

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

SHIMELLY SOARES ROCHA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DOS
ESPERMATOZOIDES DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE HgCl₂**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uruguaiana

2015

SHIMELLY SOARES ROCHA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DOS
ESPERMATOZOIDES DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HgCl₂**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Aquio Hoshiba

Co-orientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr.

Uruguaiana

2015

SHIMELLY SOARES ROCHA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DOS ESPERMATOZOIDES DE
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HgCl₂**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Dissertação defendida e aprovada em: 27/04/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcio Aquio Hoshiba
Orientador
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr.
(UFRGS)

Prof. Dr^a. Alessandra S. K. Tamajusuku Neis
(UNIPAMPA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela oportunidade concedida e por me acompanhar neste trajeto, e em todos os outros.

Aos meus pais Nicolau e Marta, e mano Eduardo pelo apoio incondicional, amor, carinho e dedicação em todo este processo. Sem vocês nada disso valeria a pena. À minha cunhada Pamela, pela hospitalidade que sempre me recebeu e pelo apoio em meu trabalho.

Ao meu orientador Márcio, por ter me recebido como orientada e por todo apoio despendido neste período.

Ao meu co-orientador Danilo, por toda a dedicação e empenho na realização deste trabalho, pelos recursos financeiros, por ceder o laboratório, alunos auxiliares, por dispor de seu final de semana para reunião, e enfim todo o suporte para que este trabalho ocorresse. Muito obrigada!

Aos colegas do AQUAM, pela receptividade na qual me receberam. Ao colega Raycon pelo auxílio com todos os protocolos, Diego e Daniel pela “mão de obra”, transporte dos animais e apoio em todo o desenvolvimento do trabalho, e às queridas Laura e Lis, que além de colegas foram grandes amigas e extremamente importantes em todo este período.

À professora Enefer, pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação em me passar parte dos seus conhecimentos, me auxiliar em todos os “pilotos” realizados e estabelecimento dos protocolos.

Ao professor Antônio Sergio e à professora Carine, por me receberem em sua casa, laboratório, e pelo auxílio e dedicação nos experimentos.

Aos colegas do AQUAPAMPA pela parceria e amizade nestes 19 meses de mestrado.

Ao PPG Ciência Animal, professores e colegas, pelos ensinamentos.

Ao PPG Bioquímica, professores Robson, Fran e Daiana pelos ensinamentos, e por me receberem em suas disciplinas, fazendo sempre com que eu me sentisse familiarizada e orientada.

Ao curso de Aquicultura, no qual eu me graduei e ainda sou recebida como eterna aluna.

Agradeço aos meus amigos Thiago, Felipe, Jéssica e Danisa por todo o apoio neste período, por compreenderem as minhas ausências e momentos de estresse, e mesmo assim permanecerem sempre comigo. Aos amigos que ganhei durante o tempo de mestrado,

Danelize, Marlon, Lucas e Bruno, agradeço pela amizade e carinho de vocês. Aos meus queridos (as) amigos e companheiros da PIB, aos meus Pastores Claudia e Carlos, por estarem sempre presentes, com suas palavras de força e fé, obrigada por sempre terem palavras de amor e carinho em todos os momentos que precisei.

À CAPES pela bolsa concedida e à UNIPAMPA, por tornar possível a minha sonho de me graduar e pós graduar.

Muito obrigada à todos que estiveram presentes neste período, seja auxiliando diretamente no meu trabalho, ou ainda torcendo para que as coisas ocorressem bem!

*Porque d'Ele e por Ele, e para
Ele, são todas as coisas;*

(Romanos 11:36)

RESUMO

O Jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe que se destaca na região sul do Brasil, podendo ser encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México, se destaca por possuir fácil adaptação e bons índices reprodutivos, sua maturidade sexual é atingida no primeiro ano de vida apresentando dois picos reprodutivos por ano, um no verão e outro na primavera. Estudos referente ao comportamento de gametas e sua interação com o meio ambiente ainda são incipientes, os gametas são lançados no ambiente onde ocorre a fertilização e neste momento os mesmos estão expostos a diversos contaminantes presentes na água, tais como metais pesados, como o Cloreto de Mercúrio (HgCl_2) que tem capacidade de causar danos em qualquer tecido no qual entre em contato. Diante disto, o estudo teve por objetivo avaliar as patologias causadas por danos morfológicos ocasionados pela ativação de espermatozoides com soluções de diferentes concentrações de HgCl_2 . Para a realização do estudo, foi feita a coleta do sêmen, onde foram utilizados 7 animais machos de idade reprodutiva ($489,42 \pm 137\text{g}$ e $36,78 \pm 3,13\text{cm}$). O sêmen foi coletado por compressão abdominal, ativado em solução de NaCl 50mM livre de HgCl_2 para o grupo controle, e soluções de NaCl 50mM com 0,0001; 0,0002; 0,002 e 0,02 mg/L de HgCl_2 . Foram avaliados motilidade, vigor e tempo de motilidade como parâmetros subjetivos, integridade e fluidez de membrana, funcionalidade mitocondrial, espécies reativas de oxigênio e fragmentação do DNA como parâmetros de toxicidade celular e patologia espermática como parâmetro de morfologia celular. Os resultados encontrados indicam que em relação aos parâmetros de motilidade, vigor e tempo de motilidade, houve diferença quando comparado ao grupo controle até mesmo na mais baixa concentração avaliada (0,0001mg/L). Entretanto, danos celulares, foram observados apenas, a partir da dose 0,0002mg/L, sendo eles integridade da membrana e fluidez da mesma. No parâmetro morfológico, houve diferença entre o índice de células anormais entre o grupo controle e todas as concentrações avaliadas nos grupos tratados. Estes resultados indicam que o Cloreto de Mercúrio pode ocasionar danos em espermatozoides de *Rhamdia quelen*, em todas as concentrações testadas.

Palavras chave: Peixe. Reprodução. Jundiá. Metais Pesados. Toxicologia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:

Representação da formação do Cloreto de Mercúrio HgCl_2 19

Figura 2:

Exemplos de danos toxicológicos que podem ser ocasionados pela biomagnificação do Mercúrio no ambiente aquático. 23

Figura 3:

Exemplar de *Rhamdia quelen* (Jundiá)..... 24

Artigo

Figura 1:

Imagem microscópica de um pool de células espermáticas de *Rhamdia quelen* ativadas livres de Cloreto de Mercúrio, coradas com rosa de bengala..... 44

Figura 2:

Imagem microscópica vectorizada de células espermáticas de *Rhamdia quelen* ativadas com 0,0002mg/L de HgCl_2 coradas com rosa de bengala. 45

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1:

Parâmetros de motilidade, vigor e tempo de motilidade de espermatozoides de *Rhamdia quelen* ativados com diferentes concentrações de Cloreto de Mercúrio (HgCl₂).....42

Tabela 2:

Parâmetros de dano celular de espermatozoides de *Rhamdia quelen* ativados com diferentes concentrações de Cloreto de Mercúrio (HgCl₂).43

Tabela 3:

Índices de patologias espermáticas avaliadas em espermatozoides de *Rhamdia quelen* ativados com diferentes concentrações de Cloreto de Mercúrio (HgCl₂).....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH₃: Metil

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Hg: Mercúrio

HgO: Óxido de Mercúrio

Hg²⁺: Íon Mercuroso

Hg²⁺: Íon Mercúrico

HgCH₃⁺:Metil Mercúrio

(Hg(CH₃)₂): Dimetilmercúrio

HgCl₂: Cloreto de Mercúrio

(Hg₂Cl₂): Calomelano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Os Metais Pesados	15
2.2 Mercúrio	16
2.2.1 Ciclo do Mercúrio	17
2.2.2 Toxicidade do Mercúrio	19
2.2.2 Aspectos Legais	21
2.3 O Mercúrio no meio aquático	22
2.4 <i>Rhamdia quelen</i> (JUNDIÁ)	23
2.5 Características seminais em peixes	26
2.5.1 Motilidade espermática	26
2.5.2 Viabilidade espermática	27
2.5.3 Capacitação espermática	28
2.5.4 Estrutura dos espermatozoides em peixes	29
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivos específicos	33
5 ARTIGO CIENTÍFICO	34
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DOS ESPERMATOZOIDES DE JUNDIÁ (<i>Rhamdia quelen</i>) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HgCl₂	35
RESUMO	35
ABSTRACT	36
Introdução	37
Materiais e Métodos	38
Resultados	41
Discussão	46
Considerações Finais	48
Referências	48
REFERÊNCIAS GERAIS	53

1 INTRODUÇÃO

O Jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe produzido comercialmente no Rio Grande do sul. Esta espécie foi relatada como encontrada desde o centro da Argentina até o sul do México. Esta espécie pode atingir 50 cm de comprimento e 3 Kg de peso, possui hábito noturno e habita locais calmos e profundos dos rios. Esse peixe é onívoro, com tendência piscívora e sua maturidade sexual é atingida no primeiro ano de vida apresentando dois picos reprodutivos por ano, um no verão e outro na primavera com desovas múltiplas (GOMES, 2000). Esta espécie possui uma gama de estudos referentes à sua reprodução, doses inseminantes, qualidade de gametas e desempenho larval (BOMDARDELLI, 2006; FERREIRA, 2001; BEHR, 2008), porém ainda são necessárias informações referentes ao comportamento de gametas e sua interação com o meio ambiente (WITECK, 2011).

O *R. quelen* trata-se de um peixe teleósteo com fecundação externa onde os gametas são lançados no ambiente onde ocorre a fertilização. Neste momento os mesmos estão expostos a diferentes contaminantes presentes na água, tais como os metais pesados (Mercúrio, Cádmiio, Cobre, dentre outros), que em certos níveis, prejudicam a motilidade dos espermatozoides e a fertilização dos oócitos (KIME, 1995). Esses elementos constituem parte integrante do ambiente e da matéria viva, ocorrendo naturalmente em pequenas concentrações, na ordem de partes por bilhão (ppb) a partes por milhão (ppm) (SALOMONS & FORSTNER, 1984). No entanto, ainda que presentes no meio ambiente, os ecossistemas aquáticos estão entre os principais receptáculos de dejetos urbanos e industriais, sendo este ambiente constantemente afetado por poluentes, destacando-se os metais pesados (ADAMS & GELLEY, 2000).

Devido aos efeitos que causam no meio ambiente quando em determinadas concentrações, os metais pesados estão dentre os compostos mais estudados nos ecossistemas aquáticos (PALENZUELA, 2004). Em função da sua toxicidade para os sistemas biológicos, principalmente a sua capacidade de interferir em reações enzimáticas, por meio do bloqueio ou deslocamento do íon essencial de várias biomoléculas e sua persistência no ambiente, os metais são considerados potencialmente perigosos. Logo, no meio aquático, o mercúrio (Hg) é reconhecido como um dos metais com maior potencial tóxico, por ser capaz de bioacumular nos organismos, biomagnificar através da cadeia alimentar e possuir uma intensa ciclagem no ecossistema (FÖRSTNER & WITTMAN, 1983).

O efeito tóxico do Hg e seus derivados residem na sua forte interação com grupos sulfidríla, R-SH de proteínas, enzimas (LACERDA, 1997) e proteínas de baixo peso molecular (como coenzima A, cisteína, glutathiona, entre outros) (VALLE& ULMER, 1972). Trata-se de um metal pesado com toxicidade comprovada que pode ser encontrado no solo e na água podendo causar danos em qualquer tecido com o qual tenha contato. A contaminação aquática é citada como um dos principais responsáveis pelo estabelecimento do estresse oxidativo. Este fato está relacionado com um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem reagir com macromoléculas biológicas suscetíveis e causar peroxidação lipídica, danos no DNA e oxidação de proteínas. Por sua vez, o ERO podem acarretar em redução de imunidade, aumento de processos infecciosos, perda de peso, e até mesmo a morte dos animais. (MONTEIRO, 2011). As EROs, e o estresse oxidativo causado pelas mesmas induzem a peroxidação lipídica e ocasiona alterações no DNA resultando em danos genotóxicos (PRÁ, 2006).

Assim, tais danos podem atingir diversas macromoléculas de tecidos, como os gonadais e também os gametas quando lançados no meio aquático. Os espermatozoides são susceptíveis principalmente à danos peroxidativos por apresentarem, em suas membranas, grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados. Os danos peroxidativos induzem a formação de EROs que é uma das maiores causas da redução da viabilidade e fertilidade dos espermatozoides (ALVAREZ, 2006). Dentre os fatores estudados na biologia reprodutiva, a qualidade do sêmen pode ser avaliada em diferentes níveis de complexidade: pelo espermatócrito, viabilidade espermática, porcentagem de motilidade espermática, intensidade da motilidade espermática, ultraestrutura dos espermatozoides, composição química do plasma seminal ou pela capacidade de fertilização que possuem os espermatozoides (RURANGWA, 2001). Desta forma, LAHNSTEINER (2004) ressalta a importância de se conhecer as características morfológicas e funcionais dos espermatozoides, para o estudo básico da biologia reprodutiva e para a produção em cativeiro de qualquer espécie íctica, assim como, para o desenvolvimento de técnicas dirigidas à conservação de espécies nativas.

Para o desenvolvimento destas técnicas, o emprego de parâmetros genotóxicos em organismos aquáticos vem sendo utilizado como forma de avaliação da qualidade hídrica, permitindo avaliar o efeito de poluentes no meio, bem como alterações em seu potencial tóxico ou genotóxico.

Dessa maneira, peixes e seus gametas podem ser utilizados como biomarcadores, por apresentar uma resposta bioquímica, fisiológica ou um parâmetro morfológico alterado, como consequência da exposição a um xenobionte (MELANCON, 1995). Adicionado a isso,

podemos destacar que os mesmos refletem a saúde do ecossistema aquático, ambiente fundamental para a sobrevivência dos seres vivos. Inclusive, os biomarcadores, como peixes e seus gametas, são sensíveis aos agentes estressores e podem rapidamente ajudar a identificar os mecanismos básicos da relação causal entre o estressor e seus efeitos (ADAMS, 2002).

