade reprodutiva da

espécie e comprometer sua perpetuação, não apresentando diferença entre metais não-essenciais (Cd) e essenciais (Zn). Destaca-se ainda que as concentrações estudadas são permitidas no ambiente aquático por legislações para proteção da vida aquática, mas não preservam a integridade endócrina dos organismos. Dessa forma, o método histoquímico para marcação de VTG mostra-se de forma eficiente como um endpoint a ser analisado para detecção de substâncias com potencial atuação como IEs.

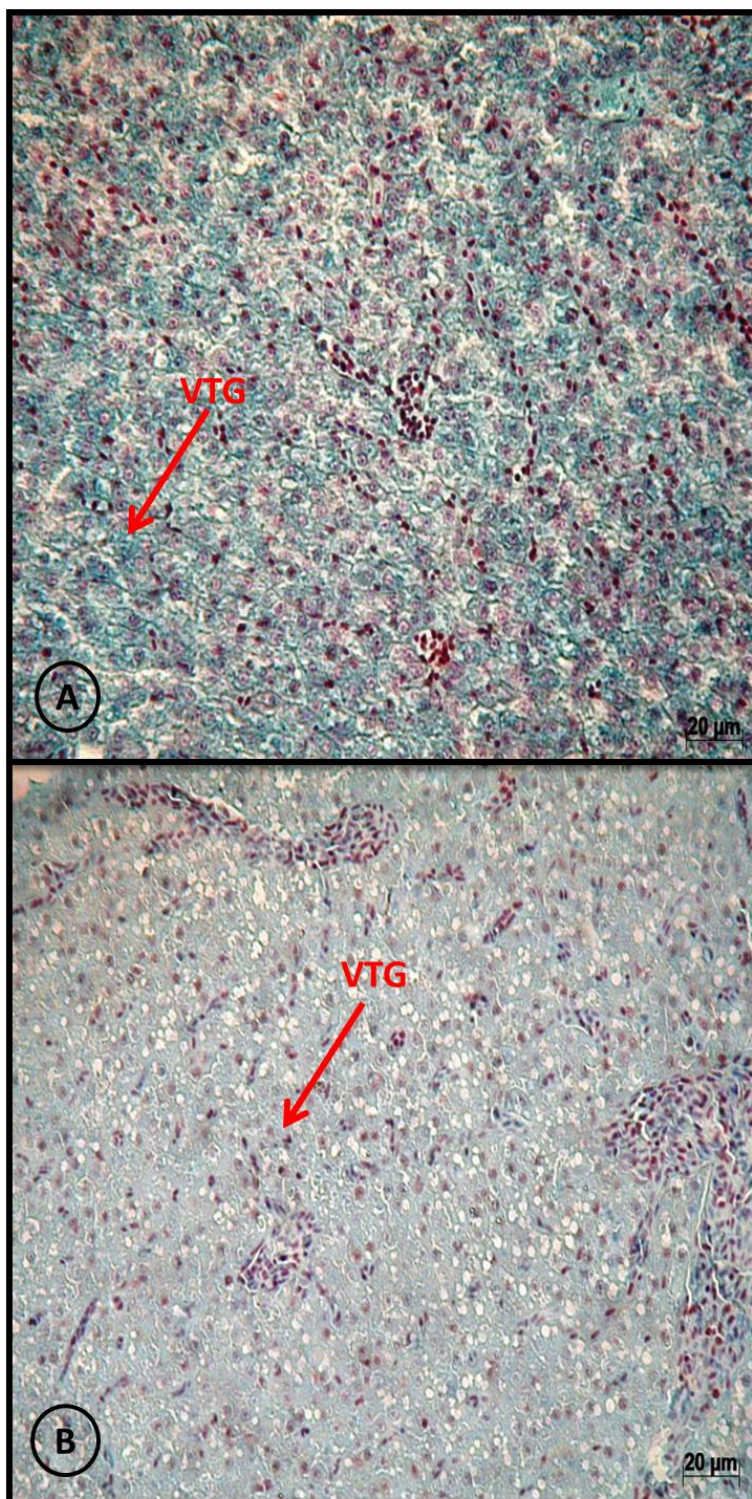
Figura 1 - Cortes histológicos de fígado controle de *D. rerio* após marcação histoquímica.



Fonte: (A) Van der Ven et al. (2003); (B) o autor.

Legenda: A) Fígado de macho controle (sem vitelogenina); B) Fígado de fêmea controle (presença abundante de vitelogenina); A – artefato da técnica provocado pela navalha de aço, VTG – vitelogenina.

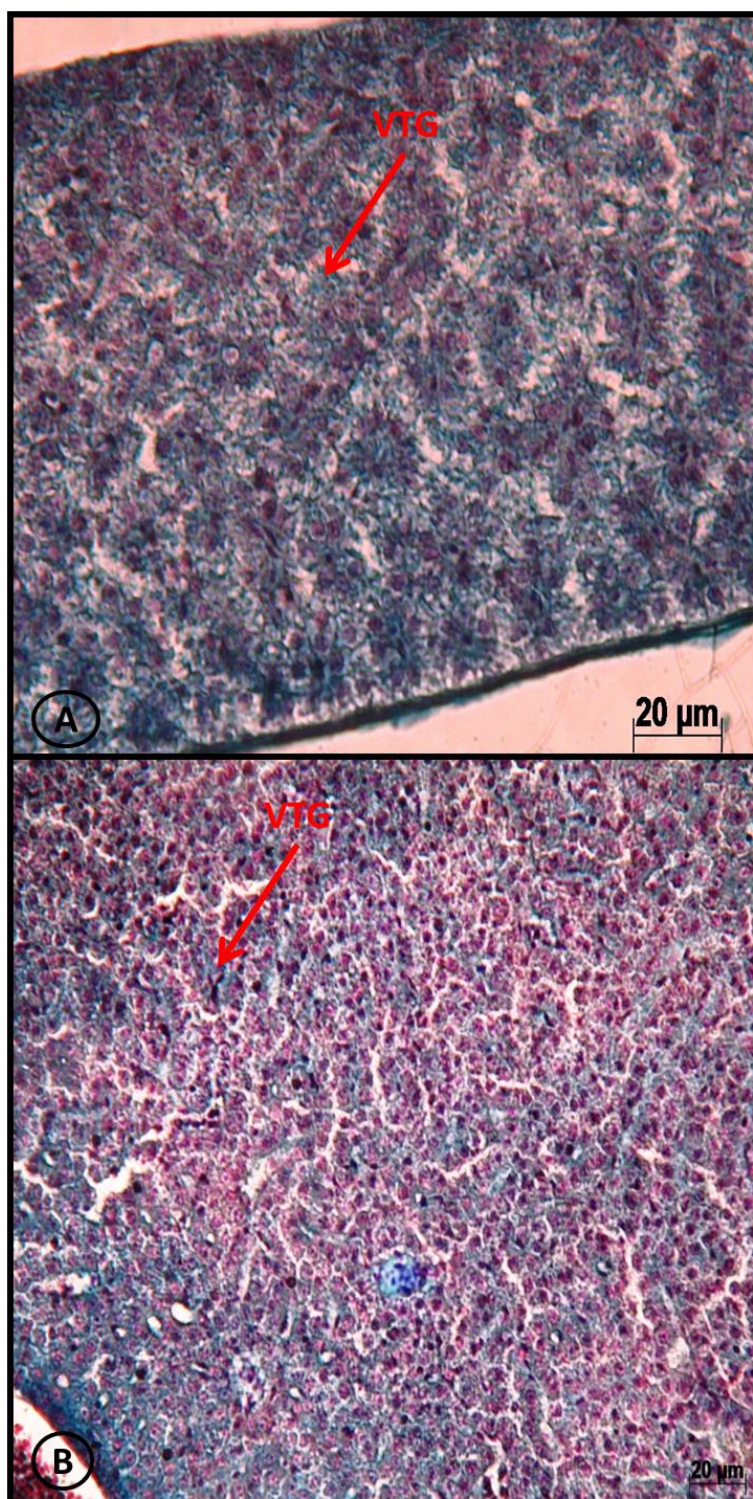
Figura 2 – Corte histológico de fígado de *D. rerio* exposto cronicamente ao cádmio.



