

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



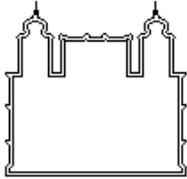
Metalotioneína e Metais em *Geophagus brasiliensis* - Acará

Autor: Alan Ferreira Inácio

Orientadora: Ana Rosa Linde Arias

Dissertação submetida ao programa de pós-graduação da Escola Nacional de Saúde Pública como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências (área de Saúde Pública)

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública
Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
Rio de Janeiro – Março de 2006



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Metalotioneína e Metais em *Geophagus brasiliensis* – Acará

Alan Ferreira Inácio

Dissertação defendida e aprovada em março de 2006

Banca examinadora composta por:

Ricardo Erthal Santelli, PhD.

Paula de Novaes Sarcinelli, PhD.

Ana Rosa Linde Arias, PhD.

Inácio, Alan.

Metalotioneína e Metais em *Geophagus brasiliensis* - Acará.

x, 54p.

Tese (Mestrado em Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ).

1. Metalotioneína. 2. Metais. 3. Parâmetros Biológicos. 4. Distribuição Intracelular. 5. Exposição. 6. Tese. I. Fundação Oswaldo Cruz. II. Título.

Esta tese é dedicada

à minha filha Bruna (em memória) que em poucos anos que esteve ao meu lado, pôde me mostrar o verdadeiro amor fraterno através de seus carinhos, abraços, sorrisos alegres, força e vontade de viver. A quem para sempre e em todos os momentos da minha vida, acredito estar ao meu lado;

à minha esposa Lucineide e minha filha Júlia que me fizeram acreditar que por maiores que sejam as dificuldades, um dia melhor sempre virá.

Agradecimentos

Aos meus pais que lutaram para me oferecer uma vida digna e que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis.

A minha esposa Lucineide que me deu força, apoio e incentivo, estando sempre ao meu lado nos momentos que mais precisei.

A minha filha Júlia, que com sua chegada, trouxe grande alegria e inspiração em todos os aspectos da minha vida.

A minha orientadora Ana Rosa que muito me ajudou, acreditando no meu trabalho, sempre me encorajando e incentivando em todos os momentos.

Ao professor Ricardo Santelli e a Eliane aos quais sou realmente muito grato de modo que a realização deste trabalho seria impossível sem a ajuda de ambos, pois se dispuseram com boa vontade para analisar os metais em minhas amostras.

Aos amigos do laboratório, Josino, Armando, Jefferson, Paula, Rita, Sérgio e Ana Cristina que me acompanharam desde a iniciação científica e aos quais devo grande parte do meu conhecimento e realização profissional.

A amiga Simone que desde a iniciação científica participou e dividiu diversos momentos de trabalho tornando-os sempre mais alegres.

Aos amigos e companheiros de bancada, Leonardo, Marina e Carla pelo grande companheirismo e ajuda nas maiores dificuldades e com os quais dividi vários momentos de alegria durante a realização deste trabalho.

Não esquecendo das colegas de turma e trabalho Márcia e Helena e os colegas de trabalho Ana Carolina, Raphael, Murata, Carlúcio, Cássia, André, Marcelo, Juliana e Tatiane que sempre tornavam meu cotidiano mais alegre.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros instrumentais do ICP OES para análise de Cd, Cu e Zn.	13
Tabela 2 - Linhas de emissão e limite de detecção para Cd, Cu e Zn por ICP OES.	14
Tabela 3 - Peso médio e comprimento total dos animais.	17
Tabela 4 - Concentração de Zn e Cu nas três frações hepáticas de acarás.	18
Tabela 5 - Relação entre a concentração hepática de Zn e Cu e os parâmetros peso e tamanho corporal.	19
Tabela 6 - Relação entre MT hepática, renal e branquial e parâmetros biométricos.	21
Tabela 7 - Relação entre a concentração de Zn e Cu e MT hepática.	21
Tabela 8 - Concentração hepática de Zn, Cu e Cd em acarás expostos e não expostos a Cd.	27

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura tridimensional da MT.	3
Figura 2 – <i>Geophagus brasiliensis</i> – Acará	11
Figura 3 - Espectrômetro de emissão ótica com fonte de plasma de argônio indutivamente acoplado, marca Jobin Yvon, modelo Ultima 2.	13
Figura 4 - Polarógrafo Metrohm VA 663.	14
Figura 5 – Polarogramas de MT purificada na faixa de 0,01 a 0,25 mg/L.	15
Figura 6 – Seqüência de reações eletroquímicas na determinação de MT por Brdicka.	16
Figura 7 - Níveis de MT hepática, renal e branquial em acarás não expostos a Cd	20
Figura 8 – Distribuição intracelular de Zn e Cu no tecido hepático de acarás.	23
Figura 9 – Distribuição percentual de Zn e Cu intracelular no tecido hepático de acarás.	24
Figura 10 – Níveis de MT hepática, renal e branquial em acarás expostos e não expostos a Cd.	26
Figura 11 – Percentual de distribuição de Cd nas frações hepáticas de acarás expostos.	29
Figura 12 – Comparação da distribuição de Zn nas frações hepáticas em acarás expostos e não expostos.	31
Figura 13 – Comparação da distribuição de Cu nas frações hepáticas em acarás expostos e não expostos.	33

Índice

I – Introdução.	
I.1 – Metalotioneínas	1
I. 1. 2 - Função biológica.	1
I.1.3 - MTs e a detoxificação de metais.	2
I. 2 – Metais – Zn, Cu e Cd.	3
I. 3 - MTs e metais em peixes.	5
II – Objetivos.	
II. 1 - Objetivo geral.	9
II. 2 - Objetivos específicos.	9
III – Metodologia	
III. 1 – Reagentes.	10
III. 2 – Equipamentos.	10
III. 3 – Amostragem.	11
III. 4 – Exposição dos acarás a Cd.	11
III. 5 – Processamento das amostras de tecido hepático, renal e branquial para determinação MT e metais.	12
III. 6 - Determinação de metais.	12
III. 7 – Determinação de MT.	14
III. 8 – Análises estatísticas.	16
IV – Resultados	
IV. 1 - Comparação dos parâmetros biométricos entre acarás machos e fêmeas.	17
IV. 2 - Metais : A influência do sexo, peso e tamanho corporal.	17
IV. 2. 1 – O fator sexo.	17
IV. 2. 2 – Os fatores peso e tamanho corporal.	18
IV. 3 - MT hepática, renal e branquial: a influência do fator sexo, peso e tamanho corporal.	19
IV. 3. 1 - O fator sexo.	19
IV. 3. 2 - Os fatores peso e tamanho corporal.	21
IV. 4 - MT hepática e a sua relação com metais.	21
IV. 4. 1 – A distribuição intracelular hepática de Zn e Cu.	22
IV. 5 – MT e metais em acarás expostos a Cd.	25
IV. 5. 1 - MT Hepática, renal e branquial em acarás expostos a Cd.	25

IV. 5. 2 – A concentração hepática de Zn, Cu e Cd em acarás machos e fêmeas.	27
IV. 5. 3 – A distribuição intracelular hepática de Zn, Cu e Cd em acarás expostos a Cd.	28
V – Discussão	
V. 1 - Metais e parâmetros biológicos.	35
V. 2 – MT e parâmetros biológicos.	36
V.3 - Relação entre MT hepática e metais.	37
V.4 - Distribuição intracelular dos metais.	38
V.5 – MT e metais em acarás expostos ao Cd.	40
VI – Conclusão.	43
VII – Bibliografia.	44

Resumo

Metalotioneínas (MTs) são proteínas citosólicas cuja função biológica está relacionada à regulação de metais essenciais e a detoxificação de metais tóxicos. O conhecimento da compartimentalização intracelular de metais, da função fisiológica das MTs e dos fatores que controlam seus níveis em diferentes espécies de peixes é essencial para compreensão dos efeitos tóxicos induzidos por metais. *Geophagus brasiliensis* (acará) é uma espécie nativa do Brasil, com ampla distribuição e aspectos ecológicos que favorecem sua utilização como espécie bioindicadora dos efeitos da poluição ambiental por metais. Este trabalho teve por objetivo estudar MT e metais em acarás, analisando a influência dos parâmetros biológicos do animal, além das alterações produzidas pela exposição a um metal tóxico como cádmio (Cd). Acarás coletados no rio Guandu foram divididos em dois grupos. O primeiro considerado como não exposto e um segundo que foi exposto a Cd por injeção intraperitoneal. MTs foram quantificadas por polarografia de pulso diferencial enquanto zinco (Zn), cobre (Cu) e Cd em três frações hepáticas foram quantificados por ICP OES. Os níveis de MT hepática e renal foram maiores em acarás fêmeas e somente a MT branquial mostrou correlação positiva com peso e tamanho corporal. O sexo não influenciou na concentração hepática de Zn e Cu, entretanto os níveis de Zn estiveram positivamente relacionados ao peso e tamanho corporal. O Cu não mostrou qualquer relação com estes parâmetros biométricos. Os níveis de MT hepáticos estiveram relacionados com o conteúdo de Zn e Cu neste órgão. Ambos os metais mostraram-se predominantemente citosólicos, sendo que o Cu foi encontrado quase totalmente na fração que contém a MT. Após exposição ao Cd, a MT renal e branquial apresentaram níveis significativamente maiores, assim como se encontrou uma redução significativa nos níveis de Zn e Cu hepático. A exposição ao Cd também promoveu uma alteração na distribuição intracelular do Zn e do Cu onde um menor percentual desses metais foi verificado na fração citosólica que contém a MT. Neste estudo foi verificado que MT e metais em acarás são influenciados por alguns parâmetros biológicos. A exposição ao Cd também promove uma alteração nos níveis de MT e de metais bem como na distribuição intracelular. Estes fatores estão relacionados com a toxicidade e a tolerância à exposição a metais e devem ser considerados para que esta espécie possa ser utilizada como bioindicadora da exposição ambiental a metais.

Abstract

Metallothioneins (MTs) are cytosolic metal-binding proteins whose biological function are related with the regulation of essential metals, such Zn and Cu, and with the detoxification of toxic metal such Cd and Hg. Knowledge on metal intracellular compartmentalization, on the physiological function of MTs and on the factors that control their levels is essential to understand the toxic effects induced by metals in fish species. *Geophagus brasiliensis* (acará) is Brazilian native fish specie widely distributed and with ecological and physiological characteristics that made it suitable to be used as bioindicator fish specie to assess the effects of heavy metal pollution. The aim of this work was to study MT and metals in *G. brasiliensis* analyzing the influence of biological parameters and the alterations caused by the exposition to a toxic metal such Cd. Animals were collected for Guandu River, in Rio de Janeiro State and were divided into two groups. A first group, which was considered as non-exposed; and a second group, which was exposed to Cd by intraperitoneal injection. Hepatic MT, renal MT and gill MT were quantified by differential pulse polarography while, Cu, Cd from three hepatic fractions (total fraction, cytosolic fraction and MT fraction) were quantified by ICP OES. Levels of hepatic and renal MT were bigger in females and only MT from gills showed a positive correlation with weight and body length. Sex did not affect the hepatic levels of Zn and Cu, however levels of Zn were positively related with weight and body length. Cu did not show any relation with both these biological parameters. Levels of hepatic MT were related with Zn and Cu contents of this organ. Both metals showed to be mainly cytosolic, being Cu is largely found in the MT containing fraction. After Cd exposition, renal and gill MT presented levels significantly higher, and it was also found significant reduction in the levels of hepatic Zn and Cu. Exposition to Cd caused also alterations on the pattern of intracellular distribution of Zn and Cu, since less ratio of these metals were found in the MT containing fraction. Hence, this study shows that MT and metals in *G. brasiliensis* are influenced by biological parameters and that exposition to Cd causes alterations in the levels both of them and also alters the patterns of metallic intracellular distribution. All these factors, that are related to toxicity and tolerance to metal exposition, must be considered when this fish specie to be used as bioindicator of environment exposition to heavy metals.

I - Introdução

I. 1 – Metalotioneínas.

Metalotioneínas (MTs) são uma classe de proteínas citosólicas de baixo peso molecular, em torno de 6 – 7 kDa, e sua estrutura molecular é composta de uma única cadeia de aminoácidos dos quais 20 são cisteínas, que representam em torno de 30% do total de aminoácidos. Livre de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, a estrutura da MT possui dois domínios que consistem, em geral, de um cluster com três e um com quatro átomos de metal ligados (figura 1). A abundância de ligantes tiol dos resíduos de cisteína presentes na estrutura da MT confere a proteína uma alta afinidade por íons metálicos livres, o que faz das MTs, proteínas de grande interesse sob o ponto de vista bioquímico ¹.

MTs foram descobertas em 1957 quando Margoshes and Vallee identificaram em córtex de rim eqüino uma proteína responsável pelo acúmulo natural de cádmio (Cd) neste tecido ². Desde então, MTs são os únicos compostos biológicos conhecidos por conter naturalmente Cd. Tais achados suscitaram investigações mais detalhadas, pois a presença de diversos metais na estrutura da macromolécula poderia estar relacionada a uma função nos sistemas biológicos. Assim, as diferentes propriedades das MTs, tais como estrutura e características químicas e físico-químicas, têm sido até hoje amplamente investigadas ¹.

A nomenclatura da proteína foi baseada na observação de algumas características particulares como elevada quantidade de enxofre e presença de metais como Cd e Zinco (Zn). A característica comum de todas as MTs é a ocorrência da seqüência de tripeptídeos **Cys-X-Cys**, onde X representa um aminoácido diferente de cisteína. Estudos posteriores sobre seu espectro de absorção demonstraram que sua estrutura era livre de aminoácidos aromáticos por ausência de absorção a 280nm ¹.

Em espécies aquáticas, as metalotioneínas foram primeiramente descritas em 1974 em peixes marinhos *Sebastes seboides* ³, e posteriormente em outras espécies como *European eel* ⁴, carpa, *Cyprinus carpio* ⁵, e truta, *Oncorhynchus mykiss* ^{6,7}.

Atualmente sabe-se que as metalotioneínas ocorrem não somente no reino animal, mas também em microorganismos procarióticos e eucarióticos e em plantas superiores ⁸.

I. 1.2 - Função biológica.

A função fundamental das MTs nos sistemas vivos não tem sido bem esclarecida, embora existam várias hipóteses que incluem a ação como

metalo-chaperones para transportar íons metálicos para outras proteínas, controle da concentração de elementos traços livres como Zn e cobre (Cu), estocagem e armazenamento, ação como agente de detoxificação para metais como Cd e mercúrio (Hg), e também um papel protetor por seqüestro de metais e proteção contra condições de stress. Por isso, a MT é uma importante proteína no metabolismo intracelular de Cu e Zn e na proteção contra danos oxidativos resultantes da exposição excessiva a metais⁹. A gama de metais capazes de se ligarem a MT é ampla¹⁰. A maior parte dos íons metálicos das famílias I-B e II-B da tabela periódica são conhecidos por se ligarem aos grupos cisteína-SH e a afinidade dos íons metálicos pelos sítios de ligação segue a ordem encontrada para tiolatos inorgânicos, isto é, Hg (II), prata (Ag) (I), Cu (I), Cd (II) e Zn(II)^{11, 12, 13, 14}.

Tem sido proposto que altos níveis de MT podem estar presentes em tecidos que estejam em rápido crescimento e desenvolvimento, geralmente para fornecer Zn e Cu para o metabolismo de ácidos nucléicos, síntese de proteínas, e outros processos. Em animais onde o Zn é o mais abundante e muitas vezes o único metal constituinte da proteína, tem sido postulado que por controlar o fluxo deste metal, MTs têm um papel regulatório nos processos de replicação e transcrição Zn-dependentes¹⁵.

A regulação de biossíntese de MT por metais tem sido considerada como necessidade biológica para manter concentrações homeostáticas de íons metálicos essenciais e não essenciais por processo de quelação. Estudos sobre a regulação da expressão gênica mostram evidências de que a indução da síntese da proteína por metais é uma resposta direta ao aumento da concentração intracelular do metal que é mediada por fatores regulatórios. Uma superexpressão de MT pode ser causada por exposição à Zn ou Cu e esta indução também serve como proteção celular contra agentes alquilantes. Tem-se sugerido que estes efeitos podem ser devido ao papel de MTs como removedor de agentes antioxidantes e eletrofílicos^{16, 17}.