Assim como, pensando que cada vez mais os estoques naturais estão diminuindo (de los Angeles GASALLA, 2001; SANTOS, 2005; MELETTI, 2003), talvez a degradação da qualidade da água dos rios possam ser também a responsável por tal redução. Uma vez que a presença de metais pesados pode influenciar na qualidade do sêmen e conseqüentemente no número de descendentes de cada reprodutor, podendo dessa forma contribuir com a diminuição dos estoques pesqueiros.

Dessa forma, nosso estudo objetivou avaliar os danos ocasionados pela contaminação de Cloreto de Mercúrio no meio hídrico, utilizando espermatozoides de *Rhamdia quelen*, como biomarcador de toxicidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os Metais Pesados

Segundo Malavolta (1994), um grupo heterogêneo de elementos, que inclui metais, semi-metais e não metais que possuem número atômico maior que 20, ou então, cujo peso específico seja maior que 5 g cm^{-3} recebe a denominação de “metal pesado”.

Os metais, arsênio, cádmio, cobre, cromo, chumbo e mercúrio são considerados tóxicos, pois produzem danos em pequenas concentrações. Geralmente esses metais tóxicos estão presentes em baixas concentrações no meio aquático pela ação de fenômenos naturais, mas também podem ser despejados em quantidades significativas através de atividades industriais, de mineração e agrícolas (ABEL, 1989).

Quando na presença de metais pesados um organismo aquático pode apresentar dois tipos básicos de comportamento. O primeiro é quando o organismo é sensível à ação tóxica de um determinado metal. O segundo é quando o organismo não é sensível, porém o bioacumula, potencializando seu efeito nocivo através das cadeias alimentares. Assim, coloca em risco os organismos que estão situados no topo dessas cadeias (VIARENGO, 1989). Conforme Conell & Miller (1984), a toxicidade dos metais está diretamente relacionada à sua capacidade de interferir em reações enzimáticas, isso ocorre através do bloqueio ou deslocamento do íon essencial de várias biomoléculas. Devido a sua baixa mobilidade, decorrente das pequenas dimensões e das cargas duplas e triplas, esses metais se acumulam por um longo período no meio ambiente.

Alguns metais apresentam alta toxicidade para os organismos, mesmo quando estes se encontram em baixas concentrações, o que reforça a necessidade e importância de estudos relacionados com os efeitos induzidos por tais elementos (BAATRUP, 1991). Dentre os efeitos tóxicos que podem ser causados pelos metais, pode-se incluir a letalidade e os efeitos subletais, como por exemplo, alterações no crescimento, no desenvolvimento, na reprodução, assim como, respostas patológicas, bioquímicas e comportamentais (BAATRUP, 1991).

Podem-se obter informações importantes sobre o potencial tóxico dos metais através de estudos em ambientes contaminados ou mesmo, através de simulações em laboratório, tais estudos podem diferir entre si quanto ao objetivo e as metodologias de avaliação. Esses estudos em toxicologia ambiental devem levar em consideração alguns aspectos como: modelo de estudo, parâmetros analisados e desenho experimental a campo ou em laboratório.

As informações obtidas nesses estudos possibilitam que haja um melhor entendimento sobre o processo toxicológico dos metais.

Dentre os metais denominados “pesados”, o mercúrio e o cádmio geram grande preocupação ambiental, isso devido a sua ampla utilização industrial, toxicidade e comportamento no ambiente (BUCIO, 1995).

2.2 Mercúrio

O nome mercúrio surgiu em homenagem ao planeta Mercúrio. Este elemento já foi chamado pelos gregos de *Hidrargiro*, tal palavra foi introduzida por Aristóteles, do grego *hydro* = água, mais *árgyros* = prata. Posteriormente essa expressão foi transcrita pelos romanos para o latim, como *Hidrargyrum* que significa prata líquida, cujo símbolo Hg deriva desta denominação grega (HOFFMAN, 1995).

O único elemento que se mantém em estado líquido e é volátil à temperatura ambiente é o mercúrio, sendo o seu ponto de fusão $-38,87^{\circ}\text{C}$. O mercúrio no seu estado sólido é dúctil e mole, sendo ele também o único elemento além dos gases nobres, cujo vapor é monoatômico à temperatura ambiente. Este elemento químico possui número atômico 80 e é representado pelo símbolo Hg, fazendo parte do grupo II B da Tabela Periódica. Somente a temperatura de 350°C oxida-se rapidamente, produzindo o óxido mercúrico (HgO – vermelho). Este metal também dissolve facilmente a prata, o ouro, o chumbo e os metais alcalinos, formando amálgamas, ligações relativamente consistentes (UNEP, 2002).

O mercúrio pode existir além do seu estado elementar, em duas formas oxidadas: 1^{+} (íon mercurioso, Hg^{2+}) e 2^{+} (íon mercúrico, Hg^{2+}). Na sua forma orgânica, o Hg^{2+} , apresenta-se ligado covalentemente a um ou dois radicais orgânicos, sendo os mais comuns, o metilmercúrio (HgCH_3^{+}) e o dimetilmercúrio ($\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$). As diferentes formas do mercúrio são designadas por espécies ou especiação: mercúrio elementar, compostos (ou espécies) de mercúrio orgânico e compostos de mercúrio inorgânico (CARDOSO, 2001).

As técnicas de extração do mercúrio como minério e com o uso do elemento para fins medicinais já era familiar para os gregos. Os romanos por sua vez herdaram a maioria dos conhecimentos e as aplicações comerciais do mercúrio. O consumo de mercúrio desde o Império Romano era restrito principalmente ao uso medicinal e farmacêutico. Isso mudou com a invenção dos instrumentos científicos, como por exemplo, o barômetro em 1643, por Torricelli e o termômetro em 1720, por Fahrenheit, implicou na introdução do mercúrio na pesquisa científica (ALLOWAY, 1995).

Os aspectos relacionados à contaminação por mercúrio, desde a última década do século XX têm despertando o interesse da comunidade científica, devido ao fato de que este metal pesado possui um elevado potencial tóxico. Desta forma é de suma importância conhecer detalhadamente seu ciclo biogeoquímico, desde os processos que envolvem a sua distribuição, transformação, bioacumulação e até o transporte desse elemento no meio ambiente.

O mercúrio é raramente encontrado como elemento livre na natureza, estando distribuído por toda a crosta terrestre, normalmente em concentrações pequenas. A sua presença está nos mais diversos compartimentos ambientais em pequenas concentrações: hidrosfera, litosfera, atmosfera e biosfera. Podendo ser encontrado das mais variadas formas, tais como, mercúrio elementar e como composto de mercúrio orgânico e inorgânico.

A exploração mineral e o refino do metal, fábricas de cloro-álcali, indústrias de polpa, papel, plástico, medicamentos e eletrônica, também como, pesticidas agrícolas e medicamentos e insumos hospitalares são algumas das principais fontes de emissão antrópicas de mercúrio. Boa parte do mercúrio descartado no ambiente por essas atividades são incorporados aos ciclos biogeoquímicos e às cadeias tróficas, elevando a sua concentração nos ecossistemas, podendo desta forma, tornar-se uma ameaça aos vegetais, animais e ao ser humano (GOMES, 2014). O ciclo biogeoquímico envolve processos que ocorrem no solo, na água e na atmosfera, presente não somente no estado sólido ou dissolvido, mas também na fase gasosa (WINDMÖLLER, 2007).

Quando atinge os ambientes aquáticos, as espécies inorgânicas do mercúrio sofrem reações mediadas, na maioria das vezes por microrganismos que alteram seu estado inicial, o que resulta em compostos organomercuriais. Um exemplo desses compostos é o metilmercúrio, que é mais tóxico que as espécies inorgânicas. Esta forma facilmente é absorvida por peixes e outros animais aquáticos, levando à deposição dessa substância nos tecidos desses animais, além de acumular-se ao longo do tempo na cadeia biológica, atingindo concentrações bem maiores do que seriam normalmente encontradas nas águas e sedimentos (AZEVEDO, 2003).

2.2.1 Ciclo do Mercúrio

Existem dois ciclos que realizam o transporte e distribuição do mercúrio no ambiente, um global e outro local. O ciclo global envolve a evaporação do mercúrio pela desgaseificação da crosta terrestre (incluindo áreas de terra e de água, como rios e oceanos), a

circulação atmosférica de seus vapores e sua precipitação com as chuvas, retornando às águas e ao solo. (MIRANDA, 2007)

O ciclo local é favorecido apenas pelas fontes antropogênicas de emissão e depende da metilação do mercúrio inorgânico. Pode-se dizer que, tanto o mercúrio proveniente das fontes naturais como o liberado por fontes antropogênicas, podem sofrer transformações e transporte no meio ambiente, que os distribuem pelos ecossistemas terrestre, aquático e atmosférico. Há dois tipos principais de reação, oxidação-redução e metilação-desmetilação, que convertem o mercúrio em suas mais diversas formas (TENORIO, 1987).

A espécie dominante do mercúrio na atmosfera, é o mercúrio elementar (Hg^0), enquanto que o íon mercúrico (Hg^{2+}) é a espécie mais abundante presente nos sedimentos, na água e no solo (BISINOTI, 2007). O mercúrio elementar pode ser volatilizado facilmente e emitido para a atmosfera, desta forma pode ser transportado por correntes de ar por longos períodos e, conseqüentemente, por longas distâncias (MICARONI, 2000). A contra ponto disto o Hg^{2+} tem um tempo de residência menor na atmosfera, que está relacionado à sua solubilidade em água, baixa volatilização e capacidade de reação. Portanto, um importante mecanismo de deposição de mercúrio é a oxidação do mercúrio elementar. Fazendo com que o mesmo seja depositado no solo e na água. Assim, quando o Hg^0 é convertido a Hg^{2+} , pode ser rapidamente precipitado nas águas das chuvas ou adsorvido em pequenas partículas, depositando-se nos solos e corpos de águas.

Os íons de mercúrio dos compostos inorgânicos podem se ligar a grupos orgânicos, transformando-se em compostos orgânicos de mercúrio, como por exemplo, o metilmercúrio e o dimetilmercúrio, isso pode ocorrer no solo, mas principalmente nos ambientes aquáticos.

A parte do mercúrio que se deposita no solo e na água pode se transformar através de um processo lento em espécies voláteis e reemitidas para a atmosfera, geralmente como mercúrio elementar e dimetil-mercúrio, ambos podem ser formados por processos bioquímicos (ALLOWAY, 1995). Essas transformações, assim como, diversas outras, envolvem uma série de reações químicas, onde o mercúrio elementar e os compostos de mercúrio são interconvertidos nos sistemas atmosféricos, aquáticos e terrestres. A conversão que ocorre entre as diferentes espécies de mercúrio é à base do complexo padrão de distribuição desse elemento em ciclos locais e globais, assim como o seu enriquecimento para a atmosfera.

A biomagnificação, ou seja, quando um organismo contaminado por mercúrio ocupa um nível inferior na cadeia alimentar, seu predador absorverá o mercúrio orgânico, mas o mesmo revelará concentrações relativamente aumentadas. Durante este processo, os

contaminantes são transferidos de um nível para outro, então à medida que passam para níveis tróficos mais elevados, exibem o aumento dessa concentração.

2.2.2 Toxicidade do Mercúrio

O mercúrio é um metal altamente tóxico, isso está relacionado a sua capacidade de se bioacumular nos organismos e de se biomagnificar através da cadeia alimentar (FÖRSTNER & WITTMAN,1983). Este elemento pode se apresentar de diversas formas químicas, dentre elas destaca-se o mercúrio metálico Hg^0 que é volátil e libera o vapor de mercúrio, ou seja, um gás monoatômico, que é estável e pode permanecer na atmosfera por um longo período. A sua importância no ciclo do mercúrio está relacionado ao fato de que ao sofrer oxidação, originando o mercúrio mercurioso (Hg^{+1}) e o mercúrio mercúrico (Hg^{+2}). Ambas as formas inorgânicas que podem se ligar a outros elementos, como o oxigênio, o cloro ou o enxofre, originando compostos de mercúrio inorgânico também designado como sais de mercúrio, ou sais mercuriosos e mercúricos (MALM, 1997).

O cloreto de mercúrio (HgCl_2) (Figura 1) é um corrosivo muito tóxico, usado como desinfetante, empregado em muitas aplicações, inclusive medicinais, apesar de ser umas das formas mais tóxicas do mercúrio pela sua solubilidade em água em relação a outros compostos de mercúrio (HSDB, 2000).

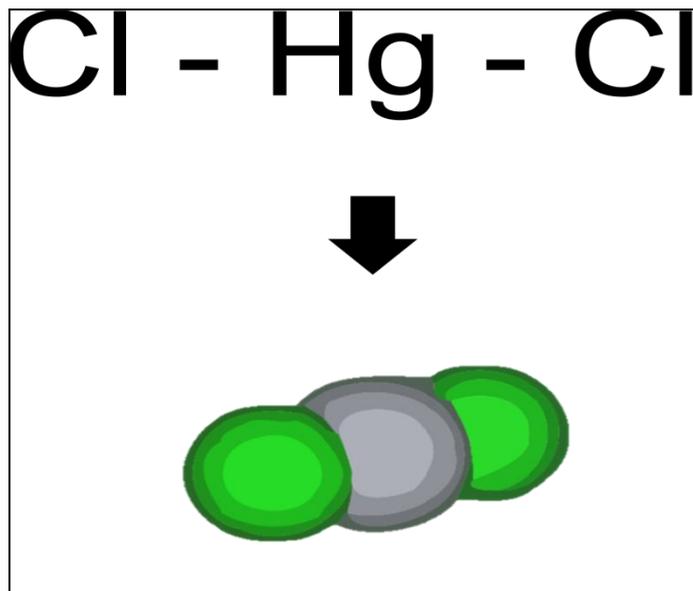


FIGURA 1 – Representação da formação do sal Cloreto de Mercúrio (HgCl_2).

Fonte: Autor.

