



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NADJHA TANASSOVIA SALVESTRIN

**EFEITOS DO ZINCO NO TELEÓSTEO DE ÁGUA DOCE
Prochilodus lineatus E NA LINHAGEM CELULAR DE
HEPATÓCITOS DE *Danio rerio* (ZF-L)**

NADJHA TANASSOVIA SALVESTRIN

**EFEITOS DO ZINCO NO TELEÓSTEO DE ÁGUA DOCE
Prochilodus lineatus E NA LINHAGEM CELULAR DE
HEPATÓCITOS DE *Danio rerio* (ZF-L)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Bueno dos Reis
Martinez

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S183e Salvestrin, Nadjha Tanassovia.
Efeitos do zinco no teleósteo de água doce *Prochilodus lineatus* e na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZF-L) / Nadjha Tanassovia Salvestrin. – Londrina, 2015.
89 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2015.
Inclui bibliografia.

1. *Prochilodus lineatus* – Teses. 2. Peixe – Efeito dos metais – Teses. 3. Zinco – Bioacumulação – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. 5. Estresse oxidativo – Teses. 6. Toxicologia genética – Teses. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 597.554.1



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Discente: Nadjha Tanassovia Salvestrin

Título: "Avaliação dos efeitos do zinco no teleósteo de água doce
Prochilodus lineatus e na linhagem celular de hepatócitos de
Danio rerio (ZF-L) por meio de diferentes biomarcadores"

Data da Defesa: 09 de abril de 2015 – 14:00 hs, na sala de aula da Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas, desta Universidade.

Banca Examinadora

Parecer

Presidente:

Dr^a. Claudia Bueno dos Reis Martinez

Aprovada

Titulares:

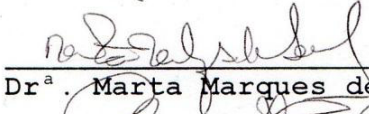
Dr^a. Marta Marques de Souza

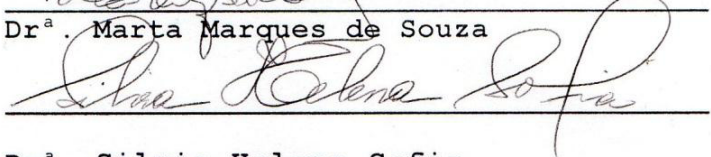
Dr^a. Silvia Helena Sofia

Aprovada
Cefrovada

Parecer Final APROVADA


Dr^a. Claudia Bueno dos Reis Martinez


Dr^a. Marta Marques de Souza


Dr^a. Silvia Helena Sofia

Este trabalho é dedicado à minha família,
pelo amor e apoio sempre, pelas lições,
pelo incentivo e amizade.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aqui a todos os que participaram, direta ou indiretamente, da conclusão deste trabalho. Meu muito obrigada:

À Universidade Estadual de Londrina, por ocupar um grande período da minha vida com muitas experiências e alegrias;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e à Estação de Piscicultura da UEL e seus funcionários pelo fornecimento os peixes;

Ao CNPq, Capes, Fundação Araucária e ao Instituto de Ciência e Tecnologia – Toxicologia Aquática (INCT-TA) pelo apoio financeiro e bolsas concedidas;

À Prof^a Dr^a Cláudia Bueno dos Reis Martinez, pela orientação, desde a iniciação científica, pelo apoio ao meu trabalho, pelos puxões de orelha, pelos momentos de amizade e pelos ensinamentos;

À Prof^a Dr^a Marta Marques de Souza pelo aceite de participação nesta banca de defesa;

À Prof^a Dr^a Silvia Helena Sofia pelo aceite de participação nesta banca de defesa e de qualificação;

A todas as pessoas do LEFA, vocês são demais! Fazem com que nosso ambiente de trabalho seja um ambiente agradável e onde se deseja estar. Obrigada pelos ensinamentos, pelas ajudas em amostragens e ensaios no laboratório, pelas festinhas e reuniões e pela amizade de cada um de vocês. Obrigada Bru, Carlos, Déia, Cássia, Thaís, Millena, Laura, Thiego, Matheus, Xê, Na, por me ensinar todos os procedimentos com as ZF-L, Lu, pela ajuda sempre e Dé por toda a ajuda com os ensaios com as ZF-L e pela amizade;