1.1.3 - MTs e a detoxificação de metais.

A habilidade de metais em induzir a síntese de MT foi originalmente descrita por Piscator em 1964, que mostrou o aumento dos níveis de MT hepática em coelhos expostos a Cd. Desde então, esta forma de regulação tem sido reconhecida em todas as espécies e células que sintetizam MTs^{18, 19}.

As interações celulares envolvendo MTs podem ser explicadas em duas linhas gerais; a primeira sendo a ligação do íon metálico incorporado pela célula, e a segunda

através da remoção dos metais de ligantes não-tioneínas que incluem alvos celulares de toxicidade. Esta última pode representar a função de detoxificação para estruturas que são reversivelmente danificadas pela ligação inapropriada do metal²⁰. A síntese de MT pode ser rapidamente aumentada sob condições de altos níveis de Cu hepático. O Cu acumula em forma não tóxica nos lisossomos, polimerizados a MTs. Encontra-se fortemente ligado à estrutura da proteína de modo que pode deslocar os demais íons ligados a MT. Esta maior afinidade do Cu pela molécula de MT constitui um fator de proteção para a célula, pois Zn e Cd não são tão reativos como o Cu com relação à formação de radicais de oxigênio^{21, 22}.

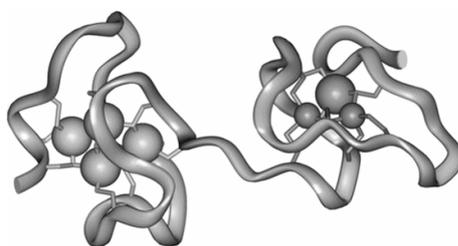


Figura 1 – Estrutura tridimensional da MT.

I. 2 – Metais – Zn, Cu e Cd.

Metais estão amplamente distribuídos no meio ambiente e são componentes naturais da biosfera. Devido a sua natureza persistente e baixa eliminação dos compartimentos ambientais, são um dos maiores e mais abundantes grupos de microcontaminantes, e encontram-se no ambiente associados a vários elementos. Embora não possam ser criados ou destruídos, metais podem ser redistribuídos em escala regional e global²³. Alguns metais são elementos essenciais para o metabolismo normal do organismo, enquanto outros não desempenham nenhum papel biológico significativo²⁴.

O Zn é um dos mais comuns elementos na crosta terrestre sendo encontrado no ar, solo, água e está presente em quase todos os alimentos. Zn pode combinar-se com outros elementos tais como cloro, oxigênio e enxofre para formar compostos de zinco. A maior parte do Zn encontrado naturalmente no meio ambiente está sob a forma de sulfeto²⁵. O Zn é um componente de várias proteínas e está envolvido em todos os aspectos do metabolismo, sendo parte integral de aproximadamente 300 enzimas em diferentes espécies de todos os filos, indispensáveis a suas funções, as quais envolve a

síntese e/ou degradação da maioria dos metabólitos. O Zn estabiliza a estrutura de proteínas e ácidos nucleicos, preserva a integridade de organelas subcelulares, participa em processos de transporte, e desempenha um importante papel em fenômenos imunológicos²⁶. Os níveis de Zn no fígado são extremamente importantes no controle da síntese e degradação da MT na maioria das espécies animais, de modo que as concentrações de MT nos hepatócitos são muito baixas na deficiência de Zn e a síntese da proteína é estimulada com suplementação de Zn na dieta²⁷.

O Cu é um metal traço classificado como elemento essencial para a maioria dos organismos vivos. Em ambientes aquáticos está presente sob forma particulada, coloidal e solúvel, predominantemente na forma metálica e na forma reduzida, formando complexos com ligantes orgânicos e inorgânicos. O Cu é essencial para o metabolismo celular sendo o terceiro elemento de transição em maior abundância no organismo depois do Zn e do Ferro (Fe), necessário para a ativação de uma variedade de proteínas. A capacidade de estocagem do Cu varia de acordo com a espécie animal, e a distribuição intra-hepática do metal mostra ser um importante fator com relação a sua hepatotoxicidade devido à elevada capacidade em formar espécies reativas com oxigênio^{28, 29}. O Cu é absorvido no intestino e chega ao fígado onde é utilizado para o metabolismo normal ou é estocado pela ligação a MT ou ainda, por um balanço positivo, é excretado na bile³⁰.

O Cd é um elemento que ocorre naturalmente na crosta terrestre e usualmente não está presente no meio ambiente como metal puro, mas como mineral combinado com outros elementos como oxigênio (óxido de Cd), cloro (cloreto de Cd), ou enxofre (sulfato ou sulfeto de Cd). Cd é um elemento quimicamente similar ao Zn sendo facilmente absorvido por animais e estocado nos órgãos na forma de complexos com MTs³¹. O Cd entra nas células através dos canais de cálcio (Ca) devido à similaridade química entre eles. Este mecanismo de ação, entre outros, parece ser baseado na competição com íons Ca e alterações de processos Ca-dependentes³². O Cd é conhecido como um metal altamente tóxico capaz de influenciar vários processos fisiológicos. Na interação com organismos vivos, um dos primeiros efeitos do Cd é a alteração de atividades enzimáticas e mecanismos de transporte de membrana, os quais são responsáveis por alterações fisiológicas e metabólicas em todo o organismo. O Cd pode alterar a atividade das enzimas por ligação a seus grupos funcionais (sulfidril, carboxil, imidazol, etc.) ou por deslocamento dos metais (Zn e Cu) associados à enzima, que

servem como cofatores³³. A substituição de cátions essenciais por Cd é um dos mais importantes mecanismos de efeito deste metal³⁴.

I. 3 - MTs e metais em peixes.

Os esforços para estabelecer o papel das MTs em peixes, têm sido focalizado na potencial função da proteína na redução da toxicidade de metais. A indução da MT resulta em um aumento da ligação de metais a proteína, e tem sido sugerido que os efeitos tóxicos do Cd e Hg ocorrem somente quando a capacidade de ligação das MTs é excedida e estes metais aparecem associados a proteínas de alto peso molecular no citosol. O seqüestro de metais pela MT não é um sistema estático de modo que um aumento na taxa de síntese da MT é ocasionado por um aumento nos níveis de metais no organismo¹⁷.

Vários estudos em diferentes espécies de peixe têm demonstrado que MTs ligam íons metálicos e que seus níveis estão correlacionados com os níveis teciduais de metal^{35, 36, 37, 38, 39, 40}. Da mesma forma, os níveis de MT têm demonstrado aumentar em relação ao tempo ou a dose após a administração de metais. No entanto, a grande influência dos metais em promover a indução de MT pode variar de acordo com a espécie de peixe, tecido e condições experimentais. A capacidade de indução das MTs é maior nos tecidos que estão envolvidos na captação, acúmulo e excreção como fígado, rins, brânquias e intestino. No entanto, suas concentrações podem variar de acordo com a espécie, condições reprodutivas, idade e dieta alimentar^{16, 41}. Diferentes espécies de peixe mostram diferenças nos níveis de MTs, e diferentes órgãos acumulam metais em distintas proporções devido a diferenças em suas funções bioquímicas e fisiológicas. Por isso, algumas espécies são capazes de tolerar altas concentrações de alguns metais comparadas a outras⁴².

A captação e o acúmulo de metais nos organismos aquáticos dependem das propriedades químicas e físicas da água e do sedimento. Além disso, a idade, hábitos alimentares dos animais e a biodisponibilidade do metal na água podem afetar seu acúmulo no organismo. Em peixes, as principais vias de captação de metais são as brânquias e o intestino. As brânquias representam uma fina e extensa superfície em íntimo contato com a água (acima de 90% do total da superfície corporal). Elas realizam três principais funções como, troca gasosa, regulação iônica e excreção de produtos residuais do metabolismo⁴³. A captação branquial de Zn e Cd é mais comumente transcelular e ocorre através das células do epitélio. Estes metais entram provavelmente

através dos canais de cálcio. A captação envolve a ligação a sítios específicos nas células epiteliais de modo que a captação de Zn pelas células intestinais pode ser saturada a altas concentrações do metal e inibida pela presença Cu, Cd, cobalto (Co), cromo (Cr), níquel (Ni) e Hg ⁴⁴.

Após serem absorvidos, os metais são transferidos das brânquias e intestinos ao sangue e distribuídos a outras partes do corpo. A distribuição corpórea é inerente a cada metal, pois diferentes metais possuem diferentes padrões de distribuição. Alguns fatores intrínsecos em peixes também determinam a distribuição de metais no organismo após ser assimilado. A associação de metais com diferentes ligantes celulares pode influenciar sua biodisponibilidade dentro da célula. Por exemplo, metais seqüestrados por proteínas citosólicas como MTs ou estocados nos lisossomos são considerados detoxificados, e não mais biodisponíveis a alvos celulares ^{17, 37, 45, 46, 47, 48}.

Em peixes, metais formam complexos e podem ser normalmente excretados, mas em alguns casos, metais podem alterar a composição bioquímica do tecido. Exposições a diferentes metais causam várias alterações fisiológicas em peixes ^{49, 50}.

O Zn é inicialmente distribuído à pele, músculo, e ossos e somente pequenas quantidades são acumuladas no fígado e rim. A transferência de Zn das células epiteliais das brânquias é rápida, assim como o seu “turnover” no fígado, entretanto nos demais órgãos sua eliminação ocorre lentamente ⁵¹. O Zn pode alterar a composição bioquímica de tecidos de peixes pela diminuição de glicogênio por um aumento do metabolismo. A demanda energética não pode ser suprida, pois o metal pode inibir a produção de insulina no pâncreas ⁵². O Zn pode causar um processo de intensa proteólise no organismo culminando com uma diminuição na concentração de proteínas hepática e muscular. Uma diminuição do conteúdo de lipídio muscular também pode ocorrer devido a um processo de oxidação ou hidrólise lipídica ocasionada pelo metal ⁵³.

O Cu assim como o Zn é captado pelas brânquias, no entanto estudos em diferentes órgãos de peixes têm mostrado que o fígado é o órgão mais importante no acúmulo deste metal. A toxicidade do Cu parece resultar de sua interação com membranas celulares, onde promovem um processo lipoperoxidativo desencadeando vários estresses celulares. Além disso, lesões morfológicas induzidas por Cu têm sido descritas em órgãos sensoriais de algumas espécies de peixes. Receptores celulares da linha lateral e órgãos são danificados por este metal. Os efeitos do Cu podem ainda ser observados como alterações citopatológicas na córnea de peixes. Também pode ser mencionado que o cobre reduz a atividade da acetilcolinesterase em cérebro e músculo

de peixes. A consequência do aumento de acetilcolina nas terminações nervosas pode culminar com a síndrome colinérgica⁵⁴.

O Cd é lentamente acumulado em peixes. O fígado e o rim são os principais órgãos onde o Cd se acumula, porém, o rim contém consideravelmente maior quantidade do metal¹⁷. Uma vez retido no rim e no fígado, a eliminação do metal é extremamente baixa. A maior parte do Cd intracelular é eventualmente distribuída ao citosol e grande parte do Cd está associado a MT^{5, 37, 51}. O Cd é distribuído seletivamente ao rim após administração de Cd-MT, embora seja predominantemente captado pelo fígado após injeção de Cd⁺² ou como Cd-albumina. Uma vez na corrente sanguínea, Cd é ligado à albumina plasmática. No tecido hepático o Cd liga-se a MT por uma troca com o Zn na molécula da proteína. Cd induz a síntese de MT e o metal é ligado pela proteína protegendo as células hepáticas da toxicidade. Cd como MT é liberado na corrente sanguínea e é transportado ao rim onde é filtrado pelos glomérulos. A MT é catabolizada nos lisossomos dos túbulos renais e o Cd livre induz nova síntese de MT na célula. Cd tem uma meia-vida biológica de 10–15 anos, o que é considerada como muito longa¹.

Peixes de água doce expostos a Cd, a uma concentração abaixo de 100 µg/L, exibem substanciais fisiopatologias que são manifestadas na forma de distúrbios respiratórios, alterações na regulação iônica corporal ou plasmática, alterações hematológicas, e outros parâmetros sanguíneos como cortisol e glicose, revelando a resposta desses animais ao estresse⁵⁵. A exposição a metais pode também alterar a distribuição de metais essenciais. A ligação de Cd a componentes subcelulares tem consequências potenciais para a mobilização de metais essenciais, adquirindo uma dimensão toxicológica e diagnóstica⁵⁶.

A distribuição intracelular pode estar relacionada à toxicidade e a tolerância à exposição a metais. Esta tolerância está associada aos mecanismos de metabolização e a compartimentalização de metais na célula⁴⁸. O conhecimento da compartimentalização intracelular de metais e da função fisiológica das MTs, bem como dos fatores que controlam seus níveis em diferentes espécies de peixes, é essencial para compreensão dos danos celulares induzidos por metais⁵⁷.

A possibilidade da utilização de MTs como biomarcador da exposição a metais tem sido estudada e empregada em diferentes espécies de animais aquáticos para a avaliação do impacto ambiental. Vários estudos têm utilizado a expressão de MTs como biomarcador para avaliar a contaminação de ecossistemas aquáticos por metais^{21, 22}.

Porém, estudos prévios são necessários para a compreensão dos fatores biológicos que estão relacionados à proteína e aos metais na espécie, e as alterações produzidas pela exposição a metais tóxicos, os quais devem ser considerados na avaliação de impacto da contaminação sobre o ecossistema. Tais conhecimentos são fundamentais para que uma espécie possa ser utilizada como espécie bioindicadora.

Pertencente à família Cichlidae, *Geophagus brasiliensis*, conhecido como “acará”, constitui uma espécie de peixe endêmica no Brasil e bem adaptada ao clima tropical. Distribuída pela costa leste e sul do país, a espécie habita ecossistemas dulcícolas e pode ser considerada adulta quando atinge 18 cm de comprimento. Com regime alimentar onívoro, apresenta ampla diversidade alimentar (detritos, plantas, zoobêntons, insetos e algas) ^{58, 59}. As características fisiológicas e ecológicas desta espécie são favoráveis para sua utilização como espécie bioindicadora. Porém, o estudo da relação dos parâmetros biológicos com MT e metais e da compartimentalização intracelular de metais no tecido hepático em acarás, contribui para o conhecimento sobre os fatores que estão relacionados aos níveis da proteína e de metais nesta espécie, e que devem ser considerados quando da utilização da mesma como espécie bioindicadora dos efeitos da exposição ambiental a metais. O conhecimento das alterações produzidas na compartimentalização intracelular hepática de metais e nos níveis de MT pela exposição a um metal tóxico, contribui para a compreensão dos mecanismos celulares de detoxificação que envolvem a proteína e os metais, de modo que tais alterações também possam ser utilizadas como indicadores de toxicidade na avaliação da exposição ambiental a metais utilizando acarás.

II - Objetivos

II. 1 - Objetivo geral.

Este trabalho tem por objetivo estudar MT e metais em acarás, analisando a influência dos parâmetros biológicos do animal, além das alterações produzidas pela exposição a um metal tóxico como Cd.

II. 2 - Objetivos específicos.

- ✓ Determinar em acarás não expostos os níveis de MT em diferentes órgãos como fígado, rim e brânquias relacionando-os a parâmetros biológicos como sexo, peso e tamanho corporal;
- ✓ Analisar as relações entre os níveis hepáticos de Zn e Cu e parâmetros biológicos como sexo, peso e tamanho corporal em acarás não expostos;
- ✓ Analisar a relação entre MT e Zn e Cu hepáticos em acarás não expostos;
- ✓ Analisar a distribuição hepática intracelular de Zn e Cu em acarás não expostos;
- ✓ Analisar alterações nos níveis de MT hepática, renal e branquial, nos níveis hepáticos de Zn, Cu e Cd e na distribuição hepática intracelular desses metais em acarás expostos a Cd comparando com acarás não expostos.