Um átomo de mercúrio ao se ligar covalentemente a grupos metil (CH_3), origina um composto orgânico denominado como metilmercúrio (CH_3Hg), que é originado a partir de um processo de metilação, através do Hg^{2+} , que é mediado por vários micro-organismos em ambientes aquáticos, particularmente no sedimento (MALM, 1997).

A gaseificação da crosta terrestre, as emissões de vulcões e a evaporação de corpos aquáticos, são as fontes naturais mais significativas de mercúrio. As fontes antrópicas de mercúrio se originam através de indústrias que queimam combustíveis fósseis, produção eletrolítica de cloro-soda, produção de acetaldeído, incineradores de lixo, polpa de papel, tintas, pesticidas, fungicidas, lâmpadas de vapor de mercúrio, baterias, produtos odontológicos, amalgamação de mercúrio em extração de ouro, entre outros (CANELA, 1995).

O mercúrio na forma orgânica ou inorgânica, independentemente da sua origem, pode sofrer transformações no ambiente, o que torna a sua distribuição ambiental complexa. O ciclo biogeoquímico do mercúrio, geralmente exibe um equilíbrio dinâmico, mas algumas ações humanas podem introduzir elementos ou compostos mais rápidos e em nível maior que os processos naturais, podendo alterar os padrões dos ciclos e as condições às quais já estão adaptadas a fauna e a flora (MAURO, 1999).

Através da precipitação e por meio do descarte de resíduos agro-industriais na proximidade de rios, lagos e lagoas o mercúrio atinge os ecossistemas aquáticos. Os peixes absorvem este elemento através da alimentação ou respiração branquial, e é por meio da circulação sanguínea que ocorre a sua distribuição. Os seguintes fatores podem influenciar a absorção do mercúrio, a concentração deste elemento, a taxa metabólica e a sua eficiência de absorção, ou seja, sua disponibilidade, tais fatores são determinados pelas características do meio aquático. Na biota aquática os níveis de mercúrio podem variar entre as espécies de uma mesma localidade e para uma mesma espécie em diferentes localidades (TENORIO, 1987).

O mercúrio e seus compostos tem sua toxicidade diretamente relacionada a sua forte interação com grupos sulfidril, R-SH de proteínas, enzimas e proteínas de baixo peso molecular. Dentre as sulfidrilas, o Hg^{2+} substitui o átomo de hidrogênio, que é capaz de inativar enzimas sulfidrias, interferindo no metabolismo e nas funções celulares (VALLE & ULMER, 1972; LACERDA, 1997). Danos no DNA podem ocorrer quando o mercúrio se liga a purinas, pirimidinas e ácidos nucleicos (BUCIO, 1999).

Ao reagir diretamente com vários constituintes de membrana, interferindo na integridade estrutural e nas propriedades físicas das membranas celulares (BAATRUP, 1991) os metais pesados tem a capacidade de atravessar a membrana para o interior das células pode

prejudicar suas funções, causando a morte celular e a distribuição de qualquer tecido com a qual entrem em contato.

Frente a condições fisiológicas normais, os animais possuem um balanço entre a geração e neutralização das espécies reativas de oxigênio (EROs). Muito embora, quando os organismos estão expostos aos Hg e a outros metais pesados, a taxa de produção das EROs excede a sua capacidade de neutralização pelas defesas antioxidantes dos organismos levando ao estresse oxidativo (STOHS & BAGCHI, 1995). As células que estão sob estresse oxidativo desenvolvem várias disfunções em razão das lesões causadas pelas EROs aos lipídios, proteínas e DNA (ERCAL, 2001; VAN DER OOST, 2003). Desta forma torna-se necessário estudar os reais danos à saúde dos organismos em diferentes níveis de organização biológica frente à exposição crônica e aguda a este metal.

2.2.2 Aspectos Legais

A legislação do Brasil possui algumas portarias e resoluções para o controle dos níveis de mercúrio, que estabelecem limites máximos para esse elemento em alguns compartimentos ambientais. Desta forma a Resolução nº. 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Esta resolução estabelece que os níveis máximos de mercúrio que podem ser encontrados em corpos d'água são de 0,0002mg/L.

São definidas treze classes, de acordo com o uso predominante a que as águas se destinam. As águas doces, em particular, são distribuídas em cinco classes. Os corpos de água não enquadrados, enquanto não aprovados os respectivos enquadramentos, serão considerados Classe 2, que tratam-se de corpos d'água destinados à abastecimento humano após tratamento convencional, à proteção de comunidades aquáticas e à recreação.

Para que possam ser avaliados os níveis de contaminação terrestres, se faz necessário estabelecer diretrizes para determinar até que nível esses sedimentos podem ser considerados não contaminados. Por sua vez, adequados para a proteção da vida aquática; ou contaminados o suficiente para que se justifiquem medidas e ações que promovam a recuperação do ecossistema.

2.3 O Mercúrio no meio aquático

Quando se trata da presença do mercúrio no meio aquático, devem-se imaginar dois sistemas distintos, que são separados, mas que interagem entre si profundamente: na fase líquida, a água e na fase sólida, os sedimentos. Os resultados da contaminação por mercúrio dos ecossistemas aquáticos são as emissões pontuais diretas, deposição atmosférica, erosão do solo e lixiviação, sendo que a distribuição das diversas espécies de mercúrio que entram no sistema aquático é regulada por processos físicos, químicos e biológicos, que ocorrem na interface ar-água e água-sedimento (ALEXANDRE, 2006).

O mercúrio, quando em águas contaminadas, encontra-se predominantemente ligado à matéria fina em suspensão, que tem grande capacidade de adsorvê-lo. Os sedimentos de fundo desempenham um papel muito importante na avaliação da contaminação de corpos hídricos, pois eles refletem a atual qualidade do sistema aquático e podem desta maneira ser utilizados para detectar a presença de contaminantes, que permanecem insolúveis após lançamentos nas águas superficiais, funcionando como uma espécie de depósito. Desta maneira, os sedimentos de lagos, rios e oceanos contaminados por mercúrio podem ser um risco para o meio ambiente, pois o mercúrio confinado pode permanecer ativo como substrato para a metilação por vários anos, até mesmo quando a fonte poluidora é eliminada (AZEVEDO, 2003).

As espécies de mercúrio, na sua maioria são absorvidas diretamente das águas, dos alimentos ou mesmo da ingestão de sedimentos pelos organismos aquáticos, porém o metilmercúrio acumula-se de uma forma mais eficiente na maioria dos organismos, adquirindo maiores concentrações em peixes que estão no topo de cadeia pela biomagnificação (figura 2), resultando em risco para o homem, principalmente pela possibilidade de consumo de peixes e frutos do mar de águas contaminadas.

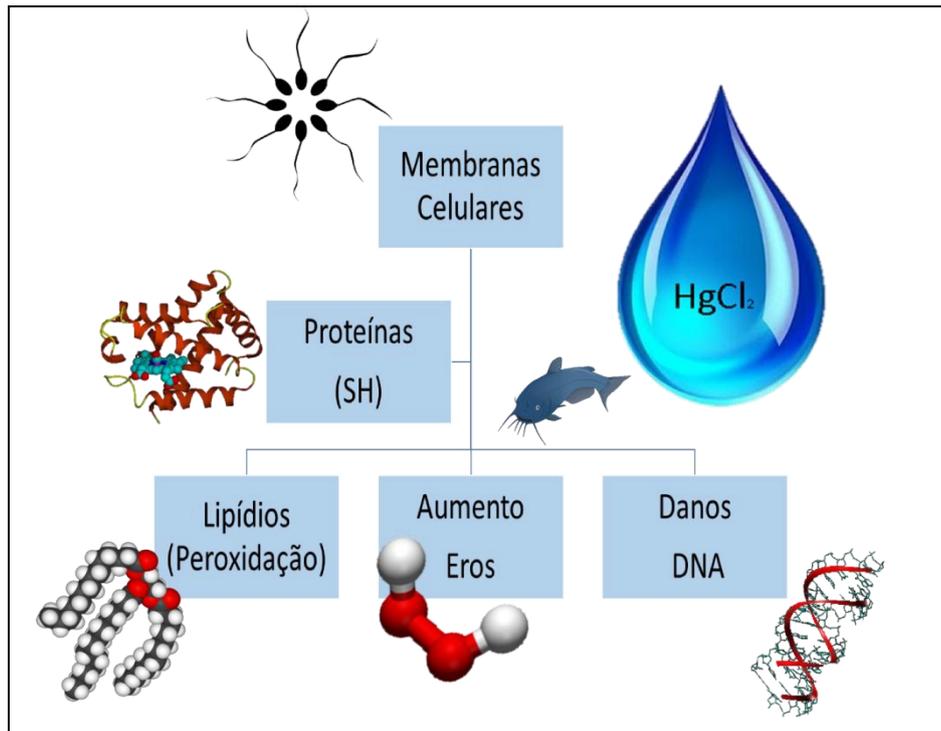


FIGURA 2 – Exemplos de danos toxicológicos que podem ser ocasionados pela biomagnificação do Mercúrio no ambiente aquático.

Fonte: Autor.

2.4 *Rhamdia quelen* (JUNDIÁ)

O nome vulgar dado aos peixes que pertencem ao gênero *Rhamdia* é jundiá. Este gênero está classificado dentro da família Heptapteridae, ordem Siluriformes, série Teleostei e classe Osteichthyes (Figura 3).



FIGURA 3 – Exemplo de *Rhamdia quelen* (Jundiá).

Fonte: Google imagens.

O *R. quelen* possui uma distribuição neotropical e pode ser encontrado desde o sudeste do México ao centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). Alguns dos nomes comuns que são atribuídos ao *R. quelen* no Brasil são, jundiá-tinga, jandiá, jandiá-tinga, sapipoca e mandi. Já na Argentina este peixe é comumente conhecido como bagre, bagre-negro, bagre-sapo e bagre-sul-americano. (GOMES, 2000).

Esta espécie não possui escamas, sendo, portanto um espécime de couro, que apresenta algumas características distintas como a sua coloração, que pode variar desde marrom-avermelhado claro a cinza, com a parte ventral do corpo mais clara. A coloração do seu corpo pode variar conforme o ambiente no qual se encontra, portanto, quando presente em ambientes claros, o jundiá tende a ficar com uma coloração mais clara, ocorrendo o inverso quando este peixe se encontra em um ambiente escuro (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004).

Conforme descreve Silfvergrip (1996), *R. quelen* pode diferenciar-se das demais espécies de *Rhamdia* através das de algumas características como: acúleo da nadadeira peitoral serrilhado em ambos os lados; nadadeira caudal com lóbulos desiguais; membrana interrredial menor do que $2/3$ do comprimento do raio do lobo superior da nadadeira caudal/ lobo inferior da nadadeira caudal; com ou sem poros sensoriais múltiplos na cabeça; véu da narina posterior aberta postero-lateralmente; arcos branquiais de 5 a 16; vértebras pós

Weberianas de 36 a 44; olhos de tamanho médio, com ou sem padrão de manchas; com ou sem uma marca tipo selim escuro na nuca. Outra característica morfológica do jundiá são os barbilhões maxilares com no mínimo 28,8% do comprimento padrão, ficam localizados junto à boca, os mesmos possuem receptores de gosto que auxiliam na localização do alimento e também, na percepção da qualidade da água (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004).

O ambiente natural do jundiá são lagos e poços fundos dos rios, tendo este preferência por ambientes de águas mais tranquilas, com fundo de areia e lama, próximo às margens e da vegetação. Normalmente, durante o dia escondem-se entre pedras e troncos, de onde saem à noite para a procura de alimento (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004). Além disso, Piaia (1999) observou em diversos experimentos realizados em cativeiro com larvas e alevinos desta espécie, uma acentuada aversão à luz e, portanto a busca destes por locais mais escuros. Já Gomes (2000), verificou que o jundiá durante seus primeiros anos de vida tem um crescimento bastante pronunciado, que geralmente é maior nos machos do que nas fêmeas, permanecendo assim até o terceiro ou quarto ano de vida. A partir deste período as fêmeas passam a ter um crescimento mais rápido em relação aos machos da espécie. Pode-se observar que em criação artificial ocorre um menor crescimento dos machos devido à maturação sexual precoce. As fêmeas tem seu máximo crescimento quando atingem cerca de 66,50 cm e os machos quando atingem aproximadamente 52,00 cm. Em relação aos machos as fêmeas apresentam um tempo de vida maior, cerca de 21 anos, enquanto os machos podem chegar a apenas 11 anos de vida (BARCELLOS, 2003).

Os jundiás adultos são omnívoros com uma clara preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais, além de detritos orgânicos (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004). Os organismos que normalmente são encontrados no conteúdo gastrintestinal de *R. quelen* em ambiente natural, não são restritos ao habitat bentônico, o que indica que o jundiá é um peixe generalista com relação à escolha do seu alimento (GUEDES, 1980).

Essa espécie atinge a maturidade sexual com cerca de um ano de idade, tanto machos quanto fêmeas. O período reprodutivo de *R. quelen* e os picos de desenvolvimento gonadal podem variar a cada ano e de um lugar para outro. O início do processo de maturação gonadal dos machos ocorre com aproximadamente 13,4 cm e as fêmeas com 16,5 cm. Quando machos e fêmeas apresentam 16,5 cm e 17,5 cm, respectivamente, ambos estão aptos para reprodução (NARAHARA, 1985). Os machos quando prontos para a espermição liberam um líquido espermático com facilidade quando se pressiona o abdome. As fêmeas quando maduras apresentam o orifício genital hepirênico avermelhado e com dilatação ventral, já os machos o orifício genital fica protraído (MARDINI, 1981).

Barcellos (2004) classifica esta espécie como uma espécie rústica, de fácil adaptação, e de bons resultados referente à produção. Trata-se de um animal com potencial de crescimento, até mesmo em temperaturas baixas, normalmente ocorridas na região Sul do Brasil. No mercado consumidor o jundiá é um peixe que apresenta boa aceitação, tanto para a alimentação quanto para a pesca, além disso, a espécie tem excelentes características para o processamento industrial (BARCELLOS, 2003).