Um obrigada especial à minha amiga Carol, que desde o primeiro dia de aula, lá em 2008 se tornou uma das melhores coisas que já me aconteceram, com sua amizade sincera, ajuda sempre, por estar presente em momentos felizes e tristes, enfim, por ser meu casal de vida acadêmica, que me aturou durante esses 7 anos de vida londrinense e que vai fazer muita falta em São Paulo;

À minha família de Londrina, Patty e Amanda que fazem com que aquele momento em que a gente chega em casa para relaxar seja especial, e a Dri que já é de casa. Obrigada pelas conversas, risadas, churrascos e tererés;

Aos meus amigos da época da graduação: Guta, Denise, Carol Loira, Vanessa, Andressa, Carol Cola, Allan e toda a turma 56;

Aos meus amigos de escola Síl e Jow, por estarem presentes até hoje na minha vida;

Ao meu namorado Raphael por esses 5 anos de companheirismo, aguentando as reclamações, desesperos, estresse e alegrias que o mestrado me proporcionou, sendo sempre paciente, amigo, sempre tentando ver o lado bom das coisas e acima de tudo, sempre acreditando em mim. Obrigada pelo ouvido amigo, abraço apertado quando precisei e por acreditar que eu conseguiria. Te amo!

Aos meus irmãos Tamaris e Tata, por me aturarem e me amarem, pois mesmo que a gente passe dias sem se falar nossas relações nunca mudam. Tamaris, por ser minha amiga, irmã, confidente, palhaça, minha gêmea, afinal somos iguais (nossa rizada não nega). Tata que agora além de irmão e amigo agora é meu afilhado, e me deu de presente uma irmã mais velha, obrigada a você também Vanessa. Amo vocês!

À minha mãe, que apesar de todas as dificuldades, e às vezes até contra a vontade dela, fez tudo o que podia para que eu pudesse estar aqui, completando mais uma etapa de aprendizado. Obrigada pelo amor incondicional, pelas brigas, pelos abraços, pelas preocupações e por toda a confiança depositada em mim. Te amo mãe!

Ao meu pai, que tenho certeza, acompanhou todo o processo de onde quer que ele esteja, obrigada pelo amor, amizade, paciência, por ser a pessoa que mais acreditou em mim durante toda a minha vida, por sempre apoiar meus estudos, mesmo que isso implicasse em abrir mão de algumas coisas, por ser um exemplo de caráter, pai, amigo, marido e por ser meu super-herói.

E finalmente a Deus, pois sem ele nada seria possível. Obrigada por me proporcionar experiências incríveis e de me surpreender sempre.