III – Metodologia

III. 1 - Reagentes

- Cloreto de Hexamina Cobalto (Sigma).
- Hidróxido de Amônio (Sigma).
- Cloreto de Amônio (Sigma).
- Sacarose (Sigma).
- Cloreto de cádmio (Sigma).
- TRIS-Hidroximetil aminometano (Merck).
- Metalotioneína comercial purificada de fígado de coelho (Sigma).
- Os demais reagentes foram de grau analítico.

III. 2 – Equipamentos

- Polarógrafo Metrohm VA 663.
- Centrífuga Refrigerada HITACHI – CR21E.
- ICP OES, Jobin Yvon, modelo Ultima 2.
- Homogeneizador Ultra Turrax IKA T18.
- E demais equipamentos de uso laboratorial comum.

III. 3 – Amostragem.

Os exemplares de acarás (figura 2) obtidos para este estudo foram coletados no rio Guandu próximo à estação de tratamento de águas da Companhia Estadual de Água e Esgoto (CEDAE), no município de Seropédica, no Estado do Rio de Janeiro. As coletas foram realizadas mediante a pesca com tarrafa.

Imediatamente após a captura, os animais foram colocados em bombonas com oxigenação artificial para o transporte até ao laboratório, onde então foram transferidos para um aquário.

Para este estudo foram utilizadas duas amostragens de acarás. A primeira amostragem constituiu o grupo não exposto e a segunda amostragem constituiu o grupo exposto a Cd.



Figura 2 – Geophagus brasiliensis – Acará

A primeira amostragem foi obtida em três coletas realizadas em três diferentes dias totalizando 37 exemplares. Após cada coleta, os animais permaneceram no aquário por um período de três dias para a aclimação sendo posteriormente sacrificados mediante secção da coluna vertebral. Os animais foram pesados e o comprimento total de cada animal foi obtido. Posteriormente, o fígado, os rins e as brânquias foram removidos e armazenados em tubos plásticos e estocados em nitrogênio líquido até a análise. A segunda amostragem foi realizada no mesmo local. A coleta foi feita em um único dia totalizando um grupo de 14 exemplares. Os procedimentos de captura, transporte e aclimação foram realizados de modo idêntico à primeira amostragem.

III. 4 – Exposição dos acarás a Cd.

Após aclimação, os animais da segunda amostragem foram contaminados com Cd através de injeção intraperitoneal de solução de CdCl_2 [0,324mg. mL^{-1}] em NaCl

0,9%, de modo que cada animal recebesse uma dose de 1mg de Cd por kg de peso corporal⁶⁰. A relação volume máximo de injeção e peso corporal foi de 200µL / 100g.

Após 36h de observação, os animais foram sacrificados de modo idêntico ao primeiro grupo, sendo obtido o peso e o tamanho corporal de cada animal e seus órgãos removidos e armazenados em nitrogênio líquido até o momento da análise.

III. 5 – Processamento das amostras de tecido hepático, renal e branquial para determinação MT e metais.

Para análise, as amostras de tecido hepático, renal e branquial foram descongeladas e pesadas, adicionando-se em seguida solução tampão TRIS – sacarose (20 mmol.L⁻¹ – 0,5 mol.L⁻¹), pH 8,0, em uma relação de 3 volumes/peso para fígado e brânquia e 20 volumes/peso para rim. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas. Uma alíquota de 300µL do homogeneizado da amostra de tecido hepático foi reservado para quantificação de metais. Em seguida a parte restante do homogeneizado de fígado e o homogeneizado de rins e brânquias foram centrifugados a 30.000g por 20 minutos a 4^oC, obtendo-se um sobrenadante, a fração S30, que neste estudo foi considerada como fração citosólica⁶¹. Uma alíquota de 300µL desta fração de tecido hepático também foi reservado para determinação de metais nesta fração.

Posteriormente uma alíquota de 100µL da fração citosólica de cada órgão foi reservada para a quantificação de MT. A parte restante desta fração do tecido hepático foi aquecida a 70^oC por 10min. em banho-maria e em seguida centrifugada 30.000g por 20min a 4^oC. Uma alíquota de 300µL do sobrenadante obtido denominado de fração MT foi reservada para a quantificação de metais.

MT foi quantificada em tecido hepático, renal e branquial. Zn, Cu e Cd foram quantificados somente no tecido hepático.

III. 6 - Determinação de metais.

Para a determinação de metais, toda a vidraria utilizada foi anteriormente descontaminada em solução 10% de ácido nítrico (HNO₃).

Zn, Cu e Cd foram determinados no fígado total, na fração citosólica e na fração MT do tecido hepático. Em cada alíquota de 300µL de cada fração do tecido hepático foi adicionado 1,5mL de HNO₃ para digestão das amostras, incubando-se por uma noite. Transcorrido este período, foi acrescentado 3,2mL de água ultrapura. Um branco foi

confeccionado utilizando 300 μ L de tampão TRIS-sacarose, 1,5mL de HNO₃ e 3,2mL de água.

As amostras foram analisadas em espectrômetro de emissão ótica com fonte de plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES) (figura 3).

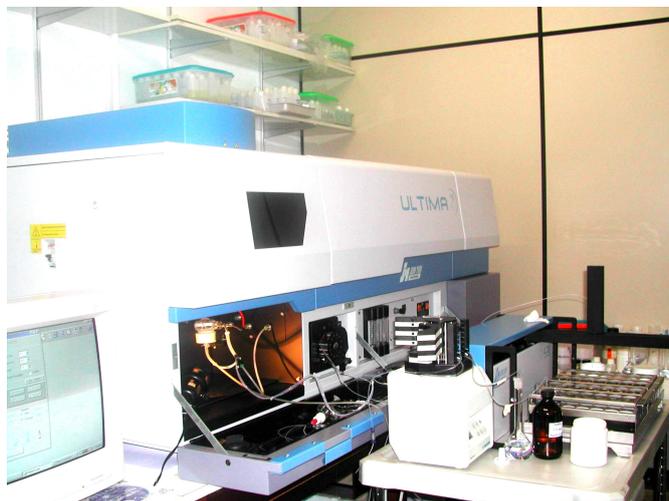


Figura 3 - Espectrômetro de emissão ótica com fonte de plasma de argônio indutivamente acoplado, marca Jobin Yvon, modelo Ultima 2.

Os parâmetros utilizados na determinação de cada metal são mostrados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Parâmetros instrumentais do ICP OES para deteminação de Cd, Cu e Zn.

Potência incidente	1200 W
Vazão da amostra (mL/min)	1.0
Vazão do gás do Plasma (L/min)	12
Vazão do Sheath gás (L/min)	0.2
Tempo de estabilização (s)	3
Vazão do gás no nebulizador (L/min)	0.4
Pressão do gás no nebulizador (bar)	2.45
Altura de observação (mm)	15
Replicatas	3
Tipo do Nebulizador	MiraMist

Tabela 2 – Linhas de emissão e limite de detecção de Cd, Cu e Zn por ICP OES.

Elemento	Linhas de emissão (nm)	Limite de detecção (mg/L)
Cd	228,802	0,001
Cu	324,754	0,001
Zn	213,856	0,003

III. 7 – Determinação de MT.

MT foi quantificada por polarografia de pulso diferencial com eletrodo de mercúrio utilizando Polarógrafo Metrohm VA 663 (figura 4). A determinação de MT por polarografia utiliza o método descrito por Brdicka, baseado na evolução catalítica do H^+ na superfície do eletrodo na presença de grupamentos sulfidrilas (SH) e Co⁶².

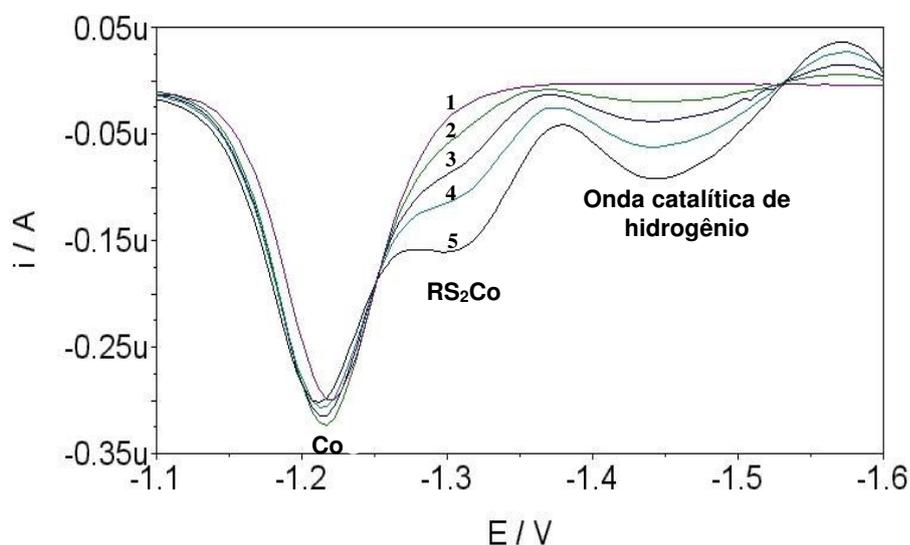
**Figura 4 - Polarógrafo Metrohm VA 663.**

Para análise, foi preparada uma solução eletrolítica de tampão de amônio (hidróxido + cloreto de amônio 1M, pH 9.5) contendo 0,6mM de cloreto de hexamina cobalto. Foi confeccionada uma curva analítica utilizando MT comercial purificada de fígado de coelho, na faixa de 0,01 a 0,25 mg/L a partir de uma solução-mãe de MT (50mg/L em H₂O destilada) (figura 5). Em cada alíquota de 100μL reservada para a quantificação de MT foi adicionado 900μL de solução de NaCl 0,9%. Estas suspensões

foram aquecidas a 70^oC por 10min. em banho-maria para e em seguida centrifugadas a 30000g por 20min a 4^oC e o sobrenadante utilizado na determinação de MT ⁶³.

Para análise, 10 μ L do sobrenadante obtido foi adicionado a 10mL de solução eletrolítica e em seguida a solução foi degaseificada com nitrogênio por 10s. A análise foi realizada em modo de varredura em potencial negativo de -0,9 a -1,7V, onde o pico correspondente à presença da MT (onda catalítica de hidrogênio) é obtido em um potencial de -1,48V (figura 5). As condições instrumentais de análise foram as seguintes: amplitude do pulso de voltagem de 0,025V, duração da aplicação do pulso de voltagem de 0,057s, velocidade de 0,005V.s⁻¹ e tempo de 0,5s.

A figura 6 mostra a seqüência de reações eletroquímicas quando o método de Brdicka é utilizado para a quantificação de MT.



Concentrações: 1 - 0 mg.L⁻¹, 2 - 0,01 mg.L⁻¹, 3 - 0,05 mg.L⁻¹, 4 - 0,1, 5 - 0,25 mg.L⁻¹

Figura 5 – Polarogramas de MT purificada na faixa de 0,01 a 0,25 mg.L⁻¹.

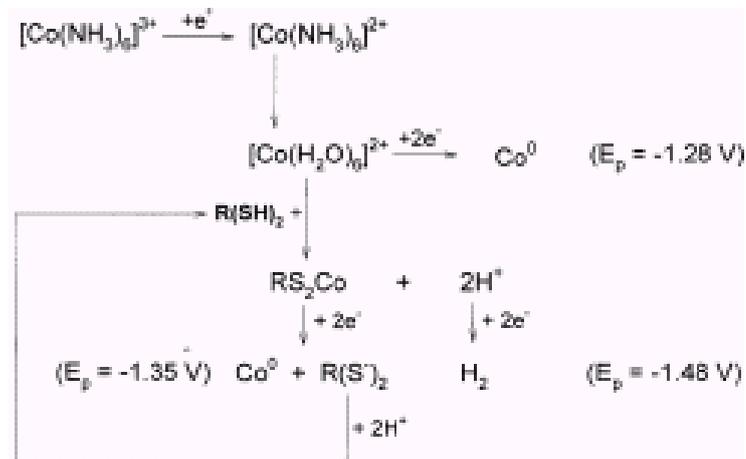


Figura 6 – Sequência de reações eletroquímicas na determinação de MT por Brdicka.

III. 8 – Análises estatísticas.

Para a comparação entre grupos de machos e fêmeas com relação às variáveis biométricas, concentração de metais e MT, foi utilizado o teste t de Student. As significâncias das correlações entre as variáveis biométricas, metais e MT foram avaliadas pelo teste de correlação de Spearman. Ambos os testes foram realizados utilizando o Programa Estatístico SPSS versão 9.0.

IV - Resultados

IV. 1 - Comparação dos parâmetros biométricos entre acarás machos e fêmeas.

Acarás foram separados por sexo para a comparação dos parâmetros biométricos peso e tamanho corporal. Para esta análise foram utilizados um total de 37 acarás. Acarás machos mostraram uma variação de peso de 24,4 a 97,1g e fêmeas entre 21,5 a 95,1g. Em relação ao comprimento total, a variação entre machos foi de 11,0 a 18,0 cm e entre fêmeas esta variação foi de 10,5 a 18,5. Os valores médios de peso e comprimento total para ambos os sexos são mostrados na tabela 3. A análise estatística dos dados pelo teste-t student mostram que o peso e o comprimento total entre acarás machos e fêmeas não apresentaram diferença significativa. Por ser uma amostra homogênea para estes parâmetros foi possível comparar machos e fêmeas com relação aos demais fatores.

Tabela 3 – Peso médio e comprimento total dos animais.

	Sexo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Peso (g)	M	22	52,2	17,8	24,4	97,1
	F	15	43,2	18,2	21,5	95,1
Compr. total (cm)	M	22	14,3	1,7	11,0	18,0
	F	15	13,2	1,8	10,5	18,5

IV. 2 - Metais : A influência do sexo, peso e tamanho corporal.

IV. 2. 1 – O fator sexo.

A concentração hepática do Zn, Cu e Cd foram determinadas em acarás machos e fêmeas para avaliar a influência do sexo, peso e tamanho na concentração de metais no tecido hepático. Os metais foram quantificados no fígado total, no citosol e na fração MT. Cd não foi detectado no tecido hepático de acarás não expostos. Em ambos os sexos, verificou-se que a concentração de Zn foi superior a concentração do Cu nas três frações hepáticas. Em acarás machos a concentração de Zn no fígado total foi de 4,6 vezes maior que a concentração de Cu e em fêmeas esta concentração de Zn foi em torno de 4,2 vezes maior. A tabela 4 mostra as concentrações médias de Zn e Cu hepático em acarás machos e fêmeas. A análise dos dados pelo teste-t student mostrou que não houve diferença significativa entre machos e fêmeas com relação à concentração de Zn e Cu hepático.

Tabela 4 – Concentração de Zn e Cu nas três frações hepáticas de acarás.

Metal	Machos	Fêmeas
	Média em µg/g N = 22	Média em µg/g N = 15
Zn total	1,48 ± 0,51	1,53 ± 0,38
Zn citosol	1,26 ± 0,38	1,25 ± 0,33
Zn fração MT	1,02 ± 0,47	0,96 ± 0,37
Cu total	0,32 ± 0,17	0,36 ± 0,19
Cu citosol	0,29 ± 0,18	0,33 ± 0,17
Cu fração MT	0,29 ± 0,19	0,29 ± 0,15
Cd Total	não detectado	não detectado
Cd Citosol	não detectado	não detectado
Cd Fração	não detectado	não detectado

IV. 2. 2 – Os fatores peso e tamanho corporal.

Os parâmetros peso e tamanho corporal foram relacionados à concentração hepática de Zn e Cu a fim de verificar a influência destes fatores no conteúdo metais no fígado de acarás (tabela 5). Para esta avaliação machos e fêmeas foram agrupados, pois não apresentaram diferença em relação à concentração de metais neste tecido como foi anteriormente mostrado. O Zn apresentou uma correlação positiva para $p < 0,01$ com o peso e tamanho corporal demonstrando que acarás maiores possuem maior quantidade de Zn neste órgão. Para o Cu não foi verificada qualquer relação entre o peso ou tamanho corporal e a sua concentração no tecido hepático. A tabela 5 mostra os valores de **r** (coeficiente de correlação de Spearman) para relação entre a concentração intracelular hepática de Zn e Cu e peso e tamanho corporal.