2.5 Características seminais em peixes

2.5.1 Motilidade espermática

Diferente de espermatozoides de mamíferos, nos peixes o início da motilidade ocorre somente após a espermição, quando os mesmos entram em contato com o meio aquático, ou com o trato reprodutor das fêmeas, antes disso os espermatozoides de peixes são inativos e imóveis enquanto permanecem nas gônadas, na luz testicular. A motilidade dos espermatozoides, junto de outros fatores importantes de qualidade seminal, podem definir o sucesso das taxas reprodutivas de um animal, pois é um modo subjetivo de avaliar a qualidade espermática (MURGAS, 2004). Shimoda (2007), indica que a inibição da motilidade espermática em algumas espécies, pode estar relacionada às altas concentrações de cátions (potássio), pH ácido e também as condições isotônicas, tendo em vista que a motilidade é ativada e também inibida por alterações iônicas. Desta forma, destaca-se a importância da qualidade da água e parâmetros físico químicos no momento da fertilização dos espermatozoides em oócitos.

De modo geral, as avaliações em motilidade espermática possuem algumas limitações, que consistem na curta duração e na dificuldade de se obter uma mistura homogênea do sêmen com a solução ativadora no momento da análise. Pois espermatozoides de peixes são em sua grande maioria concentrados e com alta viscosidade. A motilidade pode durar cerca de uma hora, ou então cerca de vinte a vinte e cinco segundos dependendo da espécie avaliada, sendo que em peixes ornamentais já foram observados eventos de maior tempo, enquanto peixes de corte de águas estuarinas, um menor tempo. (COSSON, 1999). Em espécies marinhas cuja fertilização é interna, a duração dessa motilidade pode transcorrer durante quarenta e oito horas, o que implica em maiores taxas de fertilização, e também maior exposição os contaminantes do meio (YAO, 1999). A capacidade de motilidade do sêmen é

uma forma de expressar a qualidade espermática, que é usualmente expressa pela percentagem de espermatozoides móveis em sêmen adequadamente ativado.

Em algumas avaliações, ao analisar a motilidade do sêmen de bagre (*Rhamdia sapo*), Maggese, (1984) estabeleceram uma escala arbitrária de 0 a 2: onde, 0 indica espermatozoides imóveis, 1 – espermatozoides com movimentos vibratórios e 2 – espermatozoides com motilidade direcional. Enquanto, Fauvel (1999) basearam-se na escala de 0 a 5, na qual: 0 significa imobilidade; 1- de 0 a 20% de células móveis; 2 – de 20 a 40%; 3 – de 40 a 60%; 4 – de 60 a 80% e 5 – de 80 a 100% de células móveis.

Outra característica que pode ser avaliada como qualidade seminal, é a movimentação dos espermatozoides, pois os movimentos espermáticos estão diretamente relacionados com o sucesso da fecundação. Por exemplo, a porcentagem de espermatozoides com movimento circular, porcentagem com movimento não linear, porcentagem de espermatozoides com movimento linear, assim como, a velocidade dessa movimentação, podem também estar definindo características importantes da qualidade seminal (LAHNSTEINER, 1995).

2.5.2 Viabilidade espermática

O diagnóstico da infertilidade masculina é caracterizado a partir de técnicas de rotina em laboratórios através de análises microscópicas e físico-químicas do sêmen. A partir dessas análises convencionais obtêm-se informações importantes. Porém, existem algumas limitações para que se possa avaliar a capacidade de fertilização dos espermatozoides. Dessa forma, existe a necessidade da utilização de técnicas novas e que sejam mais eficazes para reprodução animal (GRAVANCE, 2001).

Diversos tipos de testes e variedades de provas foram propostos para a avaliação da viabilidade espermática. As utilizações de testes baseados na citometria de fluxo têm chamado atenção de pesquisadores, pois apresenta precisão e rapidez na obtenção dos resultados (TROIANO, 1998). Para verificar a integridade da membrana espermática Rodriguez-Martinez (1997), utilizaram o método de microscopia eletrônica (transmissão e varredura), outro método é por meio de amostras fixadas com corantes supravitais e também com o uso de sondas fluorescentes. Ao usar uma combinação de duas sondas fluorescentes (Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídio) e um citômetro de fluxo, Garner (1986) conseguiu avaliar de forma rápida e acurada uma quantidade maior de espermatozoides, sendo que, a maioria dos métodos de avaliação mais usados, analisam relativamente poucas células

espermáticas. O Iodeto de Propídio (IP) é impermeável nas membranas íntegras, portanto ao ligar-se ao DNA celular, poderá corar a membrana somente se esta estiver lesada. Já o Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) é permeável à membrana e diesterificado no interior da célula, o produto resultante, se liga ao citoplasma de células intactas, causando a fluorescência verde ao longo de todo o espermatozoide. Mais tarde este método foi adaptado por Harrison & Vickers (1990), com o uso de um microscópio de fluorescência pela adição de uma solução de formaldeído em baixa concentração à solução corante, com o intuito de imobilizar os espermatozoides, possibilitando que a análise fosse realizado de modo mais simples.

2.5.3 Capacitação espermática

Espermatozoides de mamíferos são capacitados para a fertilização do oócito, através de compostos como a heparina constituintes do trato reprodutor feminino. Contudo os peixes, por possuírem reprodução externa em sua grande maioria, além de diferenças morfológicas, como a perda do acrossomo, possuem sua capacitação também através dos íons diluídos no ambiente aquático. Sendo para esta capacitação, essencial um ambiente com solução hiperosmótica para espécies marinhas, ou hiposmótica para espécies de água doce, os espermatozoides iniciam sua motilidade. (MORISAWA, 1994).

Quando ocorre um incremento na osmolaridade em torno dos espermatozoides isso acarreta em um aumento nas concentrações intracelulares de potássio, que afeta o axonema flagelar, induzindo o início da motilidade do flagelo, em espermatozoides de espécies marinhas. Desta maneira os espermatozoides recebem sua capacitação final para fertilização. Observou-se que o volume celular é menor quando os espermatozoides encontra-se em soluções hipertônicas, ou seja, o aumento de potássio intracelular ocorre em resposta à saída de água da célula. Já nos espermatozoides de teleósteos de água doce, o volume celular aumenta em condições hipertônicas. Portanto, acredita-se que ocorre redução na concentração de potássio intracelular (MORISAWA, 1983).

As mudanças que possam ocorrer na osmolaridade externa é amplamente prejudicial à estrutura e função celular. Geralmente a hipo ou hiper osmolaridade provocam alterações no tamanho das células, causando tanto seu aumentando como a sua diminuição. Tais perturbações drásticas na homeostase das células espermáticas podem modificar as propriedades mecânico-químicas do aparelho móvel no axonema flagelar conduzindo ao início da motilidade espermática (MORISAWA, 1994). O mecanismo pelo qual ocorre o

aumento ou a diminuição das concentrações intracelulares de potássio que induzem a cascata de eventos que iniciam a motilidade espermática, em peixes de água doce e em teleósteos marinhos ainda não é conhecido (ODA & MORISAWA, 1993). Conforme constatou Tsuji (2000) em seus estudos com espermatozoides de Ayu (*Plecoglossus altivelis*), quando há diminuição das concentrações de potássio, ocorre a ativação do movimento flagelar nesses espermatozoides, concluindo-se que o íon potássio inibe o movimento flagelar nesta espécie.

Existem inúmeros estudos que demonstram que os espermatozoides de salmonídeos são imóveis quando o sêmen é diluído em meio contendo o íon potássio, provocando com essa redução da concentração no plasma seminal artificial o início da ativação do movimento flagelar (MORISAWA & SUZUKI, 1980). Nos espermatozoides de truta observou-se que a liberação de potássio do espermatozoide ocasiona hiperpolarização da membrana plasmática durante o início de sua motilidade em meios livres de potássio (BOITANO & OMOTO, 1991).

A carpa é uma das espécies em que os níveis de ATP intracelular são importantes no início da motilidade espermática, pois se encontram elevados antes do início da motilidade, e que após diminuem em decorrência da hidrólise ocasionada pela ação da Dineína ATPase (PERCHEC., 1995). Sabe-se que reconhecer os mecanismos que regulam a motilidade espermática em teleósteos, e também o mecanismo intracelular que a ativa ou inativa, é muito importante para o desenvolvimento de técnicas apropriadas para a manutenção e a conservação do germoplasma (OHTA & SHINRIKI, 1998).

2.5.4 Estrutura dos espermatozoides em peixes

Os espermatozoides de peixes possuem estruturas diversificadas, porém, assim como de outras espécies, são formados pelo processo de espermiogênese, onde na diferenciação de espermátides ocorre a formação do conteúdo nuclear (DNA), peça intermediária e desenvolvimento inicial flagelar. Porém o processo de perda do citoplasma ocorre apenas no final da espermiogênese (AIRES, 2000).

O processo de espermiogênese, os tipos de espermatozoides, assim como as estruturas espermáticas em estudos sobre as várias espécies de peixes, têm mostrado que os mesmos são conservados nos membros de uma mesma família ou subfamília e podem apresentar sinais filogenéticos (MATTEI, 1991).

Ao correlacionar a ultraestrutura dos espermatozoides de peixes, com o tipo de fertilização Jamieson (1991), classificou-os em “aquasperm” e “introsperm”. Sendo os

“aquasperm” os que estão presentes nas espécies com fertilização externa, em que os espermatozoides são liberados no ambiente aquático, e independentes do trato reprodutor feminino para sua capacitação. E os “introsperm”, são os que estão presentes nas espécies com fertilização interna, nas quais os espermatozoides são liberados dentro do trato genital feminino podendo permanecer vivos em um período de até 30 dias, como algumas espécies ornamentais: *Poecilia reticulata*, *Xiphophorus maculatus*, dentre outros.

As mitocôndrias são a fonte de energia dos espermatozoides, que garantem a energia que será utilizada no processo de motilidade. Nos espermatozoides de peixes são pequenas e pouco numerosas, e situam-se no colar citoplasmático ou peça intermediária, e são separadas do início do flagelo pelo canal citoplasmático, que é um espaço existente entre as membranas plasmática e flagelar (MATOS, 2000).

A compactação progressiva da cromatina no núcleo das espermátides e a sua forma final nos espermatozoides pode mostrar diferentes aspectos nos peixes. Tais variações não parecem estar relacionadas à Ordem a que pertencem estes animais (JAMIESON, 1991). Entretanto, em cada ordem, os espermatozoides das espécies pertencentes a uma mesma família podem compartilhar os mesmos caracteres ultraestruturais.

De maneira geral, os espermatozoides de peixes possuem características morfológicas correlacionadas com cada tipo de reprodução. Por este motivo, podem haver diferenças em características flagelares, como o número de flagelos, forma da mitocôndria, e características de forma entre os mesmos. O que reflete a complexibilidade de se manter um padrão de análise ultra estrutural para espermatozoides de peixes. (MATELLI, 1991).

3 JUSTIFICATIVA

À medida que a humanidade aumenta sua capacidade tecnológica de intervir na natureza surgem os conflitos quanto ao uso do espaço, dos recursos e da disposição dos resíduos no ambiente. Como consequência da industrialização, houve a disponibilização de uma grande diversidade de produtos químicos potencialmente tóxicos e a geração de resíduos em quantidade significativamente prejudicial ao ambiente, tais como metais pesados (ZAGATTO, 2006). Estes metais constituem uma importante classe de poluentes, e derivam tanto de fontes pontuais, como efluentes industriais e rejeitos de mineração, como de recursos difusos, como enxurradas (ZIELHUIS, 1984).

Dentre os principais contaminantes tóxicos, o mercúrio é liberado naturalmente por meio da lixiviação das rochas ou da emissão de gases em áreas vulcânicas, porém as concentrações desse metal têm aumentado muito devido às atividades antrópicas (LACERDA, 1997). No Brasil, a liberação deste metal por atividades humanas duplicou nos últimos 100 anos, superando a forma natural de liberação do metal (SCHUSTER, 2002) o que levou o Ministério da Saúde e da Agricultura a regulamentar o uso do mercúrio na indústria brasileira (BRASIL, 2010).

A contaminação ambiental por metais pesados tem sido uma das principais causas de morte de animais e desaparecimento de espécies aquáticas. Desta forma torna-se importante o conhecimento do impacto desta contaminação sob os gametas destas espécies, pois boa parte das espécies aquáticas possui sua reprodução em meio aquático, de forma externa do corpo do animal.

Embora não haja estudos definitivos que esclareçam os efeitos tóxicos do mercúrio sobre o sistema reprodutor masculino, principalmente de exposição a baixas concentrações ao metal, alguns estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando modelos animais sugerem efeitos adversos em órgãos e sistema reprodutor masculino como consequência da toxicidade do metal (MOHAMED, 1987), porém pouco se sabe sobre a interação deste metal nos gametas de peixes. O efeito de altos níveis de exposição de gametas ao mercúrio vem sendo investigado, porém os efeitos de uma exposição a baixas doses são desconhecidos. Alguns estudos como de MársicoII.(2009), Baêta (2004) e Rodrigues (2010), mencionam os efeitos *in vivo* de danos teciduais e de bioacumulação do mercúrio em peixes, mencionando ainda que estes processos podem estar afetando os processos reprodutivos e manutenção dos estoques naturais de peixes.

A partir da contextualização exposta uma maneira de mensurar estas injúrias, a realização de experimentos em laboratório, que torna-se uma importante ferramenta para a observação dos efeitos nocivos do mercúrio, na ausência de ações sinérgicas ou antagônicas que podem ocorrer com outros elementos do ambiente. Como um modelo para este tipo de avaliação em laboratório Silfvergrip (1996) destaca a espécie *R. quelen* como uma espécie potencial para estudos de impacto ambiental, pois possui uma alta distribuição mundial, fácil adaptação e manejo, e também alta produção de sêmen, podendo ser utilizado como bioindicador ambiental para tal contaminante.