**“If you can dream it, you can do it!”
Walt Disney**

SALVESTRIN, N.T. **Efeitos do zinco no teleósteo de água doce *Prochilodus lineatus* e na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZF-L).** 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O zinco (Zn) é um metal essencial, mas que em concentrações mais altas que as necessárias ao organismo pode se tornar tóxico. Assim, o objetivo desta dissertação foi verificar os efeitos deste metal, em concentrações dentro dos limites previstos pela legislação brasileira para corpos de água doce, por meio de testes *in vivo* com a espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus* e testes *in vitro* com a linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZF-L), utilizando-se diversos biomarcadores. Nos testes *in vivo* juvenis de *P. lineatus* foram expostos, durante 24 h, a duas concentrações de Zn, 0,2 mg L⁻¹ (Zn 0,2) e 2 mg L⁻¹ (Zn 2), ou apenas a água desclorada (CTR). Após a exposição foram analisados as concentrações de zinco em diversos tecidos, biomarcadores bioquímicos, como formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), capacidade antioxidante total (CAOT), concentração do antioxidante glutatona (GSH), ocorrência de danos oxidativos, lipoperoxidação lipídica (LPO), carbonilação de proteínas (PCO), concentração de proteínas semelhantes a metalotioneínas (PSMT) e atividade da acetilcolinesterase (AChE), biomarcadores genotóxicos, como ocorrência de danos no DNA, e biomarcadores fisiológicos, como concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Hct), contagem de eritrócitos (RBC), osmolalidade plasmática e glicemia. Os resultados mostraram que a concentração de Zn foi significativamente maior no sangue, músculo e fígado dos peixes do grupo Zn 2, quando comparados com o grupo CTR. Apesar de não terem sido observadas variações significativas nas medidas de ERO e CAOT, a concentração de GSH foi significativamente maior no fígado dos peixes do grupo Zn 2 e nas brânquias dos peixes do grupo Zn 0,2. Essa importante defesa contra ERO deve ter colaborado com a proteção desses órgãos contra a LPO, porém a PCO no fígado e a ocorrência de danos no DNA nos eritrócitos foi significativamente maior nos animais dos grupos Zn 0,2 e Zn 2. A concentração de PSMT foi significativamente maior no fígado e brânquias dos animais do grupo Zn 2. A atividade da AChE não sofreu alteração diante da exposição ao zinco, assim como Hb, RBC e glicose plasmática, porém houve aumento no Hct e osmolalidade dos animais do grupo Zn 0,2. Nos ensaios *in vitro* a linhagem ZF-L foi exposta às mesmas concentrações de zinco (Zn 0,2 e Zn 2) durante os períodos de 1, 3 e 6 h. Após o período de exposição foram realizados testes de citotoxicidade para avaliar a integridade de membrana através do ensaio de exclusão do azul de tripan (AT), a viabilidade lisossomal, pela incorporação do vermelho neutro (VN) e viabilidade mitocondrial pela redução do brometo de 3-4,5-dimetiliazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Também foram verificadas as ERO e CAOT e danos no DNA através do ensaio do cometa. Os resultados do ensaio AT mostraram menor viabilidade das células expostas ao Zn 2 após 6 h, maior atividade lisossomal das ZF-L expostas ao Zn 0,2 e Zn 2, após 3 e 6 h, maior CAOT após 1 h de exposição ao Zn 2 e maior escore de danos no DNA das células expostas ao Zn 2, em todos os tempos testados. Em conjunto, esses resultados indicam que as concentrações de Zn,

estabelecidas como limites para água doce (0,18 e 5 mg L⁻¹) pela legislação brasileira, não são seguras para a biota, visto que as concentrações testadas causaram danos oxidativos (PCO) e aumento na ocorrência de danos no DNA em *P. lineatus*. Os efeitos citotóxicos e genotóxicos do Zn, na concentração de 2 mg L⁻¹ também foram constatados nos testes *in vitro* com as células ZF-L.

Palavras-chave: Bioacumulação. Citotoxicidade. Estresse oxidativo. Genotoxicidade. Metalotioneínas. Biomarcadores

SALVESTRIN, N.T. **Effects of zinc on the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* and on the hepatocyte cell line of *Danio rerio* (ZFL)**. 2015. 89 p. Master Dissertation. (Master in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Zinc (Zn) is an essential metal, but in higher concentrations it becomes toxic. The aim of this work was to investigate the effects of this metal at concentrations within the limits set by Brazilian legislation for freshwater bodies by *in vivo* tests with the neotropical fish *Prochilodus lineatus* and *in vitro* tests with the cell line of *Danio rerio* hepatocytes (ZF-L), using several biomarkers. In order to perform the *in vivo* tests juveniles of *P. lineatus* were exposed, for 24 h, to two concentrations of Zn, 0.2 mg L⁻¹ (Zn 0.2) and 2 mg L⁻¹ (Zn 2), or only dechlorinated water (CTR). After exposure the following parameters were analyzed: zinc concentrations in several tissues; biochemical biomarkers, such as generation of reactive oxygen species (ROS), total antioxidant capacity (TAC), concentration of glutathione (GSH), lipid peroxidation (LPO), protein carbonyls (PCO), metallothionein-like proteins (MT-like) and the activity of acetylcholinesterase (AChE); genotoxic biomarkers based on the occurrence of DNA damage and physiological biomarkers, such as hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), erythrocyte count (RBC), plasma glucose and osmolality. The results showed that Zn concentrations were significantly higher in the blood, liver and muscle of fish from Zn 2 group. Although there were not observed any significant variations in ROS and TAC measurements, GSH concentration was significantly higher in the liver of fish from group Zn 2 and in the gills of fish from group Zn 0.2. This important defense against ROS might have collaborated with the protection of these organs against LPO, but the PCO in the liver and the occurrence of DNA damage in erythrocytes were significantly higher in animals from groups Zn 0.2 and Zn 2. The concentration of MT-like proteins was significantly higher in liver and gills of animals from Zn 2 group. The AChE activity did not change in fish exposed to zinc, as well as RBC, Hb and plasma glucose, but there was an increase in Hct and osmolality of animals from Zn 0.2 group. In the *in vitro* assays, ZF-L cell line was exposed to the same concentrations of zinc (Zn 0.2 and Zn 2) during 1, 3 and 6 h. After the exposure, cytotoxicity assays were performed to assess the membrane integrity using Trypan blue exclusion assay (TB), the lysosomal viability by neutral red incorporation (NR) and mitochondrial viability by MTT reduction. ROS, TAC and DNA damage by comet assay, were also measured, as in the *in vivo* experiment. The results of TB assay showed lower viability of cells exposed to Zn 2 after 6 h. On the other hand, lysosomal activity of ZFL cells exposed to Zn 0.2 and Zn 2 increased after 3 and 6 h and a higher TAC was observed after 1 h exposure to Zn 2 group. Higher scores of DNA damage in cells exposed to Zn 2 were observed at all experimental periods. Together, these results indicate that Zn concentration set by the Brazilian legislation as limits for freshwater (0.18 and 5 mg L⁻¹) are not safe for the biota, as the concentrations tested caused oxidative damage (PCO) and increased occurrence of DNA damage in *P. lineatus*. The cytotoxic and genotoxic effects of Zn at 2 mg L⁻¹ were also observed in *in vitro* tests with the ZF-L cells.