Fonte: o autor.

Legenda: A) Fígado de macho exposto a 0,25 µg/L de cádmio B) Fígado de macho exposto a 1 µg/L de cádmio; VTG – vitelogenina.

Figura 3 – Corte histológico de fígado de *D. rerio* exposto cronicamente ao zinco.



Fonte: o autor.

Legenda: A) Fígado de macho exposto a 120 µg/L de zinco B) Fígado de macho exposto a 180 µg/L de zinco; VTG – vitelogenina.

A produção de VTG não foi apenas detectada em *D. rerio*, mas também em outras espécies de organismos aquáticos. Falfushynska et al. (2016), através de quantificação por ELISA, detectou a produção de VTG em machos de rãs da espécie *Pelophylax ridibundus*, quando expostas a 100 µg/L de Zn durante 14 dias.

Comparando-se esses dados descritos com os resultados da presente pesquisa, a concentração de Zn testada e o tempo de exposição foram menores ao que *D. rerio* foi submetido, indicando não só a eficiência do método histoquímico, pois mesmo sem quantificar foi capaz de detectar a produção de VTG, como a necessidade de revisão dos valores permitidos em legislação para proteção da vida aquática, porque mesmo em baixas concentrações os elementos químicos são capazes de causar alterações endócrinas em diferentes espécies, detectadas através do mesmo endpoint (VTG) por diferentes métodos.

O cádmio também foi capaz de estimular a produção de VTG em peixes machos de *Rutilus rutilus*, quando injetados com 0,1, 0,5 e 2,5 mg de cloreto de Cd por quilograma de peso do peixe e os níveis de VTG analisados através de PCR em tempo real após 8 dias de exposição (GERBRON et al., 2015).

Além disso, peixes da espécie *Petroleuciscus esfahani*, capturados ao longo do rio Zayandeh Roud no Irã, através de PCR em tempo real, também foram detectados com a produção de VTG (GILANNEJAD et al., 2016), assim como em gônada e fígado de crocodilos (*Crocodylus niloticus*) coletados em uma fazenda de criação próximo ao rio Crocodile na África do Sul, também utilizando o método de PCR em tempo real (ARUKWE et al., 2016). Estudos ainda relacionam os dados de produção de VTG à alta concentração de poluentes orgânicos, entre eles os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e elementos metálicos no ambiente (água e sedimento).

Metais não induzem mudanças fisiológicas e conseqüentemente a produção de VTG apenas em vertebrados, como demonstrado por Hwang et al. (2010). Esses elementos também podem provocar a indução de VTG em invertebrados, copépodos da espécie *Paracyclopsina nana*, a partir de 24 horas de exposição a Cd (0,1 mg/L), cobre (0,4 mg/L) e arsênio (2 mg/L) quantificados através de PCR em tempo real e em larvas de *Chironomus riparius*, expostas por 96 horas a diferentes concentrações de Cd (0,2; 2 e 20 µg/L), onde os resultados também foram obtidos através de PCR em tempo real (PARK; KWAK, 2012).

Trabalhos que relatem a detecção de VTG por histoquímica são escassos na literatura científica, o que pode ser comprovado pela ausência dessa técnica nos trabalhos anteriormente citados (HWANG et al., 2010; PARK; KWAK, 2012; GERBRON et al., 2015; ARUKWE et al., 2016; FALFUSHYNSKA et al. 2016; GILANNEJAD et al., 2016), nos quais destaca-se o uso de ELISA e principalmente PCR em tempo real, formando uma lacuna de dados no meio científico, ressaltando a necessidade de pesquisas que abordem a utilização também dessa técnica para averiguação de efeito endócrino causado por metais para que.

Além disso, é possível a associar esta técnica com a avaliação de efeitos histológicos, possibilitando em uma única técnica a verificação de respostas fisiológicas e morfológicas frente a exposição a um contaminante ambiental, reforçando a possibilidade de sua utilização em estudos que busquem concentrações seguras de químicos no ambiente para a proteção da vida aquática. (ZHONG et al., 2014).

4.4 CONCLUSÕES

Através dos resultados conclui-se que mesmo em concentrações permitidas em legislação para proteção da vida aquática Cd e Zn são capazes de provocar efeitos fisiológicos induzindo a produção de VTG no fígado de machos de *D. rerio*, comprovando a atuação dos referidos metais como interferentes endócrinos, podendo assim, afetar a capacidade reprodutiva da espécie.

Dessa forma fica claro que o método por marcação histoquímica é um método eficiente para detecção de efeito estrogênico em machos de *D. rerio* e pode ser utilizado como um endpoint em pesquisas ambientais que visem a proteção da vida aquática e auxilie órgãos governamentais na tomada de decisões e reestruturações na legislação para a permissão de concentrações de contaminantes ambientais mais restritivos no ambiente garantindo a integridade endócrina dos organismos aquáticos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo inicial desse trabalho foi responder a duas questões principais e ao final das avaliações é possível dizer que o mesmo foi alcançado com sucesso. Quanto aos testes realizados, iniciamos pelo uso da técnica de dessorção que é a proposta de metodologia para auxílio em testes laboratoriais visando determinar a concentração real de incorporação de contaminantes pelo organismo que pode ser capaz de provocar efeitos tóxicos. A mesma mostrou-se como uma possível ferramenta quando utilizada com Cd e Zn em *D. rerio*, recomendando-se a realização de tal metodologia com outros elementos. Na sequência, o FBC trouxe resultados importantes, mostrando que Zn é mais incorporado pelo organismo do que Cd, mas em contrapartida Zn se incorpora de maneira inversamente proporcional a concentração de exposição, o que pode ser um fator de influência na toxicidade do elemento.

Para avaliar os efeitos causados por Cd e Zn em *D. rerio* exposto crônicamente a concentrações de Cd e Zn permitidas por legislação nacional e internacional para a proteção da vida aquática foi realizada análise morfológica de gônada e fígado de machos e fêmeas através de observações histológicas. Observou-se que as concentrações permitidas por legislação de Cd e Zn são capazes de causar efeitos tóxicos proporcionais a concentração de exposição em gônadas de fêmeas expostas crônicamente, afetando o desenvolvimento gonadal e possivelmente a reprodução, diferentemente de gônadas de machos que apresentaram apenas regiões pontuais em degeneração, que parecem não interferir no desenvolvimento gonadal, mas caso a exposição se prolongue as alterações podem aumentar e gerar danos no desenvolvimento e no sucesso reprodutivo

O fígado de *D. rerio* foi o órgão que mais sofreu com a exposição a Cd e Zn, sendo as alterações mais pronunciadas nos organismos expostos ao Zn, os quais apresentaram necrose evidente do tecido hepático, comprometendo o funcionamento do órgão. Nesse momento, a bioconcentração de Zn que ocorreu de forma inversamente proporcional a concentração de exposição não causou modificações significativas quanto as análises histológicas, uma vez que quanto maior a concentração de exposição, mais alterações foram observadas.