Tabela 5 - Relação entre a concentração hepática de Zn e Cu e os parâmetros peso e tamanho corporal. (n = 37)

		Compr. total	Peso	Corr. Spearman
Zn total	r	0,590	0,639	p<0,01
Cu total	r	0,199	0,197	não sign.

IV. 3 - MT hepática, renal e branquial: a influência do fator sexo, peso e tamanho corporal.

IV. 3. 1 - O fator sexo.

A concentração de MT foi determinada em fígado, rim e brânquias, agrupando-se os animais por sexo com o objetivo de avaliar a concentração da proteína nos diferentes órgãos e a influência do fator sexo, peso e tamanho corporal na concentração da mesma em cada órgão. Em acarás machos a concentração de MT hepática variou de 2,99 a 9,20mg/g e em fêmeas de 4,32 a 11,75 mg/g. A concentração de MT renal em machos variou na faixa de 0,78 a 3,22 mg/g e em fêmeas a concentração variou de 1,63 a 6,18 mg/g. Brânquias apresentaram concentrações que variaram de 0,88 a 3,85mg/g em machos e de 1,05 a 3,85 mg/g em fêmeas. O gráfico da figura 7 mostra os níveis de MT hepática, renal e branquial em acarás machos e fêmeas.

O fígado apresentou maior concentração média de MT ($5,73 \pm 1,47$ mg/g em machos e $7,09 \pm 1,83$ mg/g em fêmeas) para $p<0,01$ pelo teste-t Student, quando comparado aos demais órgãos em ambos os sexos. Maiores níveis de MT renal e hepática foram observados em fêmeas para $p<0,05$. Acarás machos não mostraram diferença entre os níveis de MT renal e branquial. No entanto em fêmeas verificou-se que os níveis de MT renal são superiores aos níveis de MT branquial para $p<0,05$. A concentração de MT branquial não mostrou diferença entre machos e fêmeas.

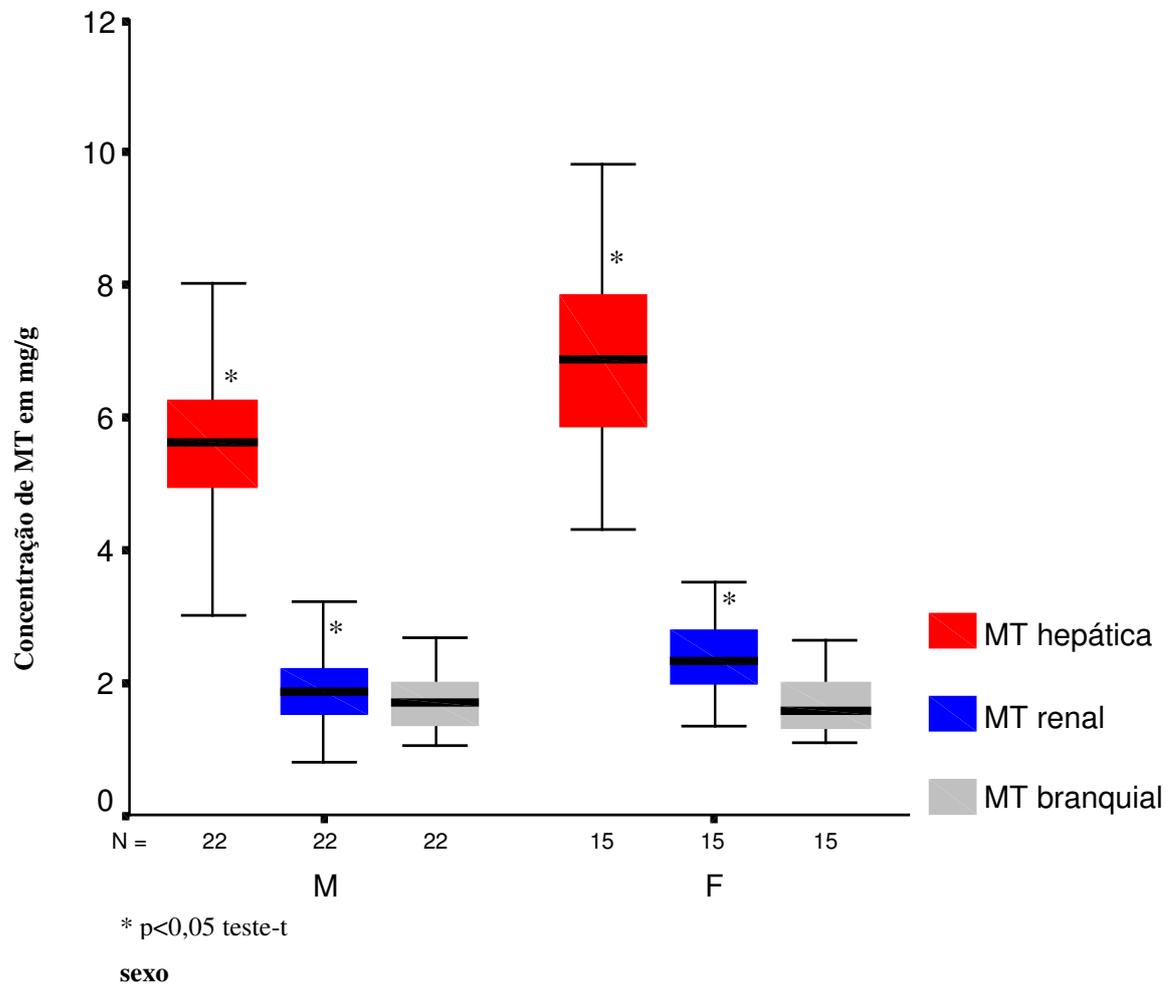


Figura 7 – Níveis de MT hepática, renal e branquial em acarás não expostos a Cd.

V. 3. 2 - Os fatores peso e tamanho corporal.

As concentrações de MT hepática, renal e branquial foram relacionadas ao peso e ao tamanho corporal de acará, a fim de verificar a influência destes fatores nos níveis da proteína nos três órgãos (tabela 6). MT hepática e renal não mostraram qualquer relação com os parâmetros biométricos nos acará, de modo que verificou-se que a concentração da proteína nestes órgãos é independente do peso ou comprimento do animal. Para a MT branquial foi verificada uma correlação positiva significativa com o comprimento e o peso dos animais para $p < 0,01$ pelo teste de correlação de Spearman. Assim, observou-se que a concentração de MT nas brânquias é maior em animais maiores. A tabela 6 mostra os valores de r para a correlação entre MT e os parâmetros biométricos em acará.

Tabela 6 – Relação entre MT hepática, renal e branquial e parâmetros biométricos. (n = 37)

		Compr. total	Peso	Corr. Spearman
MT hepática	r	0,004	0,044	não sign.
MT renal	r	-0,170	-0,192	não sign.
MT branquial	r	0,400	0,381	$p < 0,01$

IV.4 - MT hepática e a sua relação com metais.

A concentração hepática de Zn e Cu em acará foi correlacionada aos níveis de MT no fígado para avaliar a relação da proteína com ambos os metais. Os níveis de MT hepática foram mais elevados quando a concentração de Zn e Cu no órgão era mais alta, de modo que uma correlação positiva significativa $p < 0,01$ e $p < 0,05$ foi observada entre Zn e MT e Cu MT respectivamente. A tabela 7 mostra os coeficientes de correlação de Spearman obtidos para cada metal em relação a concentração de MT hepática.

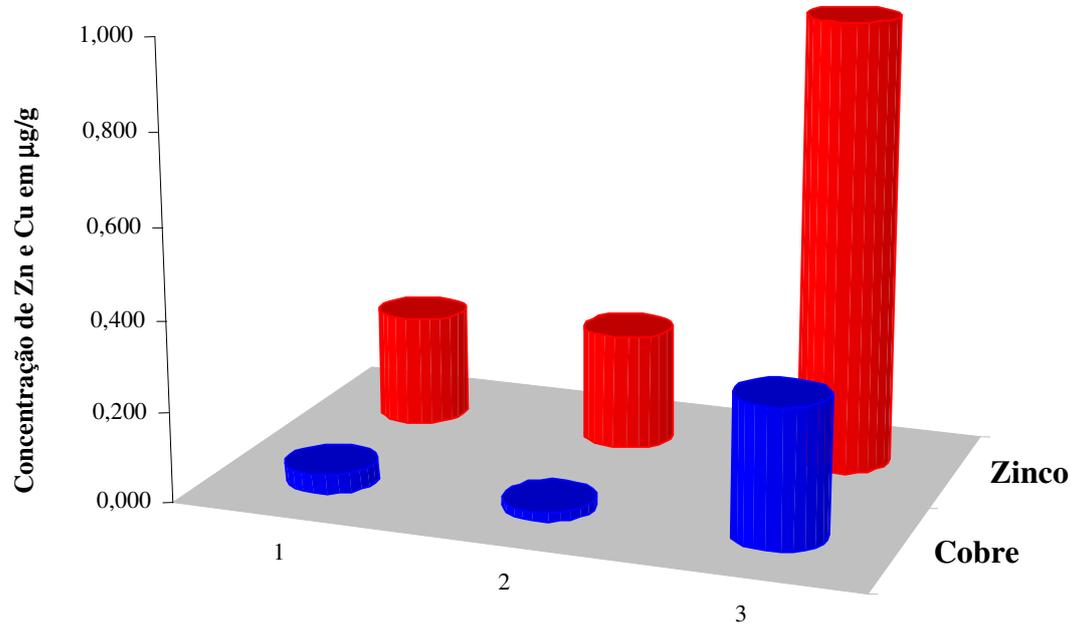
Tabela 7 – Relação entre a concentração de Zn e Cu e MT hepática. (n = 37)

		MT hepática	Corr. Spearman
Zn total	r	0,417	$p < 0,01$
Cu total	r	0,342	$p < 0,05$

IV. 4. 1 – A distribuição intracelular hepática de Zn e Cu.

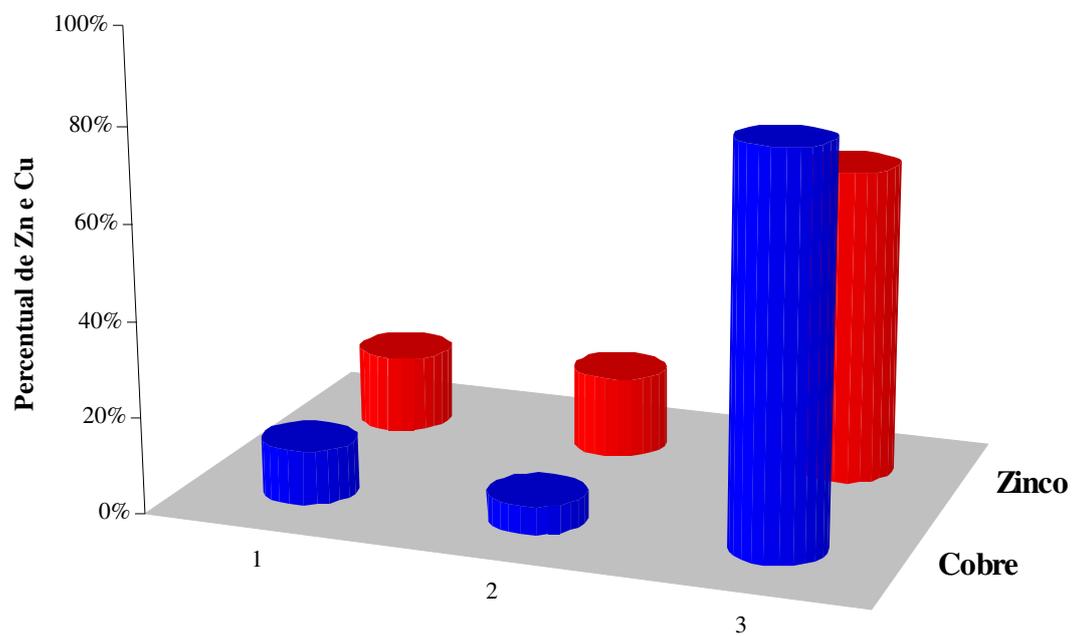
Para avaliar a distribuição intracelular hepática de Zn e Cu foram obtidas as concentrações de ambos os metais nas frações citosólica não e citosólica. A fração citosólica foi subdividida em duas frações: denominadas fração contendo MT e fração não contendo MT. A concentração de Zn e Cu não citosólico foi de 0,247 e 0,042 µg/g respectivamente. O Zn e o Cu presente na fração citosólica que não contem MT apresentaram concentrações de 0,257 e 0,021 µg/g respectivamente. As maiores concentrações de Zn e de Cu foram observadas na fração citosólica que contem a MT. Nesta fração a concentração de Zn foi de 0,996 µg/g e a de Cu 0,305 µg/g. O gráfico da figura 8 mostra a distribuição de Zn e Cu nas três frações hepáticas.

Uma distribuição percentual mostrou que 16,5% do Zn e 11,38% do Cu hepático está contido na fração não citosólica. Um percentual de 17,1% de Zn e 5,69% de Cu está contido na fração citosólica que não contém MT. Entretanto 66,4% do Zn e 82,6% do Cu encontra-se na fração que contem a MT. Assim verificou-se que embora o Zn esteja presente em maior concentração no tecido hepático, um maior percentual de Cu é encontrado na fração que contem a MT. A distribuição intracelular hepática percentual é mostrada no gráfico da figura 9.



1 = Fração não citosólica; 2 = Fração citosólica não contendo MT; 3 = Fração citosólica contendo MT.

Figura 8 – Distribuição intracelular de Zn e Cu no tecido hepático de acarás.



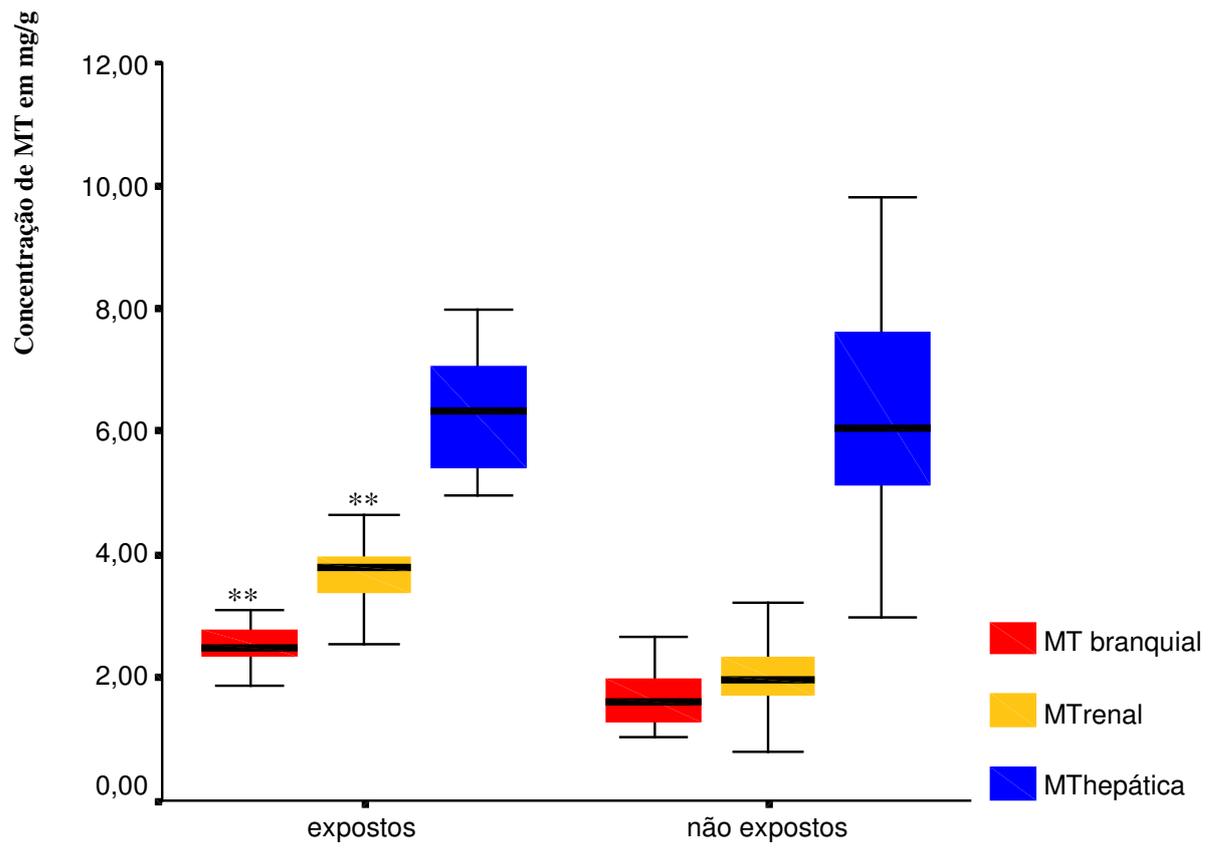
1 = Fração não citosólica; 2 = Fração citosólica não contendo MT; 3 = Fração citosólica contendo MT.