Tendo em vista os fatos apresentados e carência de dados relacionados ao impacto do Cloreto de Mercúrio em baixas concentrações, nosso estudo objetiva verificar o impacto que este contaminante pode ocasionar nos espermatozoides de *R. quelen* expostos à diferentes concentrações deste contaminante no momento de sua ativação.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do Cloreto de Mercúrio em diferentes concentrações (0,0001; 0,0002; 0,002 e 0,02mg/L) na ativação de espermatozoides de *R. quelen*.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar danos morfológicos subjetivos através das análises de motilidade espermática avaliada em porcentagem (0 a 100%);
- Avaliar tempo de motilidade (motilidade progressiva) e avaliação do vigor espermático avaliados em uma escala de 0 a 5;
- Avaliar danos toxicológicos através de análises de danos na membrana plasmática, danos mitocondriais;
- Avaliar DNA dos espermatozoides ativados com diferentes concentrações de Cloreto de Mercúrio (HgCl₂).

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo que será submetido para a revista *Aquatic Toxicology*.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TOXICOLÓGICOS DOS ESPERMATOZOIDES DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HgCl₂

Rocha, S.S.¹; Streit JR, D.P.²; Varela JR, A. S.³; Corcini, D. C.⁴; Hoshiba, M.A.¹

¹ Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), AQUAPAMPA, Grupo de Estudos em Aquicultura dos Pampas, Uruguaiana, RS, Brasil.

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Laboratório de Aquicultura, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Histologia, Rio Grande, RS, Brasil.

⁴ Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Faculdade de Veterinária, Pelotas, RS, Brasil.

RESUMO

Os metais pesados são elementos químicos de alta toxicidade, que estão presentes no meio ambiente, principalmente no meio aquático. Dentre estes compostos, o Cloreto de Mercúrio (HgCl₂) vêm se destacando por sua ampla capacidade de causar danos em qualquer tecido no qual entre em contato. Desta forma, os gametas de animais aquáticos, como os peixes, que possuem reprodução externa, estão susceptíveis a esses danos. Em razão disto, nosso estudo teve como objetivo avaliar os possíveis danos toxicológicos da exposição de espermatozoides de *Rhamdia quelen* ao HgCl₂. Para isto, foram utilizados 7 animais machos de idade reprodutiva. O sêmen coletado dos mesmos foi ativado em solução de NaCl 50mM livre de HgCl₂ para o grupo controle, e soluções de NaCl 50mM com 0,0001; 0,0002; 0,002 e 0,02 mg/L de HgCl₂. Foram avaliados motilidade, vigor e tempo de motilidade como parâmetros subjetivos. Integridade de membrana, fluidez de membrana, funcionalidade mitocondrial, espécies reativas de oxigênio e fragmentação do DNA como parâmetros de toxicidade celular. E ainda, patologia espermática como parâmetro de morfologia celular. Os resultados demonstram que houve redução percentual nos parâmetros de motilidade, vigor e tempo de motilidade quando comparado ao grupo controle em todas as concentrações avaliadas. Entretanto, danos celulares, foram observados apenas, a partir da dose 0,0002mg/L, sendo eles integridade da membrana e fluidez da mesma. No parâmetro morfológico, houve diferença entre o índice de células anormais entre o grupo controle e todas as concentrações avaliadas nos grupos tratados. Estes resultados indicam que o Cloreto de Mercúrio pode ocasionar danos em espermatozoides de *Rhamdia quelen*, em todas as concentrações testadas.

Palavras chave: Peixe, Reprodução, Jundiá, Metais Pesados, Toxicologia.

**EVALUATION OF TOXICOLOGICAL EFFECTS OF DIFFERENT
CONCENTRATIONS OF HgCl₂ IN SPERM OF CATFISH (*Rhamdia quelen*)**

ABSTRACT

Heavy metals are highly toxic chemicals that are present in the environment, especially in the aquatic environment. Among these compounds, mercury chloride (HgCl₂) have been highlighted for its potential to cause damage to any tissue in which contact. Thus, the gametes of aquatic animals such as fish which have external reproduction are susceptible to such damage. For this reason, our study aimed to evaluate the putative toxicological damages of exposure of *Rhamdia quelen* sperm to HgCl₂. To this end, 7 male animals in reproductive age were used. Semen collected was activated in 50 mM NaCl, Hg-free solution for control group, and solutions with 0.0001; 0.0002; 0.002 and 0.02 mg / L of HgCl₂. We evaluated motility, vigor and motility time as subjective parameters and membrane integrity, membrane fluidity, mitochondrial functionality, reactive oxygen species and DNA fragmentation as cellular toxicity parameters. Also, sperm morphology was observed. The results show that there was a percentage reduction in motility, vigor and motility time when compared to the control group at all concentrations tested. However, cell damage was observed only above the dose 0.0002 mg/L, at membrane integrity and fluidity parameters. In the morphological parameter, there were differences of abnormal cells index between control group and all concentrations evaluated in the tested groups. These results indicate that mercury chloride may cause damage to *Rhamdia quelen* sperm at all concentrations tested.

Key words: Fish, Reproduction, Catfish, Heavy Metals, Toxicology.

Introdução

Os metais pesados podem ser definidos como contaminantes ambientais estáveis e persistentes que não são degradados ou destruídos no ambiente. 53 entre os elementos químicos conhecidos são designados como metais, dentre estes, apenas 17 são biodisponíveis e importantes para o ecossistema (CARRANZA-ÁLVAREZ, 2008).

Na crosta terrestre, os metais, de modo geral ocorrem em baixas concentrações, designados como metais traço ou elementos traço (BOTTE, 2007). No século XX houve um aumento significativo nas minerações, produzindo um aumento destes elementos na natureza, e por sua vez no meio aquático (CALLENDER, 2004). Já em meio aquático, esses elementos ocorrem naturalmente pela lixiviação de solos e rochas, e assim são diretamente expostos à água. Também por meio de fontes antrópicas como resíduos domésticos e industriais, pela aplicação de herbicidas na agricultura (EBRAHIMPOUR & MUSHRIFAH, 2008) e através de precipitação, no caso de áreas com poluição atmosférica. Nestes ecossistemas, compostos químicos e metais pesados tendem a acumular no solo e rochas (SHRIVASTAVA, 2003) e, esta biodisponibilidade ocorre quando os mesmos são liberados nos corpos d'água. Khan (2005), afirma que neste tipo de condição, os metais podem ser incorporados ao longo da cadeia alimentar e conseqüentemente podem causar danos também à saúde humana.

Desta maneira, o mercúrio é um metal pesado encontrado no estado líquido à temperatura ambiente e a 0°C tanto no solo como em ambientes aquáticos. Não apresenta funções biológicas, e é considerado um agente potencialmente tóxico por oferecer grande risco de contaminação ambiental aos animais e seres humanos. O mercúrio pode se apresentar na forma elementar (Hg^0) e também nas formas oxidadas: mercurioso inorgânico (Hg^+) e sais mercúrico (Hg^{2+}), ou ainda ligado ao Cloro, formando o Cloreto de Mercúrio ($HgCl_2$) cada qual diferindo quanto aos níveis de toxicidade e propriedades físico-químicas (CLARKSON, 1997; GOLDMAN & SHANNON, 2001).

Os íons tóxicos relacionados podem interferir diretamente no processo de reprodução de peixes, tendo em vista que os mesmos realizam reprodução com fecundação externa, dependente dos íons aquáticos para que a mesma ocorra. No momento em que há a exposição dos gametas no meio aquático, os mesmos também estão expostos aos contaminantes, que podem interferir ou até mesmo impedir que a fecundação ocorra (ANDRADE, 2003). Com espermatozoides de jundiá (*Rhamdia quelen*) esta condição não seria diferente. Pois, possuem uma membrana sensível à troca de íons no meio aquático, para que ocorra a sua capacitação e início da motilidade (WOYNAROVICH, 1983). Os espermatozoides quando entram em

contato com a água perdem quase que de forma total sua capacidade de proteção, que está presente em boa parte no plasma seminal. Este processo pode acarretar em uma maior sensibilidade quanto à exposição à metais pesados e contaminantes ambientais.

Sendo assim, a partir do exposto, o intuito desse estudo foi verificar o potencial toxicológico de baixas concentrações de Cloreto de Mercúrio (HgCl_2) no momento da capacitação e ativação de espermatozoides de *R. quelen*.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados 7 reprodutores de *R. quelen*, do AQUAM da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os peixes foram selecionados por características secundárias reprodutivas.

Os machos utilizados tinham uma média de $489,42 \pm 137,0$ g de peso e $36,78 \pm 3,13$ cm de comprimento total. Após a retirada da água os animais foram envolvidos em uma toalha úmida e sofreram uma compressão da região abdominal no sentido ântero-posterior, e o sêmen recolhido em tubos de ensaio graduados para a mensuração do volume total. A partir da coleta de sêmen foram realizadas as análises *in natura*, de cada amostra coletada de cada um dos 7 animais.

Soluções

Foram testadas 4 diferentes concentrações de Cloreto de Mercúrio (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA): 0,0001; 0,0002; 0,002 e 0,02mg/L de HgCl_2 , todas diluídas em uma solução de 50mM de Cloreto de Sódio (NaCl). O Cloreto de Sódio, na concentração de 50mM é indicado como solução ativadora para espermatozoides de peixe, por sua vez foi utilizado também como solução controle. As concentrações utilizadas foram estabelecidas baseadas na concentração máxima permitida pelo CONAMA (0,0002mg/L).

Patologia espermática

Para a avaliação de patologia espermática os espermatozoides foram ativados com as diferentes concentrações de HgCl₂ (0; 0,0001; 0,0002; 0,002 e 0,02mg/L) na proporção 1:1 (sêmen:solução ativadora) durante 60 segundos e posteriormente fixados em solução formol – salina na proporção 1:1500 (Sêmen:Solução diluente).

Foram produzidos esfregaços com sêmen diluído em solução formol salina, corados com rosa de bengala conforme STREIT Jr. et al. (2004). Após a secagem as lâminas foram levadas ao microscópio óptico com objetiva 10X. Foram analisadas 300 células por grupo e consideradas patologias primárias: cabeça degenerada, microcefalia, macrocefalia, cauda quebrada, peça intermediária degenerada, cauda enrolada e cauda degenerada, e secundárias: cauda dobrada e cabeça isolada.

Análise de Motilidade e Vigor

Esta avaliação utilizou a mesma metodologia para o sêmen fresco: Adicionou-se 1µl de sêmen e 99µl de NaCl 50mM (25°C) em lâmina sob lamínula e analisou-se as amostras em microscópio de contraste de fases (40X), seguindo o método descrito por Sorensen Junior (1979).

Citometria de fluxo

As análises de integridade de membrana (IM), funcionalidade mitocondrial (FM), índice de fragmentação do DNA (DFI), e fluidez de membrana (FLU) foram realizadas no citômetro de fluxo Attune Acoustic Focusing (R) (Life Technologies) equipado com lasers azul (488 nm) e violeta (405 nm), sendo os dados analisados através do Attune (R) Cytometer software versão 2.1.0 (Life Technologies). Para a detecção de populações espermáticas em todas as análises, as células foram coradas com Hoechst 33342 e detectadas pelo fotomultiplicador (PMT) VL1 (450/40 nm) e os eventos não-espermáticos foram eliminados com base em gráficos de dispersão (NAGY, 2003).

Para avaliação de integridade de membrana plasmática foi utilizada a sonda fluorescente diacetato de carboxifluoresceína e para funcionalidade de mitocôndrias a rodamina 123, avaliadas no PMT BL1 a 530/30nm. A fluorescência laranja da merocianina 540 (fluidez da membrana plasmática) foi detectada com PMT BL2 (575/24 nm). A fluorescência vermelha

de iodeto de propídio (integridade da membrana plasmática) foi lida com o PMT BL3 (640 nm). Dez mil eventos espermáticos foram analisados por amostra a uma taxa de fluxo de 200 μL / segundo.

Integridade de Membrana

A avaliação de integridade de membrana ocorreu pela combinação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e iodeto de propídio (IP), sendo que o DCF penetra os espermatozoides e é convertido intracelularmente por esterases em células viáveis em um composto fluorescente não-permeável que é retido no citoplasma, ao passo que o IP penetra apenas nos espermatozoides com membrana lesada. A solução de trabalho utilizada para a coloração dos espermatozoides continha PBS, aHoechst 33342 (16,2 μM), DCF (20 μM) e IP (7,3 μM). Espermatozoides foram classificados como não lesados (DCF + / IP), e lesados (DCF + / IP +; DCF- / IP +; DCF- / IP) (GILLAN, 2005; FERNÁNDEZ-GAGO, 2013).

Funcionalidade de Mitocôndria

A avaliação da funcionalidade mitocondrial foi obtida através da sonda fluorescente rodamina 123 que corou mitocôndrias e concentrou naquelas com a funcionalidade alta (alto potencial eletroquímico) emitindo fluorescência verde mais intensa. A Rodamina 123 estava presente na solução de trabalho contendo PBS, a Hoechst 33342 (16,2 μM) e rodamina 123 (13,0 μM). Os espermatozoides foram classificados como aqueles com elevada funcionalidade de mitocôndrias (fluorescência elevada, maior acúmulo de rodamina) e baixo funcionalidade de mitocôndrias (fluorescência baixa, menor acúmulo de rodamina) (GILLAN, 2005).

Produção de espécies reativas de oxigênio intracelulares

Nesta avaliação utilizou-se a sonda fluorescente 2'7 diacetato de diclorofluoresceína (H2DCF-DA), que é oxidado por EROs intracelular. Este corante estava presente na solução contendo PBS, H2DCF-DA (1,0 mM) e Hoechst 33342 (16, 2 μM). A mediana da intensidade de fluorescência verde foi utilizada para esta análise (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, 2011)

Índice de fragmentação de DNA

O índice de fragmentação do DNA foi obtido com a sonda fluorescente metacromática alaranjado de acridina no ensaio de estrutura da cromatina espermática (do inglês SCSA) segundo (EVENSON, 1994).

Fluidez de membrana plasmática

A avaliação da fluidez da membrana plasmática foi determinada pela sonda fluorescente hidrofóbica, a merocianina 540 (2,7 mM) e Hoechst 33342 (16,2 µM) em PBS. As células foram classificadas quanto à alta fluorescência (alta fluidez) e baixa fluorescência (baixa fluidez) (FERNÁNDEZ-GAGO, 2013).

Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão do número de células utilizadas em cada análise. O resíduo foi testado para a distribuição normal, e os dados foram submetidos a análise de variância sendo as médias comparadas com o auxílio do teste de *Tukey* ($p < 0,05$) para motilidade, vigor, tempo de motilidade e patologias espermáticas. Para integridade da membrana, fluidez da membrana, funcionalidade mitocondrial, espécies reativas de oxigênio e fragmentação de DNA foi utilizado o método *LSD All-Pairwise Comparisons Test*. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Nos resultados referente à motilidade espermática, foi possível observar redução no percentual de espermatozoides móveis em todas as concentrações avaliadas em relação ao controle $P < 0,05$, sendo letal aos espermatozoides na maior concentração testada, 0,02 mg/L (Tabela 1). Quanto a avaliação de vigor espermático em uma escala que varia de 1 a 5, também houve redução do vigor em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle, e apenas no tratamento com concentração de 0,02 mg/L, ocorreu a perda de motilidade total dos espermatozoides (Tabela 1).

Resultados referentes ao tempo de motilidade dos espermatozoides avaliados indicam uma redução do tempo em todos os grupos quando comparados ao controle (Tabela 1).

Tabela1 – Parâmetros de motilidade, vigor e tempo de motilidade de espermatozoides de *R. quelen* ativados com diferentes concentrações de Cloreto de Mercúrio (HgCl₂).

Tratamentos	Motilidade (%)	Vigor (Pontos)	Tempo Motilidade (s)
Controle	70,0 ± 2,93 ^a	3,71 ± 0,24 ^a	57,28 ± 4,56 ^a
[] 0,0001 mg/L	12,85 ± 2,64 ^b	1,21 ± 0,14 ^b	25,14 ± 3,13 ^b
[] 0,0002 mg/L	6,21 ± 1,13 ^{bc}	1,0 ± 0 ^b	16,07 ± 2,15 ^{bc}
[] 0,002 mg/L	4,0 ± 0,73 ^c	0,85 ± 0,14 ^b	11,57 ± 2,53 ^c
[] 0,02 mg/L	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^c

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05).

Para as variáveis toxicológicas analisadas em citometria de fluxo, a integridade de membrana apresentou danos nos grupos 0,0002; 0,002 e 0,02 mg/L quando comparado ao controle. No entanto não foram encontradas diferenças entre os grupos tratados. Resultados similares foram obtidos para a variável fluidez de membrana, demonstrando que as concentrações 0, 0002; 0,002 e 0,02 mg/L afetaram da mesma maneira a integridade e consequentemente a fluidez da membrana.

Para as avaliações de funcionalidade de mitocôndria, espécies reativas de oxigênio e fragmentação de DNA, não foram encontradas diferenças, em nenhum grupo avaliado (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros de dano celular de espermatozoides de *R. quelen* ativados com diferentes concentrações de Cloreto de Mercúrio (HgCl₂).

Tratamentos (%)	Integridade de Membrana	Fluidez de Membrana	Funcionalidade de Mitocôndria	Espécies reativas de Oxigênio	Fragmentação do DNA
Controle	50,8 ± 5,9 ^a	95,4 ± 0,6 ^a	26,3 ± 3,6 ^a	1380,6 ± 48,8 ^a	94,9 ± 0,9 ^a
[] 0,0001 mg/L	39,2 ± 5,0 ^{ab}	92,8 ± 0,7 ^{ab}	23,6 ± 2,8 ^a	1442,7 ± 54,1 ^a	94,0 ± 1,1 ^a
[] 0,0002 mg/L	32,6 ± 4,1 ^b	91,7 ± 0,9 ^b	17,6 ± 2,2 ^a	1580,6 ± 211,7 ^a	95,3 ± 0,8 ^a
[] 0,002 mg/L	31,6 ± 4,5 ^b	90,0 ± 2,0 ^b	18,0 ± 2,8 ^a	1648,6 ± 135,6 ^a	95,4 ± 0,9 ^a
[] 0,02 mg/L	32,8 ± 4,4 ^b	89,5 ± 1,3 ^b	18,3 ± 3,3 ^a	1427,1 ± 77,3 ^a	94,8 ± 1,3 ^a

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não apresentam diferenças significativas pelo teste de LSD. (p<0,05).

Na avaliação quanto às patologias espermáticas, foram observadas diferenças significativas entre o controle e os grupos tratados com cloreto de mercúrio, sendo posteriormente reclassificados em normais e anormais (tabela 3.). As células espermáticas com características normais podem ser observadas na figura 1. O grupo controle apresentou um maior número de células normais. O oposto ocorreu em todas as concentrações de mercúrio avaliadas, tendo uma maior taxa de células anormais do que células normais, após a exposição ao cloreto de mercúrio.

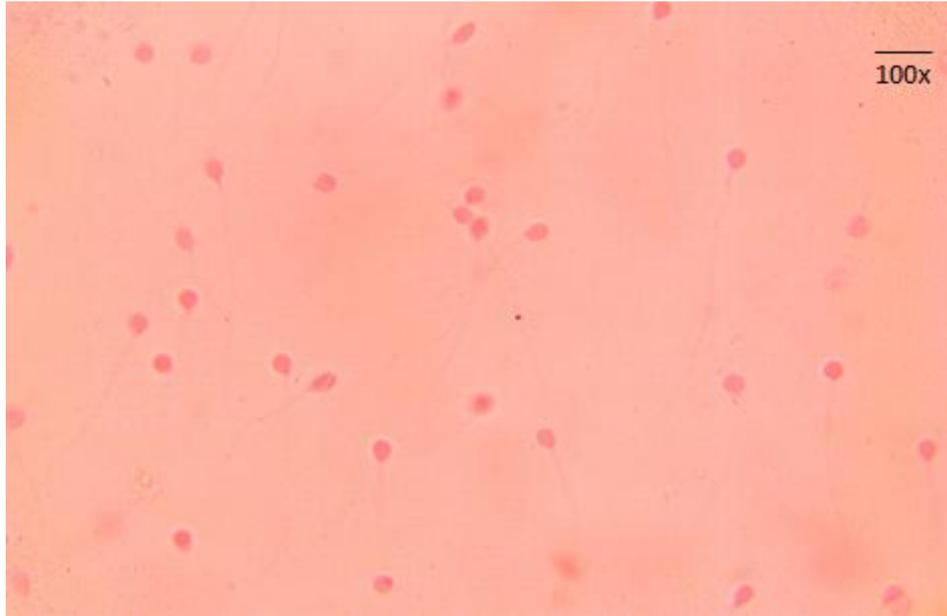


Figura 1 – Imagem microscópica de um pool de células espermáticas de *Rhamdia quelen* ativadas livres de Cloreto de Mercúrio, coradas com rosa de bengala.

As patologias, referente às células anormais analisadas de cada grupo, foram agrupadas em primárias e secundárias. Onde no grupo controle as patologias primárias apareceram em maior quantidade que as secundárias ($21,20 \pm 5,9$; $16,50 \pm 1,9\%$ respectivamente). As porcentagens de patologias primárias encontradas foram maior em todos os grupos avaliados que no tratamento controle, porém não diferiram entre os tratamentos avaliados. Em todas as concentrações testadas às patologias primárias foram maiores que as patologias secundárias, não havendo diferenças entre as mesmas (Tabela 3). Na figura 2 podem ser observados exemplos de patologias primárias.

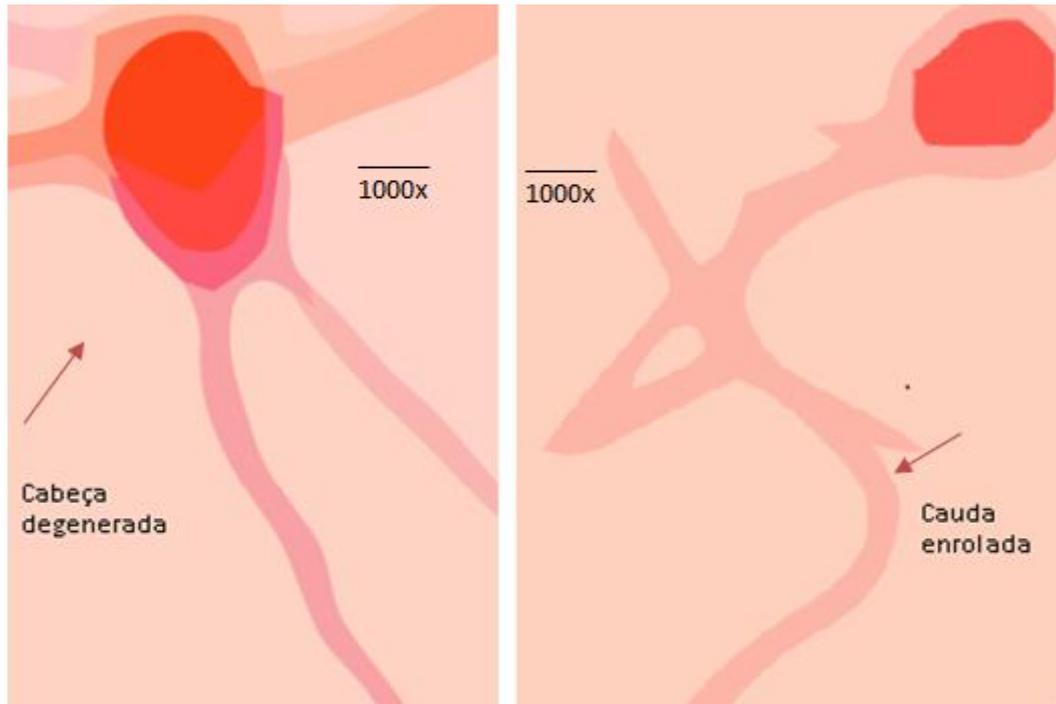


Figura 2 – Imagem microscópica vectorizada de células espermáticas de *Rhamdia quelen* ativadas com 0,0002mg/L de HgCl₂ coradas com rosa de bengala.

As patologias secundárias foram maiores que no grupo controle nos 2 grupos com maior concentração de mercúrio (0,02 mg/L e 0,002 mg/L). Sendo que o grupo com maior concentração apresentou a maior porcentagem de patologias quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 – Índices de patologias espermáticas avaliadas em espermatozoides de *Rhamdia quelen* ativados com diferentes concentrações de Cloreto de Mercúrio (HgCl₂).

	Controle	[] 0,0001 mg/L	[] 0,0002 mg/L	[] 0,002 mg/L	[] 0,02 mg/L
Normais (%)	62,28 ± 5,0 ^a	18,19 ± 4,2 ^b	13,52 ± 1,4 ^b	13,33 ± 2,3 ^b	14,0 ± 2,4 ^b
Patologia Primária (%)	21,20 ± 5,9 ^b	55,60 ± 4,8 ^a	57,90 ± 1,5 ^a	50,00 ± 3,5 ^a	48,00 ± 3,5 ^a
Patologia Secundária (%)	16,50 ± 1,9 ^c	24,30 ± 3,6 ^{cb}	29,30 ± 2,0 ^{abc}	36,90 ± 2,5 ^{ba}	37,90 ± 4,7 ^a

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05).

Discussão

Inúmeros estudos relatam os danos de contaminantes ambientais, como metais pesados sob a reprodução de peixes (MÁRSICOII, 2009; da SILVA, 2006; RODRIGUES, 2010). Tais estudos demonstram a bioacumulação de metais pesados em gônadas, danos no desenvolvimento de larvas, disfunção endócrina, dentre outras diversas patologias mencionadas (QIAO-QIAO, 2007). Porém, pouco se sabe sobre seu efeito direto nos gametas no meio aquático.

Os peixes são animais predominantemente aquáticos, e na sua maioria, possuem sua reprodução externa. Os espermatozoides são lançados no meio e sua ativação e capacitação ocorrem apenas quando há o choque osmótico, no momento do contato direto com a água (ANDRADE, 2003). Atualmente, o meio aquático vem sendo amplamente utilizado como receptor de dejetos tanto industriais como da agricultura, o que pode ocasionar um nível de contaminação elevado, afetando diretamente a qualidade dos gametas e sua capacidade de fertilização (LINS, 2003).

No presente estudo, foi possível observar uma redução dos índices de motilidade, vigor e tempo de motilidade em todas as concentrações avaliadas. Os efeitos deletérios do cloreto de mercúrio nos índices reprodutivos do *R. quelen*, foram observados por McIntyre em (1973) em um dos primeiros relatos na literatura, mencionando a toxicidade do metil mercúrio para espermatozoides de peixes. Muito embora não tenha sido realizado experimento com taxa de fertilização, a redução qualitativa dos valores da motilidade, vigor e tempo da motilidade, podem ser atribuído indiretamente a uma perda de qualidade seminal quando o material foi exposto nas diferentes concentrações de cloreto de mercúrio. Por exemplo, Billard (1985) relatou que 1.0 ppm de Cloreto de Mercúrio reduziu significativamente a capacidade de fertilização dos espermatozoides de truta arco-íris (*Salmo gairdneri*), enfatizando que mesmo baixas concentrações deste metal podem induzir danos no momento da reprodução de diversas espécies.

De conformidade com Kihlstrom (1971), em um estudo com *zebrafish* (*Brachydanio rerio*), também utilizando a exposição em uma concentração de 1.0 ppm, porém de Acetato de Fenilmercúrio, observou uma redução na produção de ovos. McKim (1976) também corrobora com estes dados, observando uma alta redução nos índices de reprodução de Truta (*Salvelinus fontinalis*) quando expostos ao Metil Mercúrio.

Estes efeitos deletérios do mercúrio na reprodução de peixes podem estar relacionados com a qualidade dos espermatozoides, tendo em vista que no presente estudo, os danos na

membrana dos espermatozoides foram responsáveis pela redução dos índices de motilidade, vigor e tempo de motilidade.