A última análise realizada foi a detecção de VTG em fígado de machos de *D. rerio* através de marcação histoquímica, na qual evidencia-se a capacidade de Cd e Zn

provocarem alterações fisiológicas nos organismos, induzindo os machos a produção de VTG, resultado de interferência endócrina, colocando em risco a reprodução da espécie. Assim, a análise de VTG, por marcação histoquímica, mostrou-se como um endpoint adequado para detecção de possíveis IE.

Com o conjunto de análises apresentado fica claro que as concentrações de Cd e Zn permitidas por legislação nacional e internacional não asseguram a integridade endócrina de *D. rerio*, assim como evidencia o potencial de tais metais atuarem como IE no organismo em questão.

Dessa forma, as análises de FBC, histologia (gônada e fígado) e histoquímica (fígado de machos), além de formarem um conjunto diferenciado de respostas biológicas para detecção de substâncias com possível atuação como IE também formam um conjunto de parâmetros biológicos adequado para o mesmo propósito.

Portanto, recomenda-se uma revisão das legislações para proteção da vida aquática para abordarem valores permissíveis mais restritivos e que sejam baseados não somente em testes de sobrevivências, mas também em outros testes e análises, como por exemplo, aqueles apresentados neste trabalho, garantindo além da sobrevivência a integridade endócrina das espécies, preservando-as e mantendo o equilíbrio ecológico.

Por fim, sugere-se que seja realizadas pesquisas com concentrações menores que a utilizada no presente estudo até que o efeito do(s) metal(is) em questão não seja observado, sendo essa então a concentração recomendada ambientalmente, levando em consideração, além da sobrevivência e integridade endócrina e biológica do organismo.

APÊNDICE A – PROCEDIMENTOS BÁSICOS PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE DESSORÇÃO DE METAIS DA PARTE EXTERNA DE *DANIO RERIO*

Destaca-se que de acordo com cada metal o tempo de dessorção pode variar, por isso recomenda-se a realização de um teste piloto para determinação do tempo ideal de banho ácido de acordo com o metal estudado. Dessa forma fica garantida a remoção do mesmo da parte externa do organismo.

Para realização do teste de dessorção os seguintes passos devem ser seguidos:

Passo	Procedimento
1	Exposição dos organismos
2	Sacrifício dos organismos (introdução direta no ácido)
3	Retirada dos organismos do ácido
4	Armazenamento da solução ácida para posterior leitura e construção da curva
5	Realização da digestão dos organismos
6	Leitura da concentração de metal incorporada pelo organismo
7	

Observações:

- 1) Para o teste piloto o tempo de exposição deve ser o mesmo utilizado entre as trocas no teste de exposição definitivo;
- 2) A retirada dos organismos para o teste final deve ser feita de acordo com o tempo obtido no teste piloto;
- 3) O passo de número 4 deve se apenas realizado no teste piloto;

Ressalta-se ainda que inicialmente o teste foi proposto pensando em *Danio rerio*, mas pode ser adaptado para outros peixes utilizados como modelo experimental em testes ecotoxicológicos laboratoriais.

APÊNDICE B – PROCEDIMENTOS PARA MARCAÇÃO HISTOQUÍMICA DE VITELÓGENINA (VTG)

Antes de iniciar o procedimento as lâminas com os cortes devem ser levadas e estufa histológica a 60°C por mais ou menos 20 minutos.

Utilizar cortes de fígado de aproximadamente 4µm, quanto mais espesso o corte mais difícil da coloração adentrar e isso resultará em modificações nos procedimentos a seguir.

Após retirar da estufa seguir os procedimentos abaixo:

Passo	Procedimento	Tempo
1	Xilol 1	2 min
2	Xilol 2	2 min
3	Álcool PA 1	10X
4	Álcool PA 2	10X
5	Solução de Cloreto de Fe hexahidratado (10 mM/L)	60 min
6	Água	15X
7	Solução Prussin Blue	10 min
8	Água	10X/3min
9	Solução de vermelho neutro	1 min
10	Água	~1min
11	Álcool PA 1	15X
12	Xilol 1	15X
13	Montar	

OBSERVAÇÕES:

1 – A solução de cloreto de ferro pode ser preparada no dia anterior, manter em frasco âmbar. **Solução tóxica, não** descartar na pia.

2 – Solução Prussian Blue, misturar em quantidades iguais as soluções A e B. As soluções A e B podem ser preparadas no dia anterior e obrigatoriamente guardadas em frasco âmbar.

Solução A – Ferrocianeto de potássio (2%)

10g de ferrocianeto de potássio em 500ml de água destilada

Solução B – Ácido clorídrico (2%)

10 ml de HCl concentrado em 500ml de água destilada

Solução tóxica, não descartar na pia.

3 – Solução de vermelho neutro

Vermelho neutro (cc 50040 – 75%)	1,0g
Água destilada	100ml
Ácido glacial acético	1,0ml

A solução de vermelho neutro pode ser preparada no dia anterior e obrigatoriamente estocada em frasco âmbar.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-WARITH, A. A. Effect of zinc toxicity on liver histology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Scientific Research and Essays**, v. 6, n. 17, p. 3760-3769, 2011.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2015. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes**. ABNT-NBR 15499. Rio de Janeiro. 23p.
- ADAL, A.; WIENER, S. W. Heavy metal toxicity. **Medscape**. 2014. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/814960-overview>>. Acesso em 03 dez 2014.
- AHMED, Q. et al. Concentrations of heavy metals in *Sardinella gibbosa* (Bleeker, 1849) from the Coast of Balochistan, Pakistan. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 95, p. 221–225, 2015.
- AIT-AISSA, S. et al. Biomarkers responses in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after single and combined exposure to low doses of cadmium, zinc, PCB77 and 17beta-estradiol. **Biomarkers**, v. 8, n.6, p. 491-508, 2003.
- ALBÈ, M. **Non solo bisfenolo a**: la "sporca dozzina" degli interferenti endocrini. 2013. Disponível em: <<http://www.greenme.it/vivere/salute-e-benessere/11718-bisfenolo-a-peggiori-interferenti-endocrini>>. Acesso em: 07 fev. 2014.
- ALMEIDA, F. L. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.174-180, abr./jun, 2013.
- AMEL, H. C.; MYRIAM, I. deleterious effects of estrogenic endocrine disruptors on marine organisms: histological observed effects and some novel useful monitoring bioassays. **Journal of the Persian Gulf**, v.1, n.2, p.23-32, 2010.
- AMÉRICO, J. H. P. et al. Desreguladores endócrinos no ambiente e seus efeitos na biota e saúde humana. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 17 – 34, 2012.
- ANDERSON, R. L. et al. Survival and growth of *Tanytarsus dissimilis* (Chironomidae) exposed to copper, cadmium, zinc, and lead. **Arch. Environm. Contam. Toxicol**, Vancouver, v. 9, p. 329-335, 1980.
- ANDRADE-RIBEIRO, A. L. F. A. et al. Disruptores endócrinos: potencial problema para la salud pública y medio ambiente. **Revista Biomed**, Yucatán, v. 17, n. 3, p. 146 – 150, 2006.
- ANKLEY, G. T.; JOHNSON, R. D. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. **ILAR Journal**, v. 45, n. 4, p. 469-483, 2004.
- ARAÚJO, F. G. **Ácidos graxos dietéticos em parâmetros reprodutivos de zebrafish (*Danio rerio*)**. 104 f. Tese (Doutorado em zootecnia). Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- ARENZON, A. et al. A determinação da toxicidade crônica para peixes baseada apenas na sobrevivência é suficiente? **Ecotoxicol. Environ. Contam.**, São Carlos, v. 8, n. 2, p. 65-68, 2013.

- ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. **Environment International**, v. 69, p. 104-119, 2014.
- ARMILATO, N. **Toxicidade celular e bioquímica do glifosato sobre os ovários do peixe *Danio rerio***. 88 f. Tese (Doutorado em biologia celular e do desenvolvimento). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- ARUKWE, Developmental alterations and endocrine-disruptive responses in farmed Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) exposed to contaminants from the Crocodile River, South Africa. **Aquatic Toxicology**. 2016. doi:10.1016/j.aquatox.2015.12.027
- ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for Zinc**. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp60.pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2015.
- ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological Profile for Cadmium**. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2015.
- BABY, J. et al. Toxic effect of heavy metals on aquatic environment. **Int. J. Biol. Chem. Sci.**, Dschang, v. 4, n. 4, p. 939-952, 2010.
- BAIS, U. E.; LOKHAND, M. V. Effect of cadmium chloride on histopathological changes in the freshwater fish *Ophiocephalus striatus* (Channa). **International Journal of Zoological Research**, Nova Iorque, v. 8, n. 1, p. 23 – 32, 2012.
- BASTAMI, K. D. et al. Bioaccumulation and ecological risk assessment of heavy metals in the sediments and mullet *Liza klunzingeri* in the northern part of the Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 94, n. 1–2, p. 329–334, 2015.
- BEDWAL R. S.; BAHUGUNA A. Zinc, copper and selenium in reproduction. **Experientia**, v. 50, n. 7, p. 626-640, 1994.
- BERGMAN, A. et al. (ed.). **State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: summary for decision makers**. Geneva: united nations environment programme and the world health organization, 2013. 38 p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78102/1/who_hse_phe_ihe_2013.1_eng.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2014.
- BHATIKAR, N. V. Chromium, nickel and zinc induced histopathological alterations in the liver of Indian common carp *Labeo rohita* (Ham.). **J. Appl. Sci. Environ., Manage**, v. 15, n. 2, p. 331 – 336, 2011.
- BIANCHINI, A.; MARTINS, E. S.; JORGE, M. B. O modelo do ligante biótico e suas aplicações em ecotoxicologia. **Divulgação Científica**. Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia. Rio Grande. 34 p. 2009. Disponível em: <<http://www.inct-ta.furg.br/english/difusao/BLMM.pdf>>. Acesso em 06 dez 2014.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, São Paulo., v. 30, n. 3. p. 651 – 666, 2007.

BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de Agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm>. Acesso em: 08 mar. 2016.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n 53., 18 mar. 2005. p. 58-63. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 08 mar. 2016.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 430/2011 - "Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n. 92, 16 mai. 2011. p. 89-98. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 08 mar. 2016.

BRITO, N. R. B. **Efeito de metais pesados na alga *Pseudokirchneriella subcapitata***. 2011. 53 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, 2011.

BRAICH, O. S.; JANGU, S. Some aspects of reproductive biology on effect of heavy metal pollution on histopathological structure of gonads in *Labeo rohita* (Hamilton-Buchanan) from Harike wetland, India. **International Journal of Fisheries and Aquaculture**. v. 7 n. 2, p. 9-14, 2015.

BRUSLÉ, J.; ANADON, G. G. The structure and function of fish liver. In: DATTA-MUNSHI, J. S. D.; DUTTA, H. M. (eds). **Fish Morphology: horizon os new research**. A. A. Belkama Publisher: Brookfield, 1996, p. 77 – 94, Cap. 6.

BURATINI, S. V.; BRANDELLI, A. bioacumulação. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (eds). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos RiMa editora., 2006, p. 55 – 88, Cap. 4.

BURKHARDT-HOLM, P. Endocrine disruptors and water quality: a state-of-the-art review. **International Journal of Water Resources Development**, Londres, v. 26, n. 3, p. 477-493, 2010.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Defining hormesis. **Human & Experimental Toxicology**. v. 21, p. 91 – 97. 2002. Disponível em: <<http://het.sagepub.com/content/21/2/91.full.pdf+html>>. Acesso em: 11 dez 2014.

CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. B. Metals and hormesis. **J. Environ. Monit.** v. 6, p. 14N-19N. 2004. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2004/em/b400468j>>. Acesso em: 11 dez 2014.

CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. B. Metals and hormesis. **J. Environ. Monit.** v. 6, p. 14N-19N. 2004. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2004/em/b400468j>>. Acesso em: 11 dez 2014.

CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. B. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. **Regulatory Toxicology and Pharmacology.** v. 61, p. 73–81. 2011.

CALIMAN, F. A.; GAVRILESCU, M. Pharmaceutichals, personal care products and endocrine disrupting agents in the enviroment – a review. **Clean**, v. 37, n. 4-5, p.277 - 303, 2009.

CAS – A Division of the American Chemical Society. **CAS REGISTRY 100 Millionth Fun Facts.** 2015 Disponível em: <<http://www.cas.org/content/chemical-substances/cas-registry-100-millionth-fun-facts>>. Acesso em: 02 mar. 2016.

CASTRO, S. V. **Efeitos de metais pesados presentes na água sobre a estrutura das comunidades bentônicas do alto Rio das Velhas-MG.** 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2006.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Cádmio e seus compostos.** Ficha de Informação Toxicológica. Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental. 2012a. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/cadmio.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Zinco.** Ficha de Informação Toxicológica. Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental. 2012b. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/zinco.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2014.

CHACON, D. M. M.; LUCHIARI, A. C. **Fisiologia e Comportamento de Peixes.** Grupo de Estudos de Ecologia e Fisiologia de Animais Aquáticos. 2011. Disponível em: <http://www.geefaa.com/fisiologia_peixes.php>. Acesso em: 24 mar. 2016.

CHANDRAN, R. et al. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 140, p. 422 – 426, 2005.

CHEN, T. H. et al. Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Hazardous Materials**, v. 277, p. 34 -140, 2014.

CHICHIZOLA, C. Disruptores endócrinos. efectos en la reproducción. **Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo**, Buenos Aires, v. 40, n. 3, p. 172 – 188, 2003.

CIJI, P. P.; NANDAN, S. B. Toxicity of copper and zinc to *Puntius parrah* (Day, 1865). **Marine Environmental Research**, v. 93, p. 38–46, 2014.

CONNOLLY, M. H. Et al. Temporal dynamics of oocyte growth and vitellogenin gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 11, n. 2, p. 107-114, 2014.