Figura 9 – Distribuição percentual de Zn e Cu intracelular no tecido hepático de acarás.

IV. 5 – MT e metais em acarás expostos a Cd.

IV. 5. 1 - MT Hepática, renal e branquial em acarás expostos a Cd.

A concentração de MT nos três órgãos de acarás expostos a Cd foi quantificada para verificar a indução da proteína pelo metal, avaliando a sensibilidade de cada órgão à exposição (figura 10). Acarás expostos a Cd apresentaram maiores níveis de MT renal e branquial em relação a acarás não expostos para $p < 0,01$ pelo teste-t student. A concentração de MT renal em acarás expostos foi de $3,71 \pm 0,79$ mg/g comparada a uma concentração de $2,20 \pm 0,88$ mg/g em acarás não expostos. A concentração branquial de MT em acarás expostos foi de $2,54 \pm 0,49$ mg/g enquanto que acarás não expostos apresentaram concentração de MT branquial de $1,68 \pm 0,56$ mg/g. A MT hepática não mostrou diferença entre acarás expostos e não expostos. Em expostos foi observada uma concentração de $6,65 \pm 1,43$ mg/g e em não expostos de $6,32 \pm 1,75$ mg/g.



** significância $p < 0,01$

Figura 10 – Níveis de MT hepática, renal e branquial em acarás expostos e não expostos a Cd.

IV. 5. 2 – A concentração hepática de Zn, Cu e Cd em acarás machos e fêmeas.

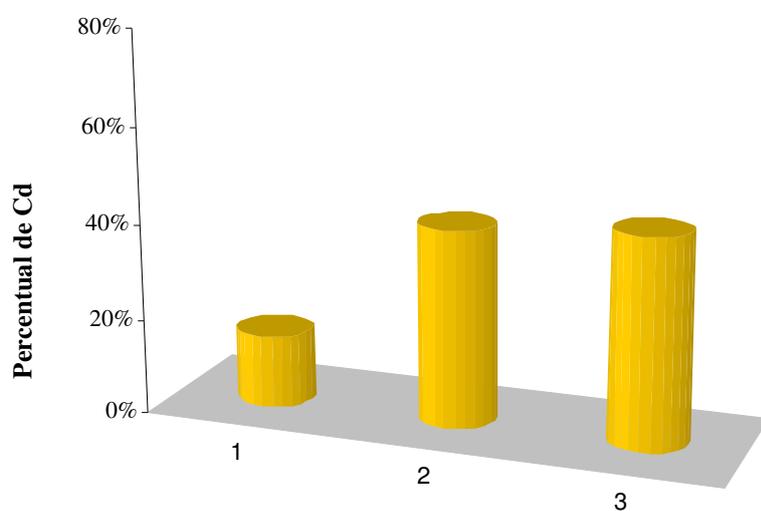
A concentração hepática Zn, Cu e Cd foi quantificada em acarás expostos a Cd (tabela 8). Maior concentração de Cd foi observada no tecido hepático de acarás expostos quando comparados à concentração de Zn e de Cu. Como observado em acarás não expostos, verificou-se que a concentração de Zn total é superior a do Cu. Machos e fêmeas não mostraram diferença com relação à concentração de Zn, Cu e Cd no tecido hepático após exposição ao Cd. No entanto, acarás expostos apresentaram menor concentração de Zn e Cu quando comparados ao grupo não expostos.

Tabela 8 - Concentração hepática de Zn, Cu e Cd em acarás expostos e não expostos a Cd.

Metal	Não Expostos média em µg/g N = 37	Expostos média em µg/g N = 14	Teste t de student
Zn Total	1,50 ± 0,43	1,09 ± 0,53	p<0,01
Zn Citosol	1,25 ± 0,34	0,99 ± 0,22	p<0,05
Zn Fração	0,99 ± 0,40	0,53 ± 0,13	p<0,01
Cu Total	0,34 ± 0,17	0,20 ± 0,07	p<0,01
Cu Citosol	0,31 ± 0,17	0,14 ± 0,05	p<0,01
Cu Fração	0,29 ± 0,17	0,11 ± 0,04	p<0,01
Cd Total	não detectado	2,24 ± 0,30	----
Cd Citosol	não detectado	1,93 ± 0,59	----
Cd Fração	não detectado	1,08 ± 0,32	----

IV. 5. 3 – A distribuição intracelular hepática de Zn, Cu e Cd em acarás expostos a Cd.

O perfil de distribuição intracelular hepático do Cd é mostrado no gráfico da figura 11. A concentração de Cd na fração não citosólica foi de 0,359µg/g, representando 15,1% do total de Cd no tecido hepático. O Cd na fração citosólica que não contém MT representa 41,2% do Cd hepático. Nesta fração encontrou-se uma concentração de 0,980µg/g de Cd. O Cd contido na fração que contém a MT equivale a 43,7% do Cd total do tecido hepático com uma concentração de 1,040µg/g. O perfil de distribuição observado para o Cd mostrou ser diferente do perfil do Zn e do Cu onde a maior concentração do metal, encontra-se na fração que contém a MT.

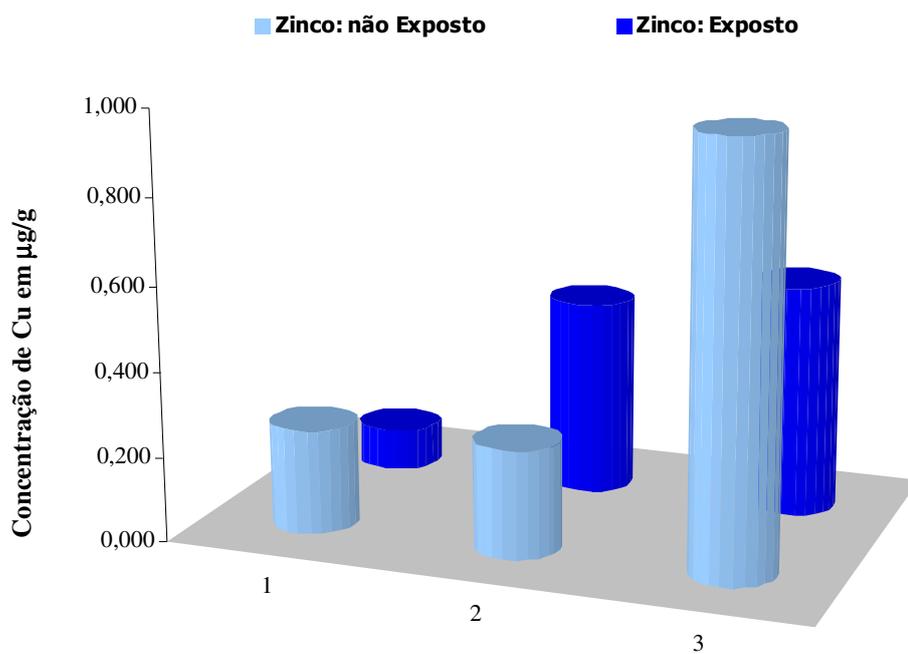


1 = Fração não citosólica; 2 = Fração citosólica não contendo MT; 3 = Fração citosólica contendo MT.

Figura 11 – Percentual de distribuição de Cd nas frações hepáticas de acarás expostos ao metal.

Após exposição ao Cd, o perfil de distribuição intracelular hepático do Zn e do Cu foi avaliado.

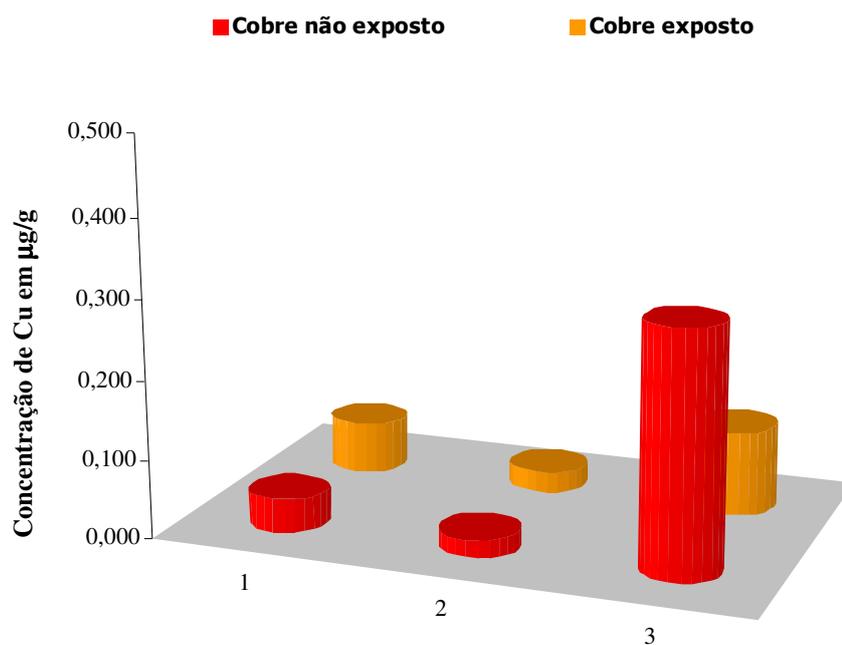
A figura 12 compara a distribuição intracelular de Zn entre acarás expostos e não expostos. Nesta avaliação, machos e fêmeas foram agrupados por não apresentarem diferença em relação à concentração do metal no tecido hepático como anteriormente mostrado. Acarás expostos apresentaram uma concentração de 0,097 $\mu\text{g/g}$ de Zn na fração não citosólica, equivalente a um percentual de 8,87% do total de Zn no tecido hepático, enquanto que em acarás não expostos foi verificada uma concentração de 0,247 $\mu\text{g/g}$ nesta mesma fração, o que equivale a 16,5% do Zn hepático. Em acarás expostos, a concentração de Zn na fração citosólica que não contém MT foi de 0,462 $\mu\text{g/g}$ e em não expostos esta concentração foi de 0,257 $\mu\text{g/g}$, de modo que em acarás expostos 42,2% do Zn total está contido na fração citosólica que não contém MT e em não expostos, apenas 17,1% encontra-se nesta fração. Assim verificou-se que após exposição ao Cd houve uma alteração da distribuição intracelular hepática do Zn, registrando-se uma diminuição do Zn na fração não citosólica e um aumento do Zn na fração citosólica que não contém MT. Na fração que contém a MT isolada, verificou-se uma concentração de Zn de 0,548 $\mu\text{g/g}$ em acarás expostos, o que representa 50,1% do Zn total hepático enquanto que em acarás não expostos foi verificado uma concentração de 0,996 $\mu\text{g/g}$, equivalente a 66,4%. O perfil de distribuição intracelular hepática de Zn e Cu em acarás expostos a cádmio é mostrado no gráfico da figura 12.



1 = Fração não citosólica; 2 = Fração citosólica não contendo MT; 3 = Fração citosólica contendo MT.

Figura 12 – Comparação da distribuição de Zn nas frações hepáticas em acarás expostos e não expostos.

A figura 13 mostra a comparação da distribuição intracelular de Cu em acarás expostos e não expostos a Cd. Acarás expostos apresentaram uma concentração de 0,064 µg/g de Cu na fração não citosólica, equivalente a um percentual de 31,5% do total de Cu hepático. Em acarás não expostos foi verificada uma concentração de 0,042µg/g nesta fração, o equivalente a 11,3%. Nos expostos, a concentração de Cu na fração citosólica que não contém MT foi de 0,026µg/g e em não expostos esta concentração foi de 0,021µg/g, respectivamente o equivalente a 12,80% e 5,69%. Maior percentual de Cu foi encontrado na fração que contem a MT tanto em expostos como em não expostos. Na fração que contem MT foi verificado uma concentração de 0,107µg/g de Cu representando um percentual de 52,7% em acarás expostos. Nos acarás não expostos, nesta mesma fração foi verificado uma concentração de 0,305µg/g de Cu, o que equivale a 82,6% do Cu hepático. Verificou-se que após exposição ao Cd, houve uma redução no percentual de Cu contido na fração que contém a MT em contraste com um maior percentual de Cu na fração não citosólica. O Cd promoveu uma alteração no perfil de distribuição intracelular hepática do Cu de modo que parte do metal foi deslocado da fração que contem MT.



1 = Fração não citosólica; 2 = Fração citosólica não contendo MT; 3 = Fração citosólica contendo MT.

Figura 13 – Comparação da distribuição de Cu nas frações hepáticas em acarás expostos e não expostos.

V - Discussão

Os estudos sobre MT em espécies de peixes têm consistido basicamente na descrição da proteína^{64, 65}, relação da MT com tolerância a metais e quantificação de MT sob condições experimentais^{66, 67} ou condições de poluição ambiental¹⁷. Entretanto, a distribuição de metais na célula e a porção de metais ligados a MT são amplamente desconhecidas¹⁷. Eles podem variar entre espécies e depender dos distintos mecanismos de regulação dos níveis de metal nos peixes⁶⁸. Além disso, existe uma ampla faixa de variação na concentração de MT e metais de acordo com a espécie e órgãos, dependendo da idade, desenvolvimento e outros fatores fisiológicos¹⁹.

Neste trabalho, MT e metais foram estudados em acará, um peixe nativo e amplamente distribuído no Brasil, avaliando suas relações com parâmetros biológicos como sexo, peso e tamanho corporal, além da distribuição intracelular de metais no tecido hepático. Os órgãos escolhidos para a quantificação de MTs foram os mais relacionados com o metabolismo dos metais, como fígado, rim e brânquias. A distribuição intracelular de metais Zn e Cu foi estudada somente no tecido hepático por ser o órgão principal de detoxificação. Os níveis hepáticos de MT também foram relacionados ao conteúdo de metal no fígado avaliando-se a relação da MT com metais neste órgão.

É geralmente aceito que a principal função das MTs esteja relacionada ao regulação dos metais no organismo, embora a exata natureza destas funções permaneçam indefinidas. Funções postuladas incluem detoxificação e estocagem de metais e a regulação do metabolismo celular de cobre e zinco em resposta a alterações fisiológicas e ambientais.

Os sistemas subcelulares estão envolvidos no acúmulo, regulação e compartimentalização de metais, e isto inclui a ligação dos metais a proteínas como a MT, inclusão em lisossomas e grânulos. A distribuição intracelular de certos metais, sua toxicidade, detoxificação, transporte e homeostasia de elementos traços (Zn e Cu) são regulados pela MT⁶⁹. A MT endógena e induzida pode ligar-se a metais como Zn, Cu, Cd, Hg dependendo da natureza e/ou afinidade de cada metal pela proteína. A capacidade de indução das MTs é maior nos tecidos que estão envolvidos nos processos metabólicos como captação, acúmulo e excreção. Assim, órgãos como fígado, rim, brânquias são destacados com relação a quantificação de MT e metais em estudos descritivos e de exposição a metais^{16, 41}. O Cd é um potente indutor da MT e a exposição ao mesmo pode alterar a distribuição intracelular de metais em determinados

órgãos. Tais alterações foram inicialmente estudadas por Petering em 1978⁷⁰. Posteriormente verificou-se que essas alterações eram dependentes de condições específicas de exposição⁵⁶.