Igualmente, a um nível subcelular, a qualidade do espermatozoide pode ser avaliada pela integridade da membrana plasmática do espermatozoide. A membrana plasmática de maneira geral controla a troca de íons e água do meio intra e extra celular (COSSON, 2008). Tendo em vista que a integridade da membrana é essencial para a penetração do espermatozoide no oócito, a redução desta capacidade compromete sua capacidade fecundante.

Pode ser observado em nosso estudo que em relação a fluidez da membrana, também houve uma redução dos valores, nas concentrações 0,0002; 0,002 e 0,02 mg/L de cloreto de Mercúrio. Com a fluidez da membrana afetada, a troca de íons foi comprometida. Desta maneira a ativação e capacitação dos espermatozoides, que é diretamente relacionada com a troca de íons do meio aquático também foram afetadas. Dietrich (2010), avaliando espermatozoides de truta arco-íris incubados com diferentes concentrações de Mercúrio verificou danos aos espermatozoides imediatamente a exposição à concentração de 1mg/L, e por sua vez com Cádmio, após o período de incubação de 24h. O autor relacionou que os danos de redução de motilidade, poderiam estar relacionados à fluidez da membrana plasmática e a troca de íons. Dessa forma, sugere-se que pode ocorrer um efeito indireto, da integridade e fluidez da membrana via peroxidação lipídica, pois estes danos de membrana podem vir a ocorrer através deste processo, pelo fato do mercúrio ser um metal que atua como pró-oxidante. Rao (2008) verificou que espermatozoides de ratos quando expostos à 1uM de cloreto de Mercúrio, possuem um aumento significativo dos níveis de peroxidação lipídica, que por sua vez agride a membrana plasmática dos espermatozoides, ocasionando redução de fertilização, motilidade e até mesmo a mortalidade dos mesmos.

Ainda que os resultados encontrados referente às patologias espermáticas, indicam que até mesmo a menor dose utilizada em nosso estudo foi capaz de aumentar o número de células anormais. A exposição ao Mercúrio ocasionou uma modificação morfológica nas células espermáticas, porém não existem estudos comprobatórios de que espermatozoides de peixes com alguma anormalidade não fecundem.

A determinação de percentuais aceitáveis de patologias pode contribuir para a otimização dos processos reprodutivos, e no caso de nosso estudo contribuir na avaliação toxicológica, juntamente com os outros parâmetros analisados (STREIT JR, 2008). As patologias secundárias, são consideradas deformações ultra estruturais que ocorrem no momento em que o espermatozoide entra em contato com o meio aquático, normalmente

incapacitando a locomoção dos espermatozoides, pois são relacionadas a danos no flagelo. Em nosso estudo estas deformações ocorreram em maior incidência nas mais altas concentrações de cloreto de Mercúrio avaliadas (0,02 mg/L e 0,002 mg/L de HgCl₂). Este resultado indica que concentrações elevadas de Mercúrio podem ocasionar deformações deletérias nos espermatozoides, e possivelmente uma incapacidade de locomoção, o que corrobora com o fato de que na mais alta concentração avaliada neste estudo, não houve motilidade dos espermatozoides.

Assim como para os mamíferos, metais como o Cádmiio e Mercúrio podem ter efeitos deletérios na reprodução (ROYCHOUDHUR, 2010), estudos como de Kime (2001), Rurangwa (1998) e Crump (2009) corroboram com os dados encontrados em nosso trabalho. Os autores ressaltam os efeitos toxicológicos do Mercúrio sob os espermatozoides e oócitos, e os danos causados pela biomagnificação do Mercúrio no meio aquático. Estes estudos contribuem com nossos resultados, salientando o potencial toxico do Mercúrio em meio aquático e terrestre.

Considerações Finais

Tendo em vista os resultados de nosso estudo é possível afirmar que até mesmo a mais baixa concentração utilizada (0,0001mg/L) de Cloreto de Mercúrio foi capaz de causar redução no potencial de motilidade dos espermatozoides de *Rhamdia quelen*. Contudo, danos significativos de membrana foram detectados apenas na concentração de 0,0002mg/L. Em relação às patologias avaliadas, foi possível observar que as mesmas estão relacionadas com a redução de motilidade dos espermatozoides, quando em contato com o Mercúrio. Entretanto, para que seja esclarecida toda a rota de contaminação e possíveis danos oxidativos ocasionados pelo Cloreto de Mercúrio, se fazem necessários mais estudos neste segmento.

Referências

Andrade, D. R., & Yasui, G. S. (2003). Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 27(2), 166-172.

Billard, R., & Roubaud, P. (1985). The effect of metals and cyanide on fertilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Research*, 19(2), 209-214.

Botté, S. E., Freije, R. H., & Marcovecchio, J. E. (2007). Dissolved heavy metal (Cd, Pb, Cr, Ni) concentrations in surface water and porewater from Bahía Blanca estuary tidal flats. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 79(4), 415-421.

Callender, E. (2003). Heavy metals in the environment-historical trends. *Treatise on geochemistry*, 9, 67-105.

Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A. J., Alfaro-De La Torre, M. C., & García-De La Cruz, R. F. (2008). Accumulation and distribution of heavy metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an artificial lagoon in San Luis Potosí, México. *Water, air, and soil pollution*, 188(1-4), 297-309.

Clarkson, T.W. (1997). The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 34:369–403.

Cosson, J., Groison, A. L., Suquet, M., Fauvel, C., Dreanno, C., & Billard, R. (2008). Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction*, 136(3), 277-294.

Crump, K. L., & Trudeau, V. L. (2009). Mercury-induced reproductive impairment in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(5), 895-907.

da Silva, D. S., Lucotte, M., Roulet, M., Poirier, H., Mergler, D., & Crossa, M. (2006). Mercúrio nos peixes do rio Tapajós, Amazônia Brasileira. *InterfacEHS*, 1(1).

Dietrich, G. J., Dietrich, M., Kowalski, R. K., Dobosz, S., Karol, H., Demianowicz, W., & Glogowski, J. (2010). Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. *Aquatic toxicology*, 97(4), 277-284.

Domínguez-Rebolledo, A.E.; Martínez-Pastor, F.; Bisbal, A.F.; Ros-Santaella, J.L.; García-Álvarez, O.; Maroto-Morales, A. et al.(2011). Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. *Reprod Domest Anim* 46, 393-403.

Streit-Junior, D. P., Moraes, G. V., Ribeiro, R. P., Povh, J. A., Souza, E. D., & Oliveira, C. A. (2004). Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arq. ciênc. vet. zool. UNIPAR*, 7(2), 157-162.

Ebrahimpour, M., & Mushrifah, I. (2008). Heavy metal concentrations in water and sediments in Tasik Chini, a freshwater lake, Malaysia. *Environmental monitoring and assessment*, 141(1-3), 297-307.

Evenson, D.P.; Thompson L.; Jost, L.; (1994). Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41 637-51.

Fernández-Gago, R.; Domínguez, J.C.; Martínez-Pastor, F. (2013). Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study *Theriogenol* 80. 400-410.

Gillan, L.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C.; (2005) Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential *Theriogenol*, 445-457.

Goldman, L.R., Shannon, M.W. (2001). The Committee on Environmental Health. Technical Report: mercury in the environment: implications for pediatricians. *Pediatrics* 108:197–205.

Khan, R., Israili, S. H., Ahmad, H., & Mohan, A. (2005). Heavy metal pollution assessment in surface water bodies and its suitability for irrigation around the Neyevli lignite mines and associated industrial complex, Tamil Nadu, India. *Mine Water and the Environment*, 24(3), 155-161.

Kihlström, J. E., Lundberg, C., & Hulth, L. (1971). Number of eggs and young produced by zebrafishes (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.) spawning in water containing small amounts of phenylmercuric acetate. *Environmental research*, 4(4), 355-359.

Kime, D. E., Van Look, K. J. W., McAllister, B. G., Huyskens, G., Rurangwa, E., & Ollevier, F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4), 425-433.

- Lewin, L.M.; Golan, R.; Freidlin, P.; Shochat, L. (1999). A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 124, 133-137.
- Lins, J. A. P. N., Kirschnik, P. G., Queiroz, V. S., & Cirio, S. M. (2010). Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Rev. Acad. Ciên. Agrár. Ambient*, 8, 469-484.
- MársicoII, T. P. C. E. T., MedeirosIII, R. J., & SobreiroV, R. T. L. G. (2009). Concentração de mercúrio e análise histopatológica em músculo, rim e cérebro de peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) coletados na praia de Itaipu, Niterói. *Ciência Rural*, 39(2), 540-546.
- McIntyre, J. D. (1973). Toxicity of methylmercury for steelhead trout sperm. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 9, 98-99.
- McKIM, J., Olson, G. F., Holcombe, G. W., & Hunt, E. P. (1976). Long-term effects of methylmercuric chloride on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*): toxicity, accumulation, distribution, and elimination. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 33(12), 2726-2739.
- Nagy, S.; Jansen, J.; Topper, E. K.; Gadella, B.M.; (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles *Biol Reprod*. 68, 1828-35.
- Qiao-Qiao, C., Guang-Wei, Z. e Langdon, A. 2007. Bioaccumulation of heavy metals in fishes from Taihu Lake, China. *Journal of Environmental Sciences* 19: 1500–1504.
- Rao, M. V., & Gangadharan, B. (2008). Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicology In Vitro*, 22(4), 935-942.
- Roychoudhury, S., Massanyi, P., Bulla, J., Choudhury, M. D., Lukac, N., Filipejova, T., & Almasiova, V. (2010). Cadmium toxicity at low concentration on rabbit spermatozoa motility, morphology and membrane integrity in vitro. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 45(11), 1374-1383.

Rodrigues, A. P. D. C., Carvalheira, R. G., Cesar, R. G., Bidone, E. D., Castilhos, Z. C., & Almosny, N. R. P. (2010). Bioacumulação de mercúrio em quatro espécies de peixes tropicais oriundos de ecossistemas estuarinos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Anuário do Instituto de Geociências*, 33(1), 54-62.

Rurangwa, E., Roelants, I., Huyskens, G., Ebrahimi, M., Kime, D. E., & Ollevier, F. (1998). The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology*, 53(2), 402-413.

Shrivastava, P., Saxena, A., & Swarup, A. (2003). Heavy metal pollution in a sewage-fed lake of Bhopal, (MP) India. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 8(1), 1-4.

Sorensen, A.M.; (1979). *A laboratory for animal reproduction*. 4. Ed. Massachusetts: American Press 178p

Streit Jr, D. P., Sirol, R. N., Ribeiro, R. P., Moraes, G. V., Galo, J. M., & Digmyer, M. (2008). Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativo. *B. Inst. Pesca*, 34, 337-44.

Woyanovich, E., & Horváth, L. (1983). *A propagação artificial de peixes de águas tropicais*. FAO/CODEVASF/CNPQ.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABEL, P. D. **Water pollution biology**. Chichester: Ellis Howood. 328p. 1989.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do mercúrio**. Editora Rima, São Carlos, 272p. 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Portaria N° 685, de 27 de agosto de 1998. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. **D.O.U.** 29 agosto 1998.

ALEXANDRE, S. C. **Caracterização de área contaminada por mercúrio em Descoberto-Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

ALLOWAY, B. J. (Ed.). **Heavy metals in soils**. Springer Science & Business Media. 1995.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do mercúrio**. São Carlos: Rima. 2003.

ALVAREZ, C. A.; & MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e vitamina c sobre o sêmen. **SaBios: Rev. Saúde e Biologia**., Campo Mourão, v. 1, n.1. 2006.

ADAMS, S. M.; GELLEY, M. S. **Ecotoxicological indicators of water quality: using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems**. Water, air, and soil pollution; 123:103-115. 2000.

ADAMS, S. M. **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. Americas fishers society, 3:104-112. 2002.

AIRES, E. D, STEFANINI, M. A., & ORSI, A. M. Características ultra-estruturais e diferenciativas das espermatídes de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante a espermiogênese. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 37(3), 183-188. 2000.

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

BUCIO, L.; SOUZA, V.; ALBORES, A.; SIERRA, A.; CHÁVEZ, E.; CÁRABEZ, A.; GUTIERREZ-RUIZ, M. C. Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). **Toxicology**. 102:285-299, 1995.

BISINOTI, M. C., & JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Química Nova**, 27(4), 593-600. 2004.

BISINOTI, M. C., SARGENTINI JÚNIOR, É & JARDIM, W. F. Seasonal behavior of mercury species in waters and sediments from the Negro River Basin, Amazon, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(3), 544-553, 2007.

BALDISSEROTTO, B., & RADÜNZ NETO, J. Criação de jundiá. Ed. UFSM. 2004.

BARCELLOS, L. J., WASSERMANN, G. F., SCOTT, A. P., WOEHL, V. M., QUEVEDO, R. M., ITZÉS, I., & LULHIER, F. Steroid profiles in cultured female jundiá, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 121(3), 325-332. 2001.

BARCELLOS, L. J. G., KREUTZ, L. C., QUEVEDO, R. M., FIOREZE, I., CERICATO, L., SOSO, A. B., ... & RITTER, F. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture*, 232(1), 383-394, 2004.

BOITANO, S. & OMOTO, C. K. Membrane hiperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH. *J. Cell. Sci.* v. 98, p. 343-349, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Coletânea de Informações sobre o Mercúrio Incluindo padrões ambientais no Brasil**. 27 de Janeiro de 2010.

BENCHARIF, D, L. The Advantages of Combining Low-Density Lipoproteins with Glutamine for Cryopreservation of Canine Semen. *Reprod. Dom. Anim.*, 45: 189-200, 2010.

BOMBARDELLI, R. A., MÖRSCHBÄCHER, E. F., CAMPAGNOLO, R., SANCHES, E. A., & SYPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(4), 1251-1257, 2006.

BEHR, E. R., NETO, J. R., TRONCO, A. P., & FONTANA, A. P. Influência de diferentes níveis de luminosidade sobre o desempenho de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*)(Quoy e Gaimard, 1824)(Pisces: Pimelodidae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 21, 325-330, 2008.

BAÊTA, A. P. **Mercúrio Total e Metilmercúrio em Tecidos de Diferentes Espécies de Peixes da Baía de Guanabara**. Tese de doutorado, PUC-Rio. 2004.