- CONNOR, K.; PETERSON, D. Endocrine disruptor compounds. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. 2012. Disponível em: <<http://www.setac.org/blogpost/784751/141080/Endocrine-Disrupting-Compounds>>. Acesso em: 03 dez. 2015.
- COSTA, D. D. M. et al. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 151, n. 2, p. 248–257, 2010.
- CRETON, S. et al. Reducing the number of fish in bioconcentration studies for plant protection products by reducing the number of test concentrations. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1300–1304, 2013.
- CRISP, T. M. et al. Environmental Endocrine Disruption: Na Effects Assessment and Analysis. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 106, n. 1, p. 11 -56, 1998.
- DAS, S.; GUPTA, A. cadmium induced histopathological changes in the intestine of Indian Flying Barb, *Esomus danricus*. **Current World Environment**, Madhya Pradesh, v. 8, n. 2, p. 305-308, 2013.
- DAS, S.; KHANGAROT, S. B. Bioaccumulation and toxic effects of cadmium on feeding and growth of an Indian pond snail *Lymnaea luteola* L. under laboratory conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, n. 1–3, p. 763–770, 2010.
- DAVIES, R. P.; DOBBS, A. J. The prediction of bioconcentration in fish. **Water Research**, v. 18, n. 10, p. 1253-1262, 1984.
- DEB, S. C. Metals in aquatic ecosystems: mechanisms of uptake, accumulation and release-ecotoxicological. **International Journal of Environmental Studies: Sections A & B**, v. 56, n. 3, p. 385-417, 1999.
- DENIER, X. et al. Estrogenic activity of cadmium, copper and zinc in the yeast estrogen screen. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 4, p. 569–573, 2009.
- DENSLOW, N. D. et al. Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. **Ecotoxicology**, Boston, v. 8, p. 385-398, 1999.
- DIAMANTI-KANDARAKIS E et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p. 293-342, 2009.
- DNRPWTD - DEPARTMENT OF NATURAL RESOURCES AND PARKSWASTEWATER TREATMENT DIVISION. Endocrine disrupting chemicals in the environment. 2007. Disponível em: <<http://www.kingcounty.gov/~media/services/environment/wastewater/education/docs/things-you-can-do/0710EDCFactBroch.ashx?la=en>>. Acesso em: 03 dez 2014.
- DOAA, M. M.; HANAN, H. A. E. Histological Changes in Selected Organs of *Oreochromis niloticus* Exposed to Doses of Lead Acetate. **J. Life Sci. Biomed.** v. 3, n. 3, P. 256-263, 2013.

DOBREVA, V.; TSEKOV, A.; VELCHEVA, I. Study of the effect of zinc on gill functions of the crucian carp *Carassius Gibelio* bloch. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 14, n. 2, p. 182-185, 2008.

DUMITRESCU, G. et al. histological changes induced in gonads, liver and kidney of zebrafish (*Danio Rerio*) under the effect octylphenol (OP). *Animal Science and Biotechnologies*, v. 43, n. 1, p. 484-489, 2010.

DYER, C. A. Heavy metals as a endocrine-disrupting chemicals. In: GORE, A. C. (eds). **Endocrine-Disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice**. [s. l.]: Springer, 2007, pp. 111 – 133. Cap. 1.

DZIEWECZYNSKI, T. L.; HEBERT, O. L. The effects of short-term exposure to an endocrine disrupter on behavioural consistency in male juvenile and adult Siamese fighting fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 64, p. 316–326, 2013.

EIFAC - EUROPEAN INLAND FISHERIES ADVISORY COMMISSION. **Report on cadmium and freshwater fish**. 1ed. Food and agriculture organization of the United Nations: Rome. 1977. 21p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/017/ap672e/ap672e.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2015.

EL-MORSHEDI, N. et al. Effect of Heavy Metal Pollutants on Fish Population in two Egyptian Lakes. **International Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 1, p. 408-417, 2014.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H. AYKIN-BURNS, N., Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metalinduced oxidative damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 6, p. 529-539, 2001.

ESTEVEES, F. A., GUARIENTO, R. D. Elementos-traço. In: ESTEVEES, F. A. (coord), **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. p. 323 – 337, Cap. 18.

FALFUSHYNSKA, H. et al. Endocrine activities and cellular stress responses in the marsh frog *Pelophylax ridibundus* exposed to cobalt, zinc and their organic nanocomplexes. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 62-71, 2016.

FATIMA, M.; USMANI, N.; HOSSAIN, M. M. Heavy Metal in Aquatic Ecosystem Emphasizing its Effect on Tissue Bioaccumulation and Histopathology: A Review. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2014.

FERNICOLA, N. A. G. G.; BOHRER-MOREL, M. B. C.; BAINY, A. C. D. Ecotoxicologia. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (coord.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**, São Carlos: Rima editora, 2004. p. 221 – 244, Cap. 7.

FIGUEIREDO, L. P. et al. Avaliação da fecundidade como parâmetro de toxicidade crônica em *Mysidopsis juniae*. **Natural Resources**, Aquidabã, v.3, n.2, p. 28. 2013.

FONTENELE, E. G. P. et al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 6 – 16, 2010.

GAO X.; CHEN C. T. A. Heavy metal pollution status in surface sediments of the coastal Bohai Bay. **Water Resources**, v. 46, n. 6, p. 1901-1911, 2012.

GARCIA-SANTOS, S. et al. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.59, n.2, p. 376-381, 2007.

GAUTAM R. K. et al. Contamination of heavy metals in aquatic media: transport, toxicity and technologies for remediation. In: SHARMA, S. K. (ed). **Heavy metals in water: presence, removal and safety**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2014. Cap 1, p. 1–24.

GEORGESCU, B. et al. Heavy metals acting as endocrine disrupters. **Journal of Animal Science and Biotechnologies**, Londres, v. 44, n. 2, p. 89 – 93, 2011.

GERBRON, M. et al. In vitro and in vivo studies of the endocrine disrupting potency of cadmium in roach (*Rutilus rutilus*) liver. **Marine Pollution Bulletin**, v. 95, n. 2, p. 582–589, 2015.

GILANNEJAD, N. et al. Vitellogenin expression in wild cyprinid *Petroleuciscus esfahani* as a biomarker of endocrine disruption along the Zayandeh Roud River, Iran. **Chemosphere**, v. 144, p. 1342–1350, 2016.

GIRI, S.; SINGH, A. K. Metals in some edible fish and shrimp species collected in dry season from Subarnarekha river, India. **Bull Environ Contam Toxicol**, Vancouver, v. 95, n. 2 p. 226 -233, 2015.

GOERING, P. L.; WAALKS, M. P.; KLAASSEN, C. D. Toxicology of cadmium. In: GOYER, R. A.; CHERIAN, M. G. (Eds). **Toxicology of metal: biochemical aspects**. Berlin: Springer, 1995, p. 189-214, Cap. 9.

GOHER, M. E. et al. Evaluation of surface water quality and heavy metal indices of Ismailia Canal, Nile River, Egypt. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 40, n. 3, p. 225–233, 2014.

GOMES, L. V. et al. Acute toxicity of copper and cadmium for piauçu, *Leporinus macrocephalus*, and curimatã, *Prochilodus vimboides*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 313-315, 2009.

GORE, A. C. et al. Introduction to endocrine disrupting chemicals (EDCs): a guide for public interest organizations and policy-makers. Whashington: Endocrine Society, 2014, 69 p.

GUARDIOLA, F. A. et al. Accumulation, histopathology and immunotoxicological effects of waterborne cadmium on gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 3, p. 792–800, 2013.

HACON, S. S. Avaliação e gestão de risco ecotoxicológico à saúde humana In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (coord.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**, São Carlos: Rima editora, 2004. p. 244 - 322, Cap. 8.

HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2 ed. Florida: Lewis Publisher. 1995. 373p.