Keywords: Bioaccumulation. Cytotoxicity. Oxidative stress. Genotoxicity. Metallothioneins. *In vitro* tests.

SUMÁRIO

1.	Introdução Geral	1
1.1.	Contaminação aquática	1
1.2.	Metais	1
1.3.	Zinco	4
1.4.	Ecotoxicologia e Biomonitoramento	9
1.5.	Biomarcadores	12
1.5.1.	Biomarcadores de Citotoxicidade	12
1.5.2.	Biomarcadores Bioquímicos	13
1.5.3.	Biomarcadores genotóxicos	18
1.5.4.	Biomarcadores Fisiológicos	18
1.6.	Ensaio de Toxicidade	20
1.6.1.	<i>In vivo</i>	20
1.6.2.	<i>In vitro</i>	21
1.7.	Modelos Experimentais	22
1.8.	Referências	25
2.	Hipóteses	33
3.	Objetivos	33
3.1.	Objetivo Geral	33
3.2.	Objetivos específicos	33
4.	Manuscrito 1	34
	RESUMO	35
4.1.	Introdução	36
4.2.	Material e métodos	38
4.3.	Análises Estatísticas	45
4.4.	Resultados	46
4.5.	Discussão	54
4.6.	Referências	61

5. Manuscrito 2	67
RESUMO	68
5.1. Introdução	69
5.2. Material e Métodos	71
5.3. Análises Estatísticas	76
5.4. Resultados	76
5.5. Discussão	80
5.6. Referências Bibliográficas	85
6. Considerações Gerais	89

1. Introdução Geral

1.1. Contaminação aquática

Ecosistemas aquáticos têm sido cada vez mais prejudicados devido às atividades humanas, como agricultura, industrialização, produção, consumo e eliminação de diversos tipos de resíduos, além do próprio crescimento populacional e das cidades,. Mais de um terço da água doce disponível é utilizado nestas atividades, sendo estas, portanto, as grandes responsáveis pela descarga de diversos compostos sintéticos nos corpos d'água (FREIRE et al., 2008). Diversos são os compostos que reduzem a qualidade ambiental e que podem ser tóxicos à biota, podendo causar desequilíbrios biológico e ecológico das populações presentes no local (CAJARAVILLE et al., 2000; NAKAGOME et al., 2006).

Os compostos que contaminam o ecossistema aquático podem ter diversas origens, podendo atingir o sistema aquático através de processos naturais como chuvas, erosão, escoamento superficial e decomposição. Mas os contaminantes também podem ser liberados nos corpos d'água através de processos antropogênicos, como através da agricultura, por meio de agrotóxicos e fertilizantes, poluição urbana, através do lançamento de efluentes contaminados por esgotos domésticos e resíduos industriais e até mesmo através da contaminação acidental, como é o caso de derramamentos de óleo e gasolina (LINS et al., 2010).