Assim, nesse estudo, um grupo de acarás também foi exposto a Cd por injeção intraperitoneal avaliando-se alterações da homeostasia como indução da MT hepática, renal e branquial e alterações na distribuição intracelular hepática dos metais essenciais Zn e Cu promovidas pela exposição ao metal já que tais alterações têm sido propostas como um indicador de toxicidade⁷¹.

V. 1 - Metais e parâmetros biológicos.

Para o estudo foi feita uma amostragem homogênea entre acarás machos e fêmeas com relação aos parâmetros biométricos peso e comprimento total. A homogeneidade dos indivíduos nessa amostragem com relação a estes parâmetros possibilitou a comparação entre machos e fêmeas com relação a diferentes fatores, sem a interferência do peso ou tamanho diferenciado entre os sexos.

A influência do sexo, peso e tamanho corporal na concentração hepática de Zn e Cu foi avaliada em acarás, pois diferenças na concentração de metais em peixes podem ser devidos a diferentes fatores. Ao lado da exposição a metais, fatores endógenos como sexo e idade devem ser considerados⁷. No entanto os acarás utilizados neste estudo não apresentam uma ampla variação de tamanho corporal de modo a permitir agrupá-los por faixa etária.

Em relação ao fator sexo, estudos têm mostrado diferenças na concentração de metais entre sexos durante o ciclo reprodutivo em *rainbow trout* (trutas)^{51, 72, 73}. Em *Salmo salar* (salmão), maiores níveis de metais foram observados em fêmeas durante o processo ovulatório⁷⁴. No entanto, neste estudo, acarás fêmeas não foram agrupadas em ovuladas e não ovuladas para que um “n” representativo pudesse ser utilizados nas avaliações comparativas. Além disso, o número de fêmeas ovuladas em um total de 15 exemplares foi considerado irrelevante para um estudo comparativo. Assim, entre acarás machos e fêmeas não se observou uma diferença significativa no conteúdo hepático de metais de modo que na ausência de um processo ovulatório, o conteúdo hepático de Zn e Cu em acarás fêmeas é semelhante aos encontrados em acarás machos.

Segundo Kraemer, 2005, a taxa de crescimento do animal pode influenciar a concentração de metal no organismo, enquanto outros estudos realizados em *Brown*

Trout (trutas) e *Anguilla anguilla* (enguias) verificam que o fator crescimento não afeta a concentração de metal no organismo^{7, 75, 76}. Logo, verifica-se que a influência do tamanho e peso do animal na concentração de metais pode variar de acordo com a espécie. Em acaráis observou-se que um maior conteúdo de Zn hepático foi verificado em acaráis maiores de modo que o Zn nesta espécie é influenciado pelos parâmetros biométricos do animal. Tem-se demonstrado em algumas espécies que o tamanho do animal têm um papel importante no acúmulo, metabolização e concentração do metal no organismo e, o acúmulo de metais nos seres vivos, não depende somente da biodisponibilidade do metal¹⁶. Acredita-se então, que as maiores concentrações de Zn observadas nos acaráis maiores estejam relacionadas às necessidades fisiológicas e metabólicas da espécie, pois se sabe que o metal é essencial para estrutura e funcionamento de várias metaloenzimas, as quais participam de uma variedade de processos metabólicos celulares²⁶.

Em relação ao Cu, não foi verificada qualquer correlação entre sua concentração no fígado e o peso e tamanho corporal de modo que o conteúdo deste metal não é alterado com o tamanho do animal. Resultados semelhantes foram observados em *Brown Trout* (trutas) e *Anguilla anguilla* (enguias)^{7, 76}. Em *liza aurata* (mullet) observa-se que o Cu está relacionado ao tamanho e peso corporal do animal, onde animais maiores apresentaram maior conteúdo deste metal no citosol¹⁶. Assim, observa-se que existe uma diferença interespecífica com relação ao metabolismo ou acúmulo de metais em peixes. A não relação observada entre o tamanho e peso corporal em acaráis mostra que não há um processo de acúmulo do metal ocorrendo nesses animais.

V. 2 – MT e parâmetros biológicos.

MTs têm um papel regulatório nos processos metabólicos Zn-dependentes e podem atuar como um estoque de Zn e Cu necessários à síntese de metaloenzimas e metaloproteínas no organismo. O controle do fluxo de Zn em animais, onde muitas vezes o Zn é o maior ou único metal presente na estrutura da proteína, também pode ser atribuído às Mts^{15, 77}.

Como observado em estudos em outras espécies de peixes⁷⁸, foi demonstrado que a concentração de MT em acaráis é órgão-específica, de modo que os maiores níveis da proteína são observados no tecido hepático e renal, encontrando-se menor quantidade em brânquias. O maior conteúdo de MT observado no tecido hepático dos acaráis, assim

como em outras espécies, está associado ao fato de que o fígado constitui um dos principais órgãos relacionado ao metabolismo de forma geral, de modo que as maiores concentrações de MT encontradas neste órgão em ambos os sexos pode estar relacionado ao papel do mesmo no metabolismo e na regulação homeostásica dos metais¹⁶.

A influência do sexo na concentração de MT já foi evidenciada em diversas espécies animais e os níveis de MT em peixes tendem aumentar devido a fatores hormonais. Acarás fêmeas apresentaram maiores níveis de MT hepática e renal em relação a acarás machos, o que pode estar associado à indução da proteína por hormônios em fêmeas⁷⁹.

A MT participa de processos metabólicos de regulação de metais essenciais e de detoxificação de metais pesados, e alguns desses processos, sofrem alterações de acordo com o tamanho e peso do animal. Em acarás, não foi observada uma relação entre os níveis de MT hepática e renal e os parâmetros peso e tamanho corporal. No entanto observou-se que acarás maiores possuem maiores níveis de MT nas brânquias. As brânquias são as principais vias de captação de metais estando em contato direto com o meio externo. A captação envolve a ligação a sítios específicos nas células epiteliais e como as MTs atuam na regulação homeostásica de metais e as necessidades metabólicas são alteradas de acordo com o crescimento, acredita-se que uma maior concentração de MT branquial seja necessária para o controle e regulação da homeostasia dos metais neste órgão em acarás maiores⁴⁴.

V.3 - Relação entre MT hepática e metais.

MTs desempenham um papel fundamental na regulação intracelular de metais. A relação entre os metais Zn e Cu e a MT hepática foi avaliada nos acarás observando-se uma relação linear entre a MT e ambos os metais. Esta relação já foi demonstrada em outras espécies de peixes mostrando como os níveis basais de Zn e Cu estão relacionados a MT, possivelmente devido ao papel da proteína na metabolização e regulação homeostásica dos metais⁸⁰. O metabolismo do Zn nos hepatócitos está intimamente relacionado a MT e sua expressão é regulada pelo conteúdo de Zn na célula, o que pode explicar a relação encontrada entre a proteína e o metal nos acarás⁸¹. Em relação ao Cu, MT desempenha um importante papel na detoxificação do metal além de estar envolvida na sua captação, estocagem e transferência no organismo^{82, 83, 84}.

A um nível subcelular existe uma fundamental similaridade no metabolismo de Zn e Cu, de modo que quando o nível intracelular desses elementos aumenta, uma significativa porção do excesso do metal se associa a MT^{5, 37, 51}. A capacidade de quelatação do Cu do ambiente intracelular torna-se mais eficiente quando os sistemas de detoxificação e estocagem desempenhados pela MT são induzidos. Assim, os resultados observados em acarás mostram o papel da MT no equilíbrio homeostático do Zn e Cu, capaz de ligar o excesso desses metais nesta espécie^{9, 41}. Uma ausência de correlação entre ambos os metais e a MT pode ser observada quando o metal excede a capacidade de ligação pela MT, o que ocorre em casos de exposição a elevadas concentrações desses metais. Nesses casos o excesso de metal é ligado por proteínas de alto peso molecular ou ligantes não-tioneínas^{41, 85, 86}. Tal fato não foi observado nos acarás estudados de modo que se acredita que ambos os metais encontram-se em equilíbrio homeostático com a MT no tecido hepático.

V.4 - Distribuição intracelular dos metais.

A distribuição intracelular de metais reflete o processo interno que ocorre durante o acúmulo de metais e fornece informações sobre a toxicidade e tolerância em relação à exposição a metais tóxicos⁴⁸. Alguns dos efeitos deletérios ocasionados pela exposição a metais são relacionados à distribuição intracelular dos mesmos de modo que a presença do metal em maior ou menor concentração em determinados compartimentos celulares pode determinar sua toxicidade⁸⁷. Manifestações de toxicidades subletais podem coincidir com alterações na distribuição intracelular de metais, particularmente nos casos onde ocorre uma saturação de certos sistemas de detoxificação⁴⁸. Assim, o conhecimento da compartimentalização intracelular de metais é essencial para a compreensão dos mecanismos de toxicidade exercido por metais nos organismos⁸⁸.

Em peixes existe uma grande variação entre o conteúdo de metais no tecido hepático, de modo que em algumas espécies o Cu é o metal mais abundante neste tecido, enquanto que em outras o Zn encontra-se em maior concentração. Além disso, diferentes perfis de distribuição intracelular e mecanismos diferenciados de compartimentalização e acúmulo em algumas espécies contribui para uma maior ou menor tolerância à exposição a metais pesados. A capacidade de alguns peixes em

tolerar altos níveis de metais está relacionada aos diferentes mecanismos de metabolização de metais, associado a sua distribuição intracelular ⁸⁹.

A distribuição intracelular de Zn e Cu no tecido hepático de acarás mostrou que ambos os metais encontram-se predominantemente no citosol hepático. Um maior conteúdo de Zn e Cu foram encontrados na fração citosólica que contém a MT, o que reflete a relação anteriormente observada entre a proteína e os metais. Esta distribuição intracelular mostra que esta fração tem um papel crucial no metabolismo de metais. Esta distribuição também foi verificada em outras espécies de peixes como em *Anguilla anguilla* e *Salmo trout*, onde a maior parte do Zn e do Cu contido no tecido hepático foi encontrada no citosol ⁸⁹.

A avaliação da distribuição intracelular mostra a compartimentalização dos metais independente do seu maior ou menor conteúdo na célula. Um maior percentual de Zn na fração citosólica que não contém a MT em relação ao Cu, indica uma maior associação do metal a outras proteínas citosólicas diferentes da MT, como proteínas estruturais e outras metaloproteínas ²⁶. O percentual de Cu na fração que contém a MT foi superior ao percentual de Zn, embora este último esteja em maior concentração no tecido hepático. A predominância do Cu no citosol mostra sua maior associação a MT e este perfil de compartimentalização também foi verificado em *Salmo trout* (salmão) em condições normais e de exposição ^{17, 90}. Esta maior associação do Cu a MT pode estar relacionado à maior capacidade do metal em formar espécies reativas com oxigênio promovendo danos tóxicos, de modo que a ligação do metal a proteína, constitui um mecanismo de defesa celular impedindo que Cu exerça sua toxicidade ^{21, 22}. Porém, os processos de metabolização e detoxificação podem variar de acordo com a espécie animal. Diferentes mecanismos de detoxificação são acionados quando ocorre uma saturação do sistema metabólico. Em peixes que acumulam Cu, o aumento do conteúdo hepático do metal não equivale a um maior conteúdo de Cu associado a MT, e o elevado conteúdo de Cu não ligado a MT não causa nenhum efeito tóxico no fígado do animal. Os efeitos tóxicos determinados pelo Cu não estão relacionados à sua taxa de acúmulo no tecido hepático, mas sim a sua distribuição intracelular no órgão. Em *Mugil mugil*, um peixe com altos níveis de Cu no tecido hepático, 95% do metal está contido na fração não citosólica de modo que o seqüestro do metal nesta fração protege a célula dos efeitos tóxicos do metal ⁸⁹. Esses diferentes perfis de distribuição podem determinar maior ou menor tolerância à toxicidade dos metais ⁹¹.

V.5 – MT e metais em acarás expostos ao Cd

Cd é considerado um potente indutor da MT nos organismos vivos e seus efeitos tóxicos são ocasionados pela sua ligação a sítios celulares específicos como, por exemplo, proteínas de alto peso molecular. Os efeitos tóxicos da exposição a Cd também são dependentes de alguns fatores como condições de exposição, concentração e distribuição intracelular de metais essenciais e indução da MT ⁹².

A análise dos níveis de MT em acarás expostos a Cd comparados a acarás não expostos mostrou uma indução da MT renal e branquial. No entanto nenhuma indução foi observada no fígado. Vários estudos têm sido realizados em organismos em que metais tóxicos são introduzidos intraperitonealmente. Assim, elevadas concentrações de MT têm sido medidas em órgãos de diferentes espécies de peixes tais como fígado e rim, de *Cyprinus carpio* (carpa), em brânquias, fígado e rim de *Scophthalmus maximus* (turbot), e em fígado de *Oncorhynchus mykiss* (truta) para avaliar o processo de indução da MT nos diferentes órgãos alvos após exposição a metais, observando-se as diferenças interespecíficas com relação à indução da proteína ^{56, 92, 93, 94}. Estudos realizados em *Cyprinus carpio* por Cosson em 1994 e De Conto Cinier et al. em 1998, mostraram diferenças entre órgãos com relação à indução da MT de modo que a exposição a 1 mg/L (8,9 mmol.L⁻¹) de Cd por uma semana causou um aumento da MT em brânquias, mas nenhum aumento significativo foi observado no fígado. Somente em animais expostos a 0,44 mg/L (3,9 mmol.L⁻¹) de Cd por 115 dias, foi observado um aumento dos níveis de MT no tecido hepático e renal ^{95, 96}. Assim, pode-se verificar que o tempo de exposição é um fator importante na indução da MT entre os diferentes órgãos de modo que nos acarás, acredita-se que o tempo de exposição de 36h não foi suficiente para induzir a MT hepática, o que provavelmente ocorreria em um maior período de exposição.

Block et al., 1991, apontaram as MTs como principais sítios de ligação subcelular para o Cd, e mostrou que o tempo de exposição pode ser mais importante que a via, considerando diferenças na distribuição intracelular do metal ⁹⁷. A distribuição intracelular do Cd em acarás expostos mostrou que o metal está contido predominantemente no citosol hepático, distribuído entre a fração que contém e a que não contém a MT. Esta distribuição mostra uma associação do Cd a proteínas citosólicas diferentes da MT ⁵⁶. Assim, o perfil de distribuição verificado para o Cd

nesta espécie não foi considerado uma distribuição específica observada em acarás, mas sim um perfil obtido por 36h de exposição ao metal.

O Cd pode ter efeitos potenciais para a mobilização e distribuição intracelular de metais essenciais de modo que o conteúdo e/ou padrão de distribuição celular de Zn e Cu pode ser alterado após exposição do organismo ao metal ⁷⁰.

Metais como Zn, Cu e Cd em peixes são intracelularmente regulados e detoxificados pela ligação a MT no citoplasma celular podendo ser excretados como resíduos corporais pela ação dos lisossomos ^{66, 98}. Acarás expostos apresentaram menores concentrações de Zn e Cu hepático comparado a acarás não expostos. A redução na concentração de ambos os metais pode estar relacionada ao processo de detoxificação ativado pelo Cd para captação, seqüestro e eliminação deste metal tóxico no tecido hepático dos acarás de modo que ao detoxificar o Cd também se eliminou Zn e Cu. Então, verifica-se um metabolismo intrínseco relacionado à eliminação de metais essenciais do organismo após a exposição a Cd, e os efeitos de toxicidades também podem estar relacionados com essa redução de Zn e Cu, já que estes metais são necessários para vários processos metabólicos no organismo ⁴⁸.