- HINTON, D. E. Cells, Cellular Responses and their Markers on Chronic Toxicity of Fishes. In: MALINS, D.C.; OSTRANDER, G.K. (Eds.). **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994, p. 207-239.
- HIRAMATSU N., et al. Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. **Marine Biology**, v. 149, n. 1, p. 35-47, 2006.
- HIRAMATSU, N. et al. Vitellogenesis and endocrine disruption. In: MOMMSEN, T. P.; MOON, T. W. (eds). **Biochemistry and molecular biology of fishes** Amsterdam: Elsevier, Amsterdam, 2005, p. 431-471, Cap. 16.
- HODSON, P. V. The effect of metal metabolism on uptake, disposition and toxicity in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 11, n. 1-2, p. 3-18, 1988.
- HSEU, Z. Y. Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods. **Bioresour Technol**, v. 95, n. 1. p. 53-59, 2004.
- HWANG, D. S. et al. Molecular characterization and expression of vitellogenin (Vg) genes from the cyclopoid copepod, *Paracyclops nana* exposed to heavy metals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, n. 3, p. 360–368, 2010.
- Iavicoli, I.; Fontana, L.; Bergamaschi, A. The effects of metals as endocrine disruptors. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Londres, v. 12, n. 3, p 206 – 223, 2009.
- ICZ – Instituto de Metais Não-Ferrosos. **O zinco e o meio ambiente**. 2014. Disponível em: <<http://www.icz.org.br/zinco-meio-ambiente.php>>. Acesso em: 21 fev. 2014
- IDRISS, A. A.; AHMAD, A. K. Heavy metal concentrations in fishes from Juru river, estimation of the health risk. **Bull Environ Contam Toxicol**, Vancouver, v. 94, p. 204–208, 2015.
- IHARA, P. M.; PINHO, G. L. L.; FILLMAN, G. Avaliação do copépodo *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como organismo-teste para ensaios de toxicidade crônica. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, São Carlos, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2010.
- IZA – International Zinc Association. **Zinc in the Environment**. 2014. Disponível em: <<http://www.zinc.org/environment/>>. Acesso em: 23 nov. 2015
- JIMÉNEZ-ORTEGA, V. Cadmium as an endocrine disruptor: correlation with anterior pituitary redox and circadian clock mechanisms and prevention by melatonin. **Free Radic Biol Med.**, v. 53, n. 12, p. 2287–2297, 2012.
- JONES, P. D. et al. Vitellogenins as a biomarker for environmental estrogens. **Australian Journal of Ecotoxicology**, v. 6, n. 5, p. 45-58, 2000.
- JOVIČIĆ, K. et al. Mapping differential elemental accumulation in fish tissues: assessment of metal and trace element concentrations in wels catfish (*Silurus glanis*) from the Danube river by ICP-MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3820-3827, 2015.

JULA, T. F. Environmental aspects of heavy metal toxicity. **Boston College Environmental Affairs Law Review**, Boston, v. 1, n. 1, p. 74 – 89, 1971.

KATZ, M. The effects of heavy metals on fish and aquatic organisms. In: KRENKEL, P. A. (Eds). **Heavy Metals in the Aquatic Environment**. Nesheville:, 1973, p. 25-30, Cap. 1.4.

KAVLOCK, R. J. et al. Research needs for the risk assessmen of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. **Environmental Health Perspectives**, Durham, v. 104, n. 4, p. 715 -740, 1996.

KELLOCK, K. A. **Investigation of the occurrence of endocrine disruption in fish and associated factors for lentic waters of Georgia, USA**. 137 f. Tese (Doutorado em filosofia). Universidade da Georgia, Athens, 2013.

KENDALL, R.J; BROUWER, A.; GIESY, J.P. A risk-based field and laboratory approach to assess endocrine disruption in wildlife. In: Kendall, R. et al. (Eds). **Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruption in Wildlife**. [s. l.]: Society of Environmental Toxicology and chemistry (SETAC). 1998, pp.1-16.

KORTENKAMP, A. Are cadmium and other heavy metal compounds acting as endocrine disrupters?. **Met Ions Life Sci.**, v. 8, p. 305-317, 2011.

LIU, G. D. et al. Glutathione peroxidase 1 expression, malondialdehyde levels and histological alterations in the liver of *Acrossocheilus fasciatus* exposed to cadmium chloride. **Gene**, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111915015309>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

LOGONATHAN, K. et al. Zinc induced histological changes in brain and liver of *Labeo rohita* (Ham.). **Journal of Environmental Biology**. Vikas Nagar, v. 27, n. 1, p. 107-110, 2006.

LUO, Y. et al. Subchronic effects of cadmium on the gonads, expressions of steroid hormones and sex-related genes in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology**, v.24, p.2213–2223, 2015.

MAGAR R.S.; BIAS U.E. Histopathological Impact of Malathion on the Ovary of the Fresh Waterfish *Channa punctatus*. **International Research Journal of Environment Science**, v. 2, n. 3, p.59-61, 2013.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Local, v. 15, n., p. 75–88, 2005.

MASSABNI, A. C. **Os metais e a saúde humana**. 2006. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/quimica_viva__os_metais_e_a_saude_humana>. Acesso em 08 mar. 2016.

MENDEZ, F. M. N. **Estudo dos efeitos dos elementos traços presentes nas partículas provenientes da queima do diesel no sistema reprodutivo *Danio rerio* (zebrafish): análise morfológica e histológica**. 87 f. Dissertação (Mestrado em endocrinologia).

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MERIDES, M.; FRACÁCIO, R. Estudo da atuação de zinco e cádmio: metais potencialmente tóxicos como desreguladores endócrinos em ensaio ecotoxicológicos com *Ceriodaphnia dubia*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 13, 2014. Guarapari. **Anais...** Guarapari: Ecotox 2014. 2014. 2p.

MILLS, L. J.; CHICHESTER, C. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? **Science of the Total Environment**, v. 343, n. 1-3, p. 1 – 34, 2005.

MISHRA, A. K.; MOHANTY, B. Histopathological Effects of Hexavalent Chromium in the Ovary of a Fresh Water Fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 80, p. 507–51, 2008.

MNIF, W. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. **Int J Environ Res Public Health**, v. 8, n. 6 p. 2265–2303, 2011.

MOREIRA, R. V. **Efeitos anatomopatológicos após contaminação in vitro por cloretos de mercúrio e de cádmio em testículos do peixe teleosteo *Gymnotus carapo* (tupiaçu) (Linnaeus, 1758)**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Departamento de biociências, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2010.

MORILLO-VELARDE, P. S. et al. Effects of cadmium on locomotor activity rhythms of the amphipod *Gammarus aequicauda*. **Arch. Environm. Contam. Toxicol**, Vancouver. v. 60, n. 3, p. 444 – 451, 2011.

MPCA – Minnesota Pollution Control Agency. **Endocrine disruptors compounds**. Legislative fact sheet. Saint Paul: Minnesota Pollution Control Agency, 2008. Disponível em: <<http://www.pca.state.mn.us/index.php/view-document.html?gid=3892>>. Acesso em 03 dez. 2015.

MRCANTONIO, A. S. et al. Toxicidade do sulfato de zinco para girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*): toxicidade aguda, crônica e parâmetros hematológicos. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 143 – 154, 2011.

NAKANO, V.; ÁVILA-CAMPOS, M. J. Os perigos nos tóxicos POPs e metais pesados e suas consequências para o meio ambiente e para a saúde. **Ecolnews**. 2009. Disponível em: <http://www.ecolnews.com.br/toxicos_POPs_e_metal_pesados.htm>. Acesso em: 03 dez 2014.

NICHOLS, J.W. BREEN, M.; DENVER, R.J.; DISTEFANO, J.J.; EDWARDS, J.S.; HOKE, R.A.; VOLZ, D.C.; ZHANG, X. Predicting chemical impacts on vertebrate endocrine systems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 39-51, 2011.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 197-206, 2009.