CONAMA, **R. 344, de 25 de março de 2004**. Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, 344. 2004.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Decisão de Diretoria nº. 195-2005-E de 2005**, de 23 de novembro de 2005.

CANELA, M. C. **Determinação de Mercúrio**. UNICAMP. 1995.

CONNELL, D. W.; MILLER, G. J. **Chemistry and ecotoxicology of pollution**. John Willey & Sons. 444p., 1984.

CONAMA, **Resolução. 357, de 17 de Março de 2005**. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, v. 357, 2005.

COSSON, J., BILLARD, R., CIBERT, C., DRÉANNO, C. **Ionic factors regulating the motility of fish sperm in The Male Gamete. Chapter 16:161-186**, 1999.

COSSON, J., LINHART, O.; MIMS, S.; SHELTON, W.; RODINA, M. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. *J. Fish Biol.* v. 56, p. 1348 – 1367, 2000.

CARDOSO, P. C. D. S.; LIMA, P. L. D.; BAHIA, M. D. O.; AMORIM, M. I. M. D.; BURBANO, R. R.; FARIAS, R. A. F. Efeitos biológicos do mercúrio e seus derivados em seres humanos: uma revisão bibliográfica. **Rev. para. med**, 15(4), 51-58, 2001.

DREANNO, C.; COSSON, J.; CIBERT, C.; ANDRÉ, F.; SUQUET, M.; BILLARD, R. CO₂ effects on Turbot *Scophthalmus maximus* spermatozoa motility in July Goetz, F.W. and Thomas, P. Eds. **Proceedings** of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Texas At Austin – Austin, Texas. 1995.

DE LOS ANGELES GASALLA, M. & SOARES, L. S. H. Comentários sobre os estudos tróficos de peixes marinhos no processo histórico da ciência pesqueira e modelagem ecológica. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 27(2), 243-259. 2001.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. **Med Chem**. 1:529-39, 2001.

EMRI, M.; MÁRIÁN, T.; TIRÓN, L.; BALKAY, L.; KRASZNAI, Z. Temperature adaptation changes ion concentrations in spermatozoa and seminal plasma of common carp without affecting sperm motility. *Aquaculture* v. 167, p. 85-94. 1998.

FÖRSTNER, U. E.; WITTMAN, G. T. W. **Metal pollution in the aquatic environment**. 2ed. Berlin, Springer-Verlag, 475-486p., 1983.

FAUVEL, C.; SAVOYE, O.; DREANNO, C.; COSSON, J.; SUQUET, M. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. **Journal of Fish Biology**, v.54, p.356-369. 1999.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 17(único), p. 1-3. 1990.

FÖRSTNER, U. E.; WITTMAN, G. T. W. **Metal pollution in the aquatic environment**. 2. ed. Berlin, Spriger-Verlag, pp. 475-486, 1983.

FERREIRA, A. A.; NUÑER, A. D. O.; LUZ, R. K.; TATAJE, D. A. R.; ESQUIVEL, J. R., & RESTREPO, J. B. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, 27(1), 57-60. 2001.

GUNBY, J.; DAYA, S. & OF THE CANADIAN, I. D. G. Assisted reproductive technologies (ART) in Canada: 2001 results from the Canadian ART Register. **Fertility and sterility**, 84(3), 590-599. 2005.

GOMES, L. D. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C. & BALDISSEROTTO, B. Biology of *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, 30(1), 179-185. 2000.

GOMES, V. M. **Estudo da distribuição e do potencial de metilação do mercúrio em solos e sedimentos de áreas a serem inundadas para aproveitamento hidrelétrico**. Vinicius Marques Gomes. 2014.

GUEDES, D. S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. Santa Maria – RS, 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. 1980.

GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A.; PACE, M. M. Assessment for spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 1, p. 127-138. 1986.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; MILLER, M. G.; BERGER, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, 15:5-10, 2001.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R., BALDISSEROTO, B. Biologia do Jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae); **Ciência Rural**. 30:1, 179-185, 2010.

HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. & CAIRNS, J. **Handbook of ecotoxicology**. London, Lewis publisher. 1995.

HE, S & LC WOODS. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. **Cryobiology**, 48: 254-262. 2004.

HSDB - HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK. Mercury. In: TOMES CPS SYSTEM. **Toxicology, occupational medicine and environmental series**. Englewood: Micromedex, 2000, CD-ROM.

HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. & CAIRNS, J. **Handbook of ecotoxicology**. London, Lewis publisher. 1995.

HARRISON, R. A. P. & VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

HARRISON, R. A. P. & VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa; **J. Reprod. Fert.**, 88: 343-352, 1990.

IWA UNEP. **Industry as a partner for sustainable development: Water Management**, IWA/UNEP, London, UK. 2002.

JAMIESON, B. G. M. **Fish Evolution and Systematics: Evidence from spermatozoa**. Cambridge University Press. 317 p. 1991.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas de sêmen do Bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **B. Inst. Pesca** 13(1):95-100. 1986.

KIME, D. E. The effects of pollution on reproduction in fish. **Reviews in Fish in Biology and Fishers**, v. 5, p. 52-96. 1995.

LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T., PATZNER, R.A. (1995). Evaluation of semen fitness of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* for cryopreservation by physiological and biochemical parameters. In: JULY GOETZ, F.W. and THOMAS, P. (Eds.). **Proceedings** of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Texas At Austin – Austin, Texas.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture* v. 163, p. 163-181. 1998.

LACERDA, L. D. Global emissions of Hg from gold and silver mining. *Water, Air Soil Pollut*; 97: 209-221. 1997.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; BERGER, B. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 65, p. 1283-1297, 2004.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental**: micronutrientes e metais pesados: mitos, mistificação e fatos. São Paulo. Petroquímica 153p. 1994.

MALM, O.; GUIMARAES, J. R. D.; CASTRO, M. B.; BASTOS, W. R.; PFEIFFER, W. C.; VIANA, J. P.; SILVEIRA, E. G. Mercúrio na Amazônia: Evolução da contaminação ambiental e humana. **Ciência Hoje**. 22:16-23, 1997.

MAURO, J. B. N.; GUIMARÃES, J. R & MELAMED, R. Aguapé agrava contaminação por mercúrio. **Ciência hoje**, 25:68-72, 1999.

MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S., & JARDIM, W. D. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, 23(4), 487-495. 2000.

MAGGESE, M. C., CUKIER, M., CUSSAC, V. E. Morphological changes, fertilizing ability and motility of *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae) sperm induced by media of different salinities. **Rev. Brasl. Bio.**, v. 44, n. 4, p. 541-546. 1984.

MATTEI, X. SPERMIOGENÉSE COMPARE DÊS POISSON. In: BACCETTI, B. (Ed.). **Comparative spermatology**. New York: Academic Press, p. 57-72, 1970.

MATTEI, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Can. J. Zool.** v. 69, p. 3038-3055. 1991.

MORISAWA, M. & SUSUKI, K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science**, v. 210, p. 1145-1147. 1980.

MORISAWA, M.; SUZUKI, K.; SHIMIZU, H.; MORISAWA, S.; YASUDA, K. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. **J. Exp. Biol.** v. 107, p. 95-103, 1983.

MORISAWA, M. Cell signalling mechanism for sperm motility. **Zool. Sci.** v. 11, p. 647-662, 1994.

MOHAMED, M. K., BARBACHER, T. M.; & MOTTET, N. K. Effects of methyl mercury on testicular functions in macaca fascicularis monkeys. **Pharmacol Toxicol.** 60: 29-36. 1987.

- MATAVELI, M. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-nylo (*oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, 33(1): 1-7. 2007.
- MELANCON, M. J. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: Handbook of ecotoxicology (HOFFMAN, D.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J.). Ed. Boca raton. Lewis. 1995.
- MONTEIRO, A. D. **Efeitos do mercúrio sobre biomarcadores de estresse oxidativo em peixes**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2011.
- MELETTI, P.; ROCHA, O. & MARTINEZ, C. D. R. **Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçú por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes**. *Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçú*. São Carlos: Rima Editora, 149-180. 2003.
- MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T., & MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33(6), 1361-1365, 2004.
- MÁRSICOII, T. P. C. E. T.; MEDEIROSIII, R. J. & SOBREIROV, R. T. L. G. Concentração de mercúrio e análise histopatológica em músculo, rim e cérebro de peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) coletados na praia de Itaipu, Niterói. **Ciência Rural**, 39(2), 540-546, 2009.
- MIRANDA, M. R.; COELHO-SOUZA, S. A.; GUIMARÃES, J. R. D.; CORREIA, R. R. & OLIVEIRA, D. Mercúrio em sistemas aquáticos: fatores ambientais que afetam a metilação. **Oecologia Brasiliensis**, 11(2), 240-251. 2007.
- ODA, S.; MORISAWA, M. Rises of intracellular Ca²⁺ and pH mediate the initiation of sperm motility by hypoosmolality in marine teleosts. **Cell. Motil. Cytoskel.** v. 25, p. 171-178. 1993.
- OHTA, H. & IZAWA, T. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. **Aquaculture**. v. 142, p. 107-118. 1996.
- OHTA, H. & SHINRIKI, Y. Changes in osmotic pressure that trigger the initiation of sperm motility in the river sculpin *Cottus hangiongensis*. **Fish Physiol. And Biochem.** v. 18, p. 29-35. 1998.
- OHTA, H. & TSUJI, M. Ionic environment necessary for maintenance of potential motility in the common carp spermatozoa during in vitro storage. **Fisheries Science**. v. 64, p. 547-552. 1998.
- OHTA, H.; UNUMA, T.; TSUJI, M.; YOSHIOKA, M.; KASHIWAGI, E. Effects of bicarbonate ions and pH on acquisition and maintenance of potential for motility in ayu,

Plecoglossus altivelis Temminck et Schlegel (Osmeridae), spermatozoa. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 385-392, 2001.

PERCHEC, G.; JEULIN, C.; COSSON, J.; ANDRÉ, F.; BILLARD, R. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. **J. Cell Sci.** v.108, p. 747-753. 1995.

PALENZUELA, B.; MANGANIELLO, L.; RIOS, A.; VALCARCEL, M. Monitoring inorganic mercury and methylmercury species with liquid chromatography piezo electric detection. **Environmental research**, 511: 289-294. 2004.

PRÁ, D.; GUECHEVA, T.; FRANKE, S. I. R.; KNAKIEVICZ, T.; ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J. A. P. Toxicidade e Genotoxicidade do sulfato de cobre em planárias de água doce e camundongos. **Journal Brazilian Ecotoxicology**, 2: 171-176. 2006.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 9, n. 1-3, p. 297-308. 1997.

RURANGWA, E. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (casa), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*clarias gariepinus*), **Theriogenology**, 55:751-769. 2001.

RODRIGUES, A. P. D. C.; CARVALHEIRA, R. G.; CESAR, R. G.; BIDONE, E. D.; CASTILHOS, Z. C. & ALMOSNY, N. R. P. Bioacumulação de mercúrio em quatro espécies de peixes tropicais oriundos de ecossistemas estuarinos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Anuário do Instituto de Geociências**, 33(1), 54-62. 2010.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18:321-336.

SCHUSTER, P. F.; KRABBENHOFT, D. P.; NAFTZ, D. L.; CECIL, L. D.; OLSON, M. L.; DEWILD, J. F. Atmospheric mercury deposition during the last 270 years: a glacial ice core record of natural and anthropogenic sources. **Environ Sci Technol.** 36: 2303-10. 2002.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockholm, Sweden, 156p. 1996.

SALOMONS, W. E FORSTNER, U. **Metals in the hydrocycle**. Springer Verlag, Berlin, p. 297, 1984.

STREIT Jr., D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; SOUZA, E. D.; OLIVEIRA, C. A. L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**. UNIPAR, Umuarama, 7(2): 157-162, 2004.

SANTOS, G. M. D. & SANTOS, A. C. M. D. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. **Estudos avançados**, 19(54), 165-182, 2005.

SHIMODA, E.; DE ANDRADE, D. R.; JÚNIOR, M. V. V.; YASUI, G. S.; SILVA, J. F. S.; GODINHO, H. P. & SOUZA, G. Efeitos da osmolaridade sobre a motilidade espermática na Piabanha *Brycon insignis*. **Revista Ceres**, 54(315), 430-433, 2007.

TROIANO, L.; GRANATA, A. R. M.; COSSARIZZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: A flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Experimental Cell Research**, 241:384-393. 1998.

TENÓRIO, M.; BARRETO, C. M. & BLEY SOBRINHO, J. **Mercúrio: efeitos fetotóxicos**. Dens (Curitiba), 2(1), 1-4. 1987.

TSUJI, M.; IKEDA, K.; OHTA, H. **Changes in ionic environment inducing ayu spermatozoa motility**. Nippon Suisan Gakkaishi. v. 66, p. 55-61, 2000.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 13:57-149, 2003.

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

VALLEE, B. L.; ULMER, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. **Reviews in Biochemical Toxicology**, 41: 91-128. 1972.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Inorganic mercury. **Environment Health Criteria**, 171: Geneva, 1991, 140pp.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Inorganic mercury. **Environmental Health Criteria**, 118: Geneva, 1991.

WINDMÖLLER, C. C. Distribuição e especiação de mercúrio em sedimentos de áreas de garimpo de ouro do Quadrilátero Ferrífero (MG). **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1088-1094. 2007.

WITECK, L. Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos de jundiá em água contaminada por cádmio. **R. Bras. Zootec.**, v. 40, n. 3, p. 477-481. 2011.

YAO, Z.; RICHARDSON, G.; CRIM, L. A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. **Aquaculture**, 174:183-193. 1999.

ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

ZIELHUIS, R. L. Theoretical and practical consideration in biological monitoring. In: AITIO, A.; RIIHIMAKI, V.; VANIO, H. (Eds.). **Biological Monitoring and Surveillance of Workers Exposed to Chemicals**. New York: Hemisphere Publishing, p. 7-18. 1984.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. Ed Rima, São Carlos-SP. (2006).