Os efeitos tóxicos do Cd são dependentes de um maior ou menor conteúdo de Zn ou Cu no órgão alvo de modo que as diferentes afinidades destes metais pela molécula de MT podem ser determinantes para uma maior ou menor sensibilidade do organismo aos efeitos da exposição ao metal ^{66, 98}. O conteúdo de Cd ligado pela MT pode estar relacionado a presença de metais essenciais na célula, de modo que o Zn pode ser deslocado da MT pelo Cd devido a afinidade deste último pela molécula ser maior. Porém, uma maior afinidade do Cu em relação ao Cd pela MT não possibilita o deslocamento do Cu da molécula ^{92, 99}.

Alterações na distribuição intracelular do Zn e do Cu determinadas pela exposição ao Cd foram observadas em acarás e um menor percentual de Zn na fração que contém a MT foi observado em relação aos não expostos. O Zn satura os sítios de ligação da MT, no entanto o aumento da concentração de Cd pode deslocar o Zn ligado à proteína ^{92, 99}. A redução no conteúdo de Zn observado na fração que contém a MT pode ser devido ao deslocamento do metal promovido pelo aumento da concentração de Cd no fígado dos acarás. Esse deslocamento permite observar o papel da MT no processo de detoxificação do Cd ao mesmo tempo em que se mostra a alteração na distribuição do Zn citosólico promovido pelo metal. O deslocamento do Zn e a

conseqüente ligação do Cd a MT constituem um fator de proteção celular realizado pela proteína de modo que o seqüestro do Cd impede que o metal exerça sua toxicidade pela ligação a outros alvos celulares. Assim, uma menor suscetibilidade a toxicidade por exposição a Cd pode ocorrer em peixes com elevados níveis de Zn.

Diferentemente do Zn, o Cu não é deslocado da MT pelo aumento dos níveis de Cd ⁹². Estas diferenças com relação à afinidade dos metais pela proteína podem determinar diferenças na toxicidade do Cd caso o animal possua mais Zn ou Cu no tecido hepático.

Em acarás expostos observou-se que um maior percentual de Cu foi observado na fração não citosólica e um menor percentual foi verificado na fração que contém a MT em comparação a acarás não expostos. A maior parte do Cu intracelular está localizado na fração que contém a MT, e após exposição ao Cd, acredita-se que após o deslocamento do Zn da MT e a ligação do Cd pela proteína, a mesma seja compartimentalizada nos lisossomos para posterior eliminação. A inclusão do complexo metal-MT pelos lisossomos constitui um subseqüente processo de detoxificação celular após ligação do metal a MT. A ativação deste sistema de detoxificação acarreta o deslocamento do Cu para outras frações celulares. Em vertebrados, o fígado é o principal órgão de excreção de Cu pela bile, e a excreção do metal por esta via se deve à localização sub-celular do Cu na fração não citosólica, especialmente nos lisossomos em casos de exposição ao metal e conseqüente ativação dos processos de detoxificação. Este mecanismo utilizado pela célula para regular a concentração intracelular de metal bem como a detoxificação por exposição a um metal tóxico, pode explicar um menor conteúdo de Cu na fração que contém a MT e um conseqüente aumento na fração não citosólica após exposição ao Cd.

A compreensão dos parâmetros capazes de alterar os níveis MTs e metais em diferentes espécies nos fornece subsídios básicos e indispensáveis na utilização das mesmas como espécies bioindicadoras em estudos de avaliação dos efeitos da contaminação ambiental por metais pesados. Além disso, o conhecimento dos processos fisiológicos relacionados à regulação de metais pela MT e as alterações promovidas pela exposição a um metal tóxico auxilia na compreensão dos mecanismos utilizados pela espécie na detoxificação e dos efeitos tóxicos ocasionados por metais.

VI – Conclusão

Em acarás, o fígado é o órgão que contém os maiores níveis de MTs, sendo estes superiores aos dos rins e das brânquias. Os níveis de MT hepática não estão relacionados ao tamanho e o peso corporal, e somente a MT branquial apresenta maiores níveis em animais maiores. Entretanto, o fator sexo está relacionado aos níveis de MT no fígado e nos rins, onde os maiores níveis da proteína são encontrados em acarás fêmeas.

Nesta espécie de peixe, o Zn é mais abundante que o Cu no tecido hepático e seus níveis estão relacionados positivamente com o peso e o tamanho corporal. Entretanto, as concentrações de Zn e Cu no tecido hepático de acarás não estão relacionadas ao sexo do animal.

Os níveis hepáticos de MT em acarás estão relacionados positivamente ao conteúdo de Zn e Cu neste órgão. Em acarás, Zn e Cu no tecido hepático mostram-se predominantemente no citosol, onde ambos encontram-se em maior quantidade na fração que contém a MT. Porém, a distribuição citosólica do Zn é diferente da do Cu, mostrando uma maior associação do Zn na fração citosólica que não contém a MT, enquanto o Cu encontra-se quase totalmente na fração que contém a MT.

A exposição de acarás a Cd, nas condições experimentais deste estudo, induz a MT em rim e brânquias e produz uma alteração na distribuição intracelular hepática de Zn e Cu. A exposição a Cd no tecido hepático também promove uma redução na concentração total destes metais essenciais e um deslocamento dos mesmos da fração que contém a MT.

De um modo geral, MT e metais em acarás são influenciados por parâmetros biológicos e por exposição ao Cd, e tais influências devem ser consideradas para utilização desta espécie como bioindicador da exposição ambiental a metais pesados.

- 47 - Lanno BH, Hilton JW. 1987. Histological observations on intrahepatocytic copper-containing granules in rainbow trout reared on diets containing elevated levels of copper, *Aquat. Toxicol.* 10: 251–263.
- 48 - Wallace B, Lee G, Luoma SN. 2003. Sub-cellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249: 183–197.
- 49 - Sola F, Isaia J, Masani A. 1995. Effects of copper on gill structure and transport function in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Appl. Toxicol.* 15. 5: 391-398.
- 50 - Alam MK, Morghan OE. 1995. Acute toxicity of heavy metals to common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal Environmental Science Health Part A.* 30 (8): 1807-1816.
- 51 - Olsson PE, Hogstrand C. 1987. Subcellular distribution and binding of cadmium to metallothionein in tissues of rainbow trout after exposure to ¹⁰⁹Cd in water. *Environ. Toxicol. Chem.* 6: 867 - 874.
- 52 - Larsson A, Bengtsson, BE, Haux C. 1982. Disturbed ion balance in flounder, *Platichthys flesus*, exposed to sublethal levels of cadmium. *J. Environ. Biol.* 3: 71-81.
- 53 - Viarengo A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates: Mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Rev. Aquat. Sci.* 1: 295-317.
- 54 - Dethloff GM, Schlenk D, Khan S, Bailey HC. 1999. The effects of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archieve Environmental. Contamination Toxicology* 36: 415–423.
- 55- Chowdhury MJ, Pane EF, Wood CM. 2004. Physiological effects of dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge in rainbow trout: respiratory, ionoregulatory, and stress parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*.in press.

56 - Castano A, Carbonell G, Carballo M, Fernandez C, Boleas S, Tarazona JV. 1998. Sublethal Effects of Repeated Intraperitoneal Cadmium Injections on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41: 29–35.

57 - Fowler BA. 1987. Intracellular compartmentation of metals in aquatic organisms: relationships to mechanisms of cell injury. *Environmental Health Perspective*. 71: 121-128.

58 - Welcomme, R.L., 1988. International introductions of inland aquatic species. *FAO Fish.Tech. Pap.* 294-318.

59 - Kullander SO, Ferraris, C.JJ. 2003. Cichlidae (Cichlids) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil p. 605-654.

60 - Ueng YF, Liu C, Lai CF, Meng LM, Ung YY, Ueng TH. 1996. Effects of cadmium and environmental pollution on metallothionein and cytochrome P-450 in tilapia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57: 125-131.

61 - Bebianno M J, Cravo A, Miguel C, Morais S. 2003. Metallothionein concentrations in a population of *Patella aspera*: variation with size. *The Science of The Total Environment* Vol. 301. Issues 1-3: 151-161.

62 - Raspor B. 2001 - Elucidation of the mechanism of the Brdicjka reaction. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 503: 159–162.

63 - Marijana E, Ivankovic D, Raspor B, Pavickic J, Boscko R. 2002. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. *Talanta* 57: 1211–1218.

64 - Hidalgo J, Tort L, Flos R. 1985. Cd-, Zn-, Cu-Binding protein in the elasmobranch *Scyliorhinus canicula*. *Comparative Biochemistry Physiology*. C 81. 1: 159-165.

65 - Bonwick GA, Vas P, Fielden PR, Gordon JDM. 1990. Metallothionein-like proteins in the livers of squaloid and carcharhinid sharks. *Marine Pollution. Bulletin.* 21(12): 567-570.

66 - Hamilton SJ, Mehrle PM, Jones JR. 1987. Evaluation of metallothionein measurement as a biological indicator of stress from cadmium in brook trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116: 551-560.

67 - Weber DN, Eisch S, Spieler RE, Petering DH. 1992. Metal redistribution in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in response to restraint stress and dietary cadmium: Role of metallothionein and other metal-binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol* 101(2): 255-262.

68 - Roesijadi G. 1992. Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals: a review. *Aquat. Toxicol.* 22: 81-114.

69 - Tandon SK, Singh S, Prasad S, Mathur N. 2001. Hepatic and renal MT induction by an oral equimolar dose of zinc, cadmium or mercury in mice. *Food and chemical toxicology* 39: 571-577.

70 - Petering HG. 1978. Some observations on the interaction of zinc, copper, and iron metabolisms in lead and cadmium toxicity. *Environ. Health. Perspect.* 25: 141-145.

71 - George SG. 1992. Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals. In: *Heavy Metals in the Marine Environment* (W. R. Furness and P.S. Rainbow, Eds.). Plenum Press, New York. 123-142.

72 - Olsson PE, Zafarullah M, Foster R., Hamor T, Gedamu L. 1990. Developmental regulation of metallothionein mRNA, zinc, and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Eur. J. Biochem.* 193: 229 - 235.

73 - Overnell J, McIntosh R, Fletcher TC. 1987. The levels of liver metallothionein and zinc in plaice, *Pleuronectes platessa*, during the breeding season, and the effect of oestradiol injection. *J. Fish. Biol.* 43: 539-546.

74 - Wesson LJ, Hunt RV, Freeman HC, and Klaverkamp JF. 1991. Responses of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) to acidic rivers in nova scotia and to various diets: metals and metallothionein in liver and kidney. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100(3): 657 - 663.

75 - Kraemer LD, Campbell PGC, Hare Landis. 2005. Seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations and in the sub-cellular distribution of these metals in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) *Environmental Pollution* 1-13.

76 - Linde AR, Sánchez-Galán S, Izquierdo JI, Arribas P, Marañón E, García-Vázquez E. 1998. Brown Trout as Biomonitor of Heavy Metal Pollution: Effect of Age on the Reliability of the Assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 40: 120-125.

77 - Karin M. 1985. Overview of Metallothionein . *Cell*. 41. 9.

78 - Zhang L, Wang WX. 2005. Effects of Zn pre-exposure on Cd and Zn bioaccumulation and metallothionein levels in two species of marine fish *Aquatic Toxicology* 73: 353–369.

79 - Rotchella JM, Clarke KR, Newton LC, Bird DJ. 2001. Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Marine Environmental Research* 52. 2: 151- 171.

80 - O'Halloran TV, Culotta VC. 2000. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* 275: 25025–25060.

81 - Schroeder JJ, Cousins RJ. 1991 - Metallothionein and Zinc Metabolism in Hepatocytes *Methods in Enzymology*. 205: 575-583.

82 - Kojima Y, Kägi JHR. 1978. Metallothionein. *Trends Biochemistry Science*. 3: 90-93.

83 - Kägi JHR, Kojima Y. 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experienta*. 52: 25-61.

84 - Hunziker PE, Sternlieb I. 1991. Copper metallothionein in patients with hepatic copper overload. *European Journal Clinic Investigation*. 21: 466-471.

85 - Kito H, Ose Y, Sato T. 1986. Cadmium-binding protein (metallothionein) in carp. *Environmental Health Perspective*. 65: 117– 124.

86 - Chaffai AH, Triquet CA, Abed AE. 1997. Metallothionein like protein: is it an efficient biomarker of metal contamination? A case study based on fish from the Tunisian Coast. *Archieve Environmental Contamination Toxicology*. 33: 53–62.

87 - Guiguère A, Campbell PGC, Hare L, Couture P. 2005. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca .avescens*) sampled along a polymetallic gradient *Aquatic Toxicology*. In press.

88 - Kurelec B. 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical Review Toxicology*. 22: 23-43.

89 - Linde AR, Klein D, Summer KH. 2005. Phenomenon of Hepatic Overload of Copper in *Mugil cephalus*: Role of Metallothionein and Patterns of Copper Cellular Distribution. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 97 (4): 230-235.

90 - McCarter JA, Matheson AT, Roth RW, Olafson RW, Buckley JT. 1982. Chronic exposure of Coho salmon to sublethal concentrations of copper II. Distribution of copper between high- and low molecular-weight proteins in liver cytosol and the possible role of metallothionein in detoxification. *Camp. Biocheffl. Physiol*. 72: 21-26.

91 - Mehra RK, Bremner I. 1984. Species differences in the occurrence of copper-metallothionein in the particulate fractions of the liver of copper-loaded animals. *Biochem. J*. 227: 903-938.

92 - Hans De Smet. Wachter BD, Lobinski R, Blust R. 2001. Dynamics of (Cd,Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Aquatic Toxicology* 52: 269–281.

93 - Ariyoshi T, Shiiba S, Hasegawa H, Arizono K. 1990. Profile of metal-binding proteins and heme oxygenase in red carp treated with heavy metals, pesticides and surfactants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 643–649.

94 - George SG, Todd K, Wright J. 1996. Regulation of metallothionein in teleosts: induction of MT mRNA and protein by cadmium in hepatic and extrahepatic tissues of a marine flatfish, the turbot (*Scophthalmus maximus*) the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

95 - Cosson RP, Amiard JC. 1998. Utilisation des metallothioneines comme biomarqueurs d'exposition aux métaux. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F. (Eds.). *Utilisation de Biomarqueurs pour la Surveillance de la Qualité de l'Environnement*. 78–109.

96 - De Conto Cinier C., Petit-Ramel M, Faure R, Bortolato M. 1998. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. *Bulletin. Environmental Contamination Toxicology*. 61: 793–799.

97 - Block M, Glynn AW, Part P. 1991. Xanthate effects of cadmium uptake and intracellular distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Aquatic Toxicology*. 20: 267–284.

98 - Norey CG, Lees WE, Darke BM, Stark JM, Baker TS, Cryer A, Kay J. 1990. Immunologica distinction between piscine and mammalian metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol.* OSB. 597-601.

99 - Palmiter RD. 1994. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appear to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor MTF-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 1219–1223.

VII - Bibliografia

- 1 - Nordberg M. 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta* 46: 243–254.
- 2 - Margoshes M, Vallee BL. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc* 79. 4813.
- 3 - Olafson RW, Thompson JAJ. 1974. Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Mar. Biol.* 28: 83-86.
- 4 - Bouquegneau JM, Gerday C, Disteche A. 1975. Fish mercurybinding thionein related to adaptation mechanisms. *FEBS.* 55: 173-177.
- 5 - Kito H, Ose Y, Mizuhira V, Sato T, Ishikawa T, Tazawa T. 1982. Separation and purification of (Cd, Cu, Zn)-metallothionein in carp hepato-pancreas. *Comparative Biochemistry Physiology* 73: 121–127.
- 6 - Ley HL, Failla ML, Cherry DS. 1983. Isolation and characterization of hepatic metallothionein from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 74B: 507–513.
- 7 - Linde AR, Sanchez-Galan S, Klein D, Garcia-Vazquez E, Summer KH. 1999. Metallothionein and Heavy Metals in Brown Trout (*Salmo trutta*) and European Eel (*Anguilla anguilla*): A Comparative Study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 168 – 173.
- 8 - Isart, NR, Vasak M. 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 88: 388-396.
- 9 - Muto N, Ren HW, Hwang GS, Tominaga S, Itoh N, Tanaka, K. 1999. Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by air-pumping stress, dexamethasone, and metals. *Comp. Biochem Physiol.* 122: 75–82.
- 10 - Stillman MJ. 1995. Metallothioneins. *Coordin. Chem. Rev.* 14: 461–511.