NSE - Nova Scotia Environment. **The drop on water – cadmium**. 2008. Disponível em: <https://www.novascotia.ca/nse/water/docs/droponwaterfaq_cadmium.pdf>. Acesso em 03 dez. 2015.

NUNES, B. et al. Ecotoxicological effect of zinc pyriithione in the freshwater fish *Gambusia holbrooki*. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 9, p. 1896-1905, 2015.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development . **Aqueous Exposure Bioconcentration Fish Test**. Paris: OECD, 2012b. 5-20p.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. **Fish, acute toxicity testing of chemicals**. Paris: OECD, 1992. 9 p.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. **Fish, juvenile growth test**. Paris: OECD, 2000. 16 p.

OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development. **Fish short term reproduction assay**. Paris: OECD, 2012c. 40p.

OECD - Organisation For Economic Co-Operation And Development. **Guidance document on the diagnosis of endocrine-related histopathology in fish gonads**. Paris: OECD, 2010. 114 p.

OECD – The Organization for Co-opetarion na Development. **Information on OECD Work Related to Endocrine Disrupters**. 2012a. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/50067203.pdf>>. Acesso em 19 nov 2014.

OGA, S.; FARSKY, S. H. P.; MARCOURAKIS, T. Toxicocinética. In: Oga, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. (eds). **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu editora., 2008, p. 9 – 26, Cap. 1.3.

OLGUNOĞLU, M. P.; ARTAR, E.; OLGUNOĞLU, I. A. Comparison of heavy metal levels in muscle and gills of four benthic fish species from the Northeastern Mediterranean Sea. **Pol. J. Environ. Stud**, v. 24, n. 4, p. 1743-1748, 2015.

OMOZOKPIA, J. A. et al. Heavy metals accumulation in water, sediments and catfish (*Clarias gariepinus*) from two fishing settlements along river Kaduna in Niger State, Nigeria. **British Journal of Applied Science & Technology**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2015.

ÖRN, S. et al. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. **Aquatic Toxicology**, v. 65, n. 4, p. 397–411, 2003.

PAPA, V. et al. The endocrine disruptor cadmium alters human osteoblast-like Saos-2 cells homeostasis in vitro by alteration of Wnt/ β -catenin pathway and activation of caspases. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 38, n. 12, p. 1345-1356, 2015.

PARK, K.; KWAK, I. S. Assessment of potential biomarkers, metallothionein and vitellogenin mrna expressions in various chemically exposed benthic *Chironomus riparius* larvae. **Ocean Sci. J.**, v. 47, n. 4, p. 435-444, 2012.

- PEDROZO, M. F.; KUNO, R. Contaminantes da água e do solo. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2008. p. 199 – 240. Cap. 2.6.
- PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P. COMPREHENDING Endocrine disrupters in aquatic environments. **Environmental Science e Technology**, P. 331-336, 2003.
- PONS-BRANCHU, E. et al. Three centuries of heavy metal pollution in Paris (France) recorded by urban speleothems. **Science of the total environment**, v. 518-519, n. p. 86 - 96, 2015.
- PRETTO, A. **Parâmetros toxicológicos em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos ao cádmio**. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.
- PUYANG, X; GAO, C., HAN, L. Risk assessment of heavy metals in water and two fish species from Golf Course Ponds in Beijing, China. **Bull Environ Contam Toxicol**, Vancouver, v. 94, p. 437–443, 2015.
- RADHAKRISHNAN, M. V.; HEMALATHA, S. Sublethal toxic effects of cadmium chloride to liver of freshwater fish *Channa striatus* (Bloch.). **American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 54-56, 2010.
- RAMÍREZ, A. Toxicología del cadmio: conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. **Anales de la Facultad de Medicina**, San Marcos, v. 63, n. 1, p. 51 – 64, 2002.
- REZAEI A.; SAYADI M. H. Long-term evolution of the composition of surface water from the River Gharasoo, Iran: a case study using multivariate statistical techniques. **Environmental Geochemistry and Health, Local**, v. 37, n. 2, p. 251-261, 2015.
- ROBARDS, K.; WORSFOLD, P. Cadmium: toxicology and analysis: a review. **Analyst**, v. 116, n. 6, p. 549 -568, 1991.
- RONGGUI, S. H. I. at al. The level and bioaccumulation of Cd, Cu, Cr and Zn in benthopelagic species from the Bering Sea. **Acta Oceanologica Sinica**, v. 34, n. 6, p. 21 - 25, 2015.
- RUI, L. Energy Metabolism in the Liver. **Compr Physiol**.v. 4, n. 1, p. 177–197, 2014.
- SALGADO, P. E. T. Metais em alimentos. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. p. 577 – 608, Cap. 5.1.
- SANCHEZ, D. C. O. **Desreguladores endócrinos na indução da vitelogenina em peixes nativos**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- SANTANA, G. P.; BARRONCAS, P. S. R. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na Bacia do Tarumã-Açu Manaus (AM). **Acta Amaz**, Manaus, v. 37, n. 1, p. 111 – 118, 2007.

SANTOS, D. C. M. et al. Histological alterations in liver and testis of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. **Rev. Ceres**, v.62 n.2 p.133 - 141. 2015.

SCHULZ, R. W. et al. Endocrine and paracrine regulation of zebrafish spermatogenesis: the Sertoli cell perspective. **Anim. Reprod.**, v.12, n.1, p.81-87, 2015.

SEGNER, H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** v.149, n. 2, p. 187–195, 2009.

SHALABY, F. M.; ABD-EL MIGEED, H. Impact of environmental contaminants on the testes of *Oreochromis niloticus* with special reference to ultrastructure of spermatozoa in Lake Manzala (Egypt). **J Environ Anal Toxicol.**, v. 2, n. 6, 2012. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/impact-of-environmental-contaminants-on-the-testes-of-oreochromis-niloticus-with-special-reference-to-ultrastructure-of-spermatozoa-in-lake-manzala-egypt-2161-0525.1000149.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2016.

SILVA, M. R. C. **Estudo de sedimentos da Bacia Hidrográfica do Mogi-guaçu com ênfase na determinação de metais**. 2002. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

SIMÕES, A. P.; SILVA, M.; MANGE, N.; FEITOSA, V. H.; CARDOSO, T.; QUINÁGLIA, G. A. A presença de interferentes endócrinos em águas superficiais e de abastecimento: um problema da vida moderna?. 2014. Disponível em: <<http://www.creasp.org.br/biblioteca/wp-content/uploads/2014/05/A-PRESENCA-DE-INTERFERENTES-ENDOCRINOS-EM-AGUAS-SUPERFICIAIS-E-DE-ABASTECIMENTO..pdf>>. Acesso em: 01 dez. 2014.

SIOSON, L. C.; HERRERA, A. A. Impact of nickel intoxication on ovarian histology in *Oreochromis mossambicus*. **Science Dilliman**, v. 7-8, p. 14 – 21, 1996.

SKIDMORE, J. F. Toxicity of zinc compounds to aquatic animals, with special reference to fish. **Quarterly Review of Biology**, v. 39, n. 3, p. 227-248, 1964.

SODRÉ F.; LOCATELLI M.; MONTAGNER C.; JARDIM W. Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. **Caderno Temático**, Universidade Estadual de Campinas, v. 6, Abr 2007.

SORNOM, P. et al. Effects of sublethal cadmium exposure on antipredator behavioural and antitoxic responses in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*. **Plos One**, v. 7, n. 8, p. 1 – 10, 2012.

SPARKS, D. L. Toxic metals in the environment: the role of surfaces. **Elements**, v. 1, n. 4, p. 193-197, 2005.