- 11 - Noel-Lambot F, Gerday C, Disteché A. 1978. Distribution of Cd, Zn and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol.* 61: 177–187.
- 12 - Kägi JHR, Schäffer A. 1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 27: 8509–8515.
- 13 - Roméo M, Cosson, RP, Gnassia-Barelli M, Risso C, Stien X, Lafaurie M. 1997. Metallothionein determination in the liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax* treated with copper and B(a)P. *Mar. Environ. Res.* 44: 275–284.
- 14 - Linde AR, Sánchez-Galán S, Vallés-Mota P, García-Vázquez E. 2001. Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49: 60–63.
- 15 - Vallee, BL. 1979. Overview of Metallothionein. *Metallothionein Exp. Suppl.* 34: 19.
- 16 - Filipovi V, Raspor B. 2003. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. *Water Research* 37. 13: 3253-3262.
- 17 - Hogstrand C, Haux, C. 1991. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100: 137–141.
- 18 - Piscator M. 1964. Om kadmium i normala människornjurar samt redogörelse för isolering av metallothionein ur lever från kadmiumexponerade kaniner (English summary), *Nordisk hygienisk tidskrift* 65: 76.
- 19 - Kägi JHR, Vallee BL. 1960. Metallothionein: a cadmium and zinc binding protein from equine renal cortex. *Journal of Biological Chemistry.* 253: 3460-3465.

20 - Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfoli I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46: 407-417.

21 - Viarengo A, Burlando B, Dondero F, Marro A, Fabbri R. 1999. Metallothionein as a tool in biomonitoring programs. *Biomarkers* 4: 455–466.

22 - Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Saraquete C, Viarengo A. 2000. The use of biomarker to assess the impact of pollution in costal environment of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment* 247: 295-311.

23 - Lange A, Ausseil O, Segner H. 2002. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 131: 231.243

24 - Van Dyk, , G.M. Pieterse and J.H.J. Van Vuren. 2005. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety* Article in Press, Corrected Proof - Note to users J.C.

25 - ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1996. *Toxicological Profiles, Atlanta, GA.*

26 - Vallee BL, Auld, DA. 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry.* 29. 24: 5647–5659.

27 - Lee J, Treloar BP, Harris PM. 1994. Metallothionein and trace element metabolism in sheep tissues in response to high and sustained zinc dosages. I. Characterization and turnover of metallothionein isoforms. *Australian Journal of Agricultural Research* 45: 303–320.

28 - Tao TY, Gitlin JD. 2003. Hepatic copper metabolism: insights from genetic disease. *Hepatology* 2003, 37(6), 1241-1247.

29 - Linder, M.C. 1991. Biochemistry of copper. In: Biochemistry of the Elements Series. Ed.: E. Frieden. Plenum Press, New York. 550-557.

30 - Bremner I. 1991. Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Methods in Enzymology* 205: 25–35.

31 - Sura P, Ristic N, Bronowicka P, Wrobel M. 2006. Cadmium toxicity related to cysteine metabolism and glutathione levels in frog *Rana ridibunda* tissues. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 142(1-2):128-35.

32 - Szczerbik P, Mikołajczyk T, Sokołowska-Mikołajczyk M, Socha M, Chyb J, Epler P. 2006. Influence of long-term exposure to dietary cadmium on growth, maturation and reproduction of goldfish (subspecies: Prussian carp *Carassius auratus gibelio* B.) *Aquatic Toxicology Article in Press*, Corrected Proof - Note to users.

33 - Lionetto MG, Giordano ME, Vilella S, Schettino T. 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. *Aquat Toxicol*. 48(4): 561-571.

34 - Marijana E, Ruusb A, Ingebrigtsenc K, Hyllandb K, Bošković R. 2005. Cadmium accumulation and Cd-binding proteins in marine invertebrates—A radiotracer study *Chemosphere*. 61. 11: 1651-1664.

35 - Roth M, McCarter J A, Matheson AT, Clark MJR, Olafson RW. 1982. Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell River system. *Can J. Fish. aquar. Sci*. 39: 1596 1601.

36 - Roth M, McCarter JA. 1984. Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to an artificial mixture of zinc, copper and cadmium. *Camp. Biochem. Physiol*. 77: 71-75.

37 - Olsson PE, Haux C. 1986. Increased hepatic methallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (*Perca fluviatilis*). *Aquat. Toxicol*. 9: 231-242.

- 38 - Hylland K, Haux C, Hogstrand C. 1992. Hepatic metallothionein and heavy metals in dab *Limanda limanda* from the German Bight. *Marine Ecology Programme*. 91: 89-96.
- 39 - Schlenk D, Zhang YS, Nix J. 1995. Expression of hepatic metallothionein messenger RNA in feral fish and caged fish species correlates with muscle mercury levels. *Ecotoxicol. Environ. Safe*. 31: 282-286.
- 40 - Olsvik PA, Gundersen ARA, Zachariassen KE. 2000. Metal accumulation and metallothionein in two populations of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments during a run-off episode. *Aquat. Toxicol*. 50: 301 - 316.
- 41 - Roesijadi G, Robinson, WE. 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. *Aquatic Toxicology Molecular Biochemical and Cellular Perspectives*. 387/420.
- 42 - Olsson and Kille. 1997. Functional comparison of the metal-regulated transcriptional control regions of metallothionein genes from cadmium-sensitive and tolerant fish species. *BBA-Gene Struct. Exp*. 1350: 325-334.
- 43 - Perry and P. Laurent. 1993 - Environmental effects on fish gill structure and function. In: J.C. Rankin and F.B. Jensen, Editors, *Fish Ecophysiology*, Chapman and Hall, London. 231-264.
- 44 - Shears M. A. and Fletcher G. L. 1983 Regulation of Zn uptake from the gastrointestinal tract of a marine teleost, the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Can. J. Fish. aquat. Sci*. 40, 197-205.
- 45 - Weis JDB, Enslee EC. 1986. Hg- and Cu-induced hepatocellular changes in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Environ. Health Perspect*. 65: 167-173.
- 46 - Bunton TE, Baksi SM, George SG, Frazier JM. 1987. Abnormal hepatic copper storage in a teleost fish (*Morone americana*). *Veterinary Pathology* 24: 515-524.

- 47 - Lanno BH, Hilton JW. 1987. Histological observations on intrahepatocytic copper-containing granules in rainbow trout reared on diets containing elevated levels of copper, *Aquat. Toxicol.* 10: 251–263.
- 48 - Wallace B, Lee G, Luoma SN. 2003. Sub-cellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249: 183–197.
- 49 - Sola F, Isaia J, Masani A. 1995. Effects of copper on gill structure and transport function in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Appl. Toxicol.* 15. 5: 391-398.
- 50 - Alam MK, Morghan OE. 1995. Acute toxicity of heavy metals to common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal Environmental Science Health Part A.* 30 (8): 1807-1816.
- 51 - Olsson PE, Hogstrand C. 1987. Subcellular distribution and binding of cadmium to metallothionein in tissues of rainbow trout after exposure to ¹⁰⁹Cd in water. *Environ. Toxicol. Chem.* 6: 867 - 874.
- 52 - Larsson A, Bengtsson, BE, Haux C. 1982. Disturbed ion balance in flounder, *Platichthys flesus*, exposed to sublethal levels of cadmium. *J. Environ. Biol.* 3: 71-81.
- 53 - Viarengo A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates: Mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Rev. Aquat. Sci.* 1: 295-317.
- 54 - Dethloff GM, Schlenk D, Khan S, Bailey HC. 1999. The effects of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archieve Environmental. Contamination Toxicology* 36: 415–423.
- 55- Chowdhury MJ, Pane EF, Wood CM. 2004. Physiological effects of dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge in rainbow trout: respiratory, ionoregulatory, and stress parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*.in press.

56 - Castano A, Carbonell G, Carballo M, Fernandez C, Boleas S, Tarazona JV. 1998. Sublethal Effects of Repeated Intraperitoneal Cadmium Injections on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41: 29–35.

57 - Fowler BA. 1987. Intracellular compartmentation of metals in aquatic organisms: relationships to mechanisms of cell injury. *Environmental Health Perspective*. 71: 121-128.

58 - Welcomme, R.L., 1988. International introductions of inland aquatic species. *FAO Fish.Tech. Pap.* 294-318.

59 - Kullander SO, Ferraris, C.JJ. 2003. Cichlidae (Cichlids) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil p. 605-654.

60 - Ueng YF, Liu C, Lai CF, Meng LM, Ung YY, Ueng TH. 1996. Effects of cadmium and environmental pollution on metallothionein and cytochrome P-450 in tilapia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57: 125-131.

61 - Bebianno M J, Cravo A, Miguel C, Morais S. 2003. Metallothionein concentrations in a population of *Patella aspera*: variation with size. *The Science of The Total Environment* Vol. 301. Issues 1-3: 151-161.

62 - Raspor B. 2001 - Elucidation of the mechanism of the Brdicjka reaction. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 503: 159–162.

63 - Marijana E, Ivankovic D, Raspor B, Pavickic J, Boscko R. 2002. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. *Talanta* 57: 1211–1218.

64 - Hidalgo J, Tort L, Flos R. 1985. Cd-, Zn-, Cu-Binding protein in the elasmobranch *Scyliorhinus canicula*. *Comparative. Biochemistry Physiology. C* 81. 1: 159-165.

65 - Bonwick GA, Vas P, Fielden PR, Gordon JDM. 1990. Metallothionein-like proteins in the livers of squaloid and carcharhinid sharks. *Marine Pollution. Bulletin.* 21(12): 567-570.

66 - Hamilton SJ, Mehrle PM, Jones JR. 1987. Evaluation of metallothionein measurement as a biological indicator of stress from cadmium in brook trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116: 551-560.

67 - Weber DN, Eisch S, Spieler RE, Petering DH. 1992. Metal redistribution in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in response to restraint stress and dietary cadmium: Role of metallothionein and other metal-binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol* 101(2): 255-262.

68 - Roesijadi G. 1992. Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals: a review. *Aquat. Toxicol.* 22: 81-114.

69 - Tandon SK, Singh S, Prasad S, Mathur N. 2001. Hepatic and renal MT induction by an oral equimolar dose of zinc, cadmium or mercury in mice. *Food and chemical toxicology* 39: 571-577.

70 - Petering HG. 1978. Some observations on the interaction of zinc, copper, and iron metabolisms in lead and cadmium toxicity. *Environ. Health. Perspect.* 25: 141-145.

71 - George SG. 1992. Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals. In: *Heavy Metals in the Marine Environment* (W. R. Furness and P.S. Rainbow, Eds.). Plenum Press, New York. 123-142.

72 - Olsson PE, Zafarullah M, Foster R., Hamor T, Gedamu L. 1990. Developmental regulation of metallothionein mRNA, zinc, and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Eur. J. Biochem.* 193: 229 - 235.

73 - Overnell J, McIntosh R, Fletcher TC. 1987. The levels of liver metallothionein and zinc in plaice, *Pleuronectes platessa*, during the breeding season, and the effect of oestradiol injection. *J. Fish. Biol.* 43: 539-546.

74 - Wesson LJ, Hunt RV, Freeman HC, and Klaverkamp JF. 1991. Responses of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) to acidic rivers in nova scotia and to various diets: metals and metallothionein in liver and kidney. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100(3): 657 - 663.

75 - Kraemer LD, Campbell PGC, Hare Landis. 2005. Seasonal variations in hepatic Cd and Cu concentrations and in the sub-cellular distribution of these metals in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) *Environmental Pollution* 1-13.

76 - Linde AR, Sánchez-Galán S, Izquierdo JI, Arribas P, Marañón E, García-Vázquez E. 1998. Brown Trout as Biomonitor of Heavy Metal Pollution: Effect of Age on the Reliability of the Assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 40: 120-125.

77 - Karin M. 1985. Overview of Metallothionein . *Cell*. 41. 9.

78 - Zhang L, Wang WX. 2005. Effects of Zn pre-exposure on Cd and Zn bioaccumulation and metallothionein levels in two species of marine fish *Aquatic Toxicology* 73: 353–369.

79 - Rotchella JM, Clarke KR, Newton LC, Bird DJ. 2001. Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Marine Environmental Research* 52. 2: 151- 171.

80 - O'Halloran TV, Culotta VC. 2000. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* 275: 25025–25060.

81 - Schroeder JJ, Cousins RJ. 1991 - Metallothionein and Zinc Metabolism in Hepatocytes *Methods in Enzymology*. 205: 575-583.

82 - Kojima Y, Kägi JHR. 1978. Metallothionein. *Trends Biochemistry Science*. 3: 90-93.

83 - Kägi JHR, Kojima Y. 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experienta*. 52: 25-61.

84 - Hunziker PE, Sternlieb I. 1991. Copper metallothionein in patients with hepatic copper overload. *European Journal Clinic Investigation*. 21: 466-471.

85 - Kito H, Ose Y, Sato T. 1986. Cadmium-binding protein (metallothionein) in carp. *Environmental Health Perspective*. 65: 117– 124.

86 - Chaffai AH, Triquet CA, Abed AE. 1997. Metallothionein like protein: is it an efficient biomarker of metal contamination? A case study based on fish from the Tunisian Coast. *Archieve Environmental Contamination Toxicology*. 33: 53–62.

87 - Guiguère A, Campbell PGC, Hare L, Couture P. 2005. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca .avescens*) sampled along a polymetallic gradient *Aquatic Toxicology*. In press.

88 - Kurelec B. 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical Review Toxicology*. 22: 23-43.

89 - Linde AR, Klein D, Summer KH. 2005. Phenomenon of Hepatic Overload of Copper in *Mugil cephalus*: Role of Metallothionein and Patterns of Copper Cellular Distribution. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 97 (4): 230-235.

90 - McCarter JA, Matheson AT, Roth RW, Olafson RW, Buckley JT. 1982. Chronic exposure of Coho salmon to sublethal concentrations of copper II. Distribution of copper between high- and low molecular-weight proteins in liver cytosol and the possible role of metallothionein in detoxification. *Camp. Biocheffl. Physiol*. 72: 21-26.

91 - Mehra RK, Bremner I. 1984. Species differences in the occurrence of copper-metallothionein in the particulate fractions of the liver of copper-loaded animals. *Biochem. J*. 227: 903-938.

92 - Hans De Smet. Wachter BD, Lobinski R, Blust R. 2001. Dynamics of (Cd,Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Aquatic Toxicology* 52: 269–281.

93 - Ariyoshi T, Shiiba S, Hasegawa H, Arizono K. 1990. Profile of metal-binding proteins and heme oxygenase in red carp treated with heavy metals, pesticides and surfactants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 643–649.

94 - George SG, Todd K, Wright J. 1996. Regulation of metallothionein in teleosts: induction of MT mRNA and protein by cadmium in hepatic and extrahepatic tissues of a marine flatfish, the turbot (*Scophthalmus maximus*) the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

95 - Cosson RP, Amiard JC. 1998. Utilisation des metallothioneines comme biomarqueurs d'exposition aux métaux. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F. (Eds.). *Utilisation de Biomarqueurs pour la Surveillance de la Qualité de l'Environnement*. 78–109.

96 - De Conto Cinier C., Petit-Ramel M, Faure R, Bortolato M. 1998. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. *Bulletin. Environmental Contamination Toxicology*. 61: 793–799.

97 - Block M, Glynn AW, Part P. 1991. Xanthate effects of cadmium uptake and intracellular distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Aquatic Toxicology*. 20: 267–284.

98 - Norey CG, Lees WE, Darke BM, Stark JM, Baker TS, Cryer A, Kay J. 1990. Immunologica distinction between piscine and mammalian metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol.* OSB. 597-601.

99 - Palmiter RD. 1994. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appear to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor MTF-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 1219–1223.