SUBOTIĆ, S. et al. Concentrations of 18 elements in muscle, liver, gills, and gonads of sibel (*Pelecus cultratus*), ruffe (*Gymnocephalus cernua*), and european perch (*Perca fluviatilis*) in the Danube river near Belgrade (Serbia). **Water, air and soil pollution**, v. 226, n. 9, p. 286-303, 2015.

SUMPETER, J. P.; JOBLING, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. **Environ Health Perspectv.** v. 103, Supl. 7, p. 173-178, 1995.

SUMPTER, J. P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. **Acta Hydrochim Hydrobiol**, Weinheim, v. 33, n. 1, p. 9 –16, 2005.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology**. Normal and pathological features. 2 ed. New York: Fisher, 1995. 195p.

TARRANT, H. et al. **Endocrine disruptors in the irish aquatic environment**: final report. Wexford: Environmental Protection Agency, 2005. Disponível em: <<http://www.epa.ie/pubs/reports/research/water/Main%20Report%20-%20ERTDI%2032.pdf>>. Acesso em 03 dez 2014.

TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy metals toxicity and the environment. **Exs**, v. 111, suplement., p. 133-164, 2012.

TILLITTI, D. E. et al. Role of exposure assessment in characterizing risks of endocrine-disrupting substaces to wildlife. In: KENDALL, R. et al. (Eds). **Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruption in Wildlife**. [s. l.]: Society of Environmental Toxicology and chemistry (SETAC). 1998, pp. 39-67.

TOGNON, G. **Principali effetti degli interferenti endocrini nell'uomo**. 200-?. Disponível em: <<http://www.wfcaserta.org/upload/detox/edc.pdf>>. Acesso em: 06 fev. 2014.

TRAMUJAS, F. F. Aspectos reprodutivos do peixe-zebra, *Danio rerio*, exposto a doses subletais de deltametrina. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 48-53, 2006.

TRUONG L, et al. **Zebrafish assays as developmental toxicity indicators in the green design of TAML oxidation catalysts**. 2013. Disponível em: <<http://www.niehs.nih.gov/news/newsletter/2013/9/science-zebrafish/>>. Acesso em: 03 dez 2015.

TUNDISI, J.G. MATSUMARA-TUNDISI, T. **Recursos hídricos no século XXI**. São Paulo: Oficina de Textos. 2011. 328p.

UNEP - UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Final review of scientific information on cadmium**. 2010. Disponível em: <http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Lead_Cadmium/docs/Interim_reviews/UNEP_GC26_INF_11_Add_2_Final_UNEP_Cadmium_review_and_appendix_Dec_2010.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2015.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ambient water quality criteria for Zinc**. Office of Water, Washington, DC, 1995. 143 p. Disponível em: <<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/9100H5VG.PDF?Dockey=9100H5VG.PDF>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Fish BCF**. Washington: USEPA, 1996. 23p.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **National Recommended Water Quality Criteria**. 2000. Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/current/index.cfm#d>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Technical review document for endocrine disruptor screening program (edsp)**: proposed tier 1 screening battery. Washington: USEPA. 2008. 72 p. Disponível em: <http://archive.epa.gov/scipoly/sap/meetings/web/pdf/technical_review.pdf>. Acesso em 06 jan. 2016.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Update of ambient water quality criteria for cadmium** - EPA-822-R-01-001. Office of Water, Washington, DC, 2001. 276 p. Disponível em: <<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/20003I26.PDF?Dockey=20003I26.PDF>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **What is Endocrine Disruption?**. 2015. Disponível em: <<http://www2.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption#chemicals>>. Acesso em: 03 dez. 2015.

VALLE, B. L.; FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiological reviews**, v. 1, n. 1, p. 79-118, 1993. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/content/physrev/73/1/79.full.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2015.

VAN DER VEN, L. T. M. et al. Vitellogenin expression in zebrafish *Danio rerio*: evaluation by histochemistry, immunohistochemistry, and in situ mRNA hybridisation. **Aquatic Toxicology**, v. 65, n.1, p. 1–11, 2003.

VAN DYK, J. C.; PIETERSE, G. M.; VAN VUREN, J. J. H. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 3, p. 432–440, 2007.

VANDENBERG, L. N. et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. **Endocr Rev.**, v. 33, n.3, p. 378–455, 2012.

VAROL, M.; SEN, B. Assessment of nutrient and heavy metal contamination in surface water and sediments of the Upper Tigris River, Turkey. **Catena**, v. 92, p. 1-10, 2012.

VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos**: teoria e prática. Maringá: Eduem, 1996, 169p.

VELCHEVA, I. G.; ARNAUDOV, A. D.; GEORGIEVA, E. S. Influence of zinc on gill morphology of gibelio carp (*Carassius gibelio*). **Ecologia Balkanica**, Plovdiv, v. 2, p. 19 – 23, 2010.

VIARENGO, A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Reviews in Aquatic Sciences**, v. 1., p. 295 – 317, 1989.

VIJVER, M. G. et al. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. **Environ Sci Technol**, v. 38, n. 18, p. 4705-4712, 2004.

- VOIGT C. L. et al. Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 22, n. 11, p. 8242-8252, 2015.
- WALLACE, R.A. 1985 . Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. In BROWDER, L.W. (ed). **Developmental Biology**. New York: Plenum Press, 1985, v. 1, p. 127-77, Cap. 3.
- WATANABE, T; KIRON, V; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v. 151, n., p. 185-207, 1997.
- WELTZIEN, F. A., et al.. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 137, n. 3, p. 447-477, 2004.
- WESTER, P. W. et al. **Identification of Endocrine Disruptive Effects in the Aquatic Environment a Partial life Cycle Assay in Zebrafish**. RIVM report 640920001. 112p. 2003.
- WHO - World Health Organization. **Zinc - Environmental health criteria**. 2001. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/en/221_Zinc_Part_1.pdf>. Acesso em: 20 out. 2015.
- WITESKA, M.; KOSCIUK, B. The changes in common carp blood after short-term zinc exposure. **Environ Sci & Pollut Res**, v. 10, n. 5, p. 284 – 286, 2003.
- WITORSCH, R. J.; THOMAS, J. A. Personal care products and endocrine disruption: a critical review of the literature. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40. sup. 3, p 1-30, 2010.
- YÖN, N. D. et al. Histopathological effects of cadmium exposure on testis tissue of swordtail fish, *Xiphophorus helleri* (Pisces: Poeciliidae). **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 24, n. 6, p. 2133-2137, 2015.
- YON, N. D.; AKBULUT, C. Histological Changes in Zebrafish (*Danio rerio*) Ovaries Following Administration of Bisphenol A. **Pakistan J. Zool.**, v. 46, n. 4, p. 1153-1159, 2014.
- YOUSUF, R. et al. Metals and histopathological alterations in the liver of *Schizothorax niger*, Heckel from The Dal lake of Kashmir Valley. **J. Environ. Sci. & Natural Resources**, v. 5, n. 2, p. 231- 237, 2012.
- ZHANG, G. et al. Distribution and bioaccumulation of heavy metals in food web of Nansi Lake, China. **Environmental earth sciences**, v. 73, n. 5, p. 2429 -2439, 2015.
- ZHENG, J.-L. et al. Effect of waterborne zinc exposure on metal accumulation, enzymatic activities and histology of *Synechogobius hasta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 7, p. 1864–1873, 2011.
- ZHONG et al. Distribution of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*) tissues for biomarker analysis. **Aquatic toxicology**, v. 149, p. 1–7, 2014.