1.2. Metais

Dentre os contaminantes mais encontrados nos corpos d'água estão os metais, que podem entrar nos ambientes aquáticos devido a processos naturais, como intemperismo, erosão e erupções vulcânicas (MARTINEZ e CÓLUS, 2002). Entretanto, os metais não podem ser degradados e uma vez extraídos dos minérios que os compõem eles permanecem no ambiente indefinidamente (WOOD, 2012). Cerca de 80% dos metais liberados por processos naturais são provenientes de material dissolvido da superfície da Terra ou liberados na atmosfera através de atividades vulcânicas (NRIAGU, 1990). Apesar de serem encontrados naturalmente no ambiente aquático, os metais podem ter suas concentrações aumentadas devido a atividades humanas, como utilização de fertilizantes e pesticidas, liberação de água de irrigação contaminada por queima

da biomassa de zona rural, combustão de carvão e óleo, incineração, emissões veiculares e, principalmente, mineração, fundição e refinamento (NIKINMAA, 2014; TAVARES e CARVALHO, 1992). Independente da origem dos metais eles acabam sendo transportados aos corpos hídricos (CAMPOS et al., 2005) e uma vez no ambiente aquático se encontram geralmente em sua forma iônica, dissolvidos na coluna d'água ou complexados a moléculas orgânicas, inorgânicas e particuladas, compondo o detrito e a biomassa local (ESTEVES, 1998; NIKINMAA, 2014; SHRIVASTAVA et al., 2003).

Alguns metais traço como cobre, cobalto, vanádio, manganês e zinco são considerados essenciais para os seres vivos, por serem necessários para a manutenção de funções vitais do organismo (CAMPOS et al., 2005), porém em níveis mais altos que os necessários podem se tornar tóxicos (CAMPOS et al., 2005; NIKINMAA, 2014) (Fig.1). Assim os organismos aquáticos dispõem de diversos mecanismos homeostáticos para regulação da concentração destes metais, como detoxificação, através de metalotioneínas e glutatona e transportadores para a condução de metais através do corpo (WOOD, 2012).

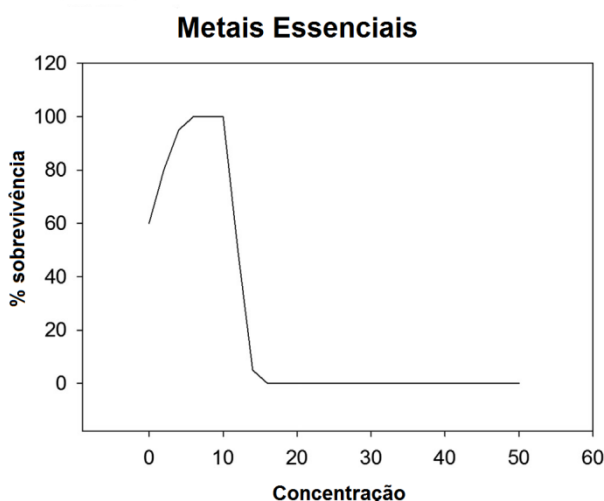


Figura 1 – A sobrevivência dos organismos aumenta com o aumento na disponibilidade do metal, até que um máximo é atingido e satisfaz a demanda do organismo. Em seguida o excesso de metal se torna tóxico podendo causar até a morte dos organismos. Este esquema se aplica, por exemplo, a metais como cobre, ferro e zinco. Adaptado de Nikinmaa (2014).

Devido ao fato dos metais não sofrerem biodegradação, eles permanecem no ecossistema e continuam disponíveis para a absorção pela biota local, podendo causar intoxicações aos organismos e bioacumulação (PEREIRA e

EBECKEN, 2009). O acúmulo de metais no organismo ocorre quando um composto químico é absorvido a partir da água, através das brânquias ou pele, e a taxa de absorção é maior do que a taxa de eliminação (BURATINI e BRANDELLI, 2006; SOARES et al., 2008). Uma vez no organismo, os metais são transportados até outros tecidos através do sangue (REYNDERS et al., 2006). Se os metais forem incorporados ao longo da cadeia trófica, por meio da transferência de um nível trófico para outro, via alimentação, ocorre o processo chamado de biomagnificação, que se caracteriza pelo aumento progressivo das concentrações do metal com o aumento do nível trófico analisado (VIARENGO, 1989; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Nos corpos d'água os metais podem sofrer uma série de reações químicas, podendo se apresentar de diversas formas no ambiente aquático. As espécies metálicas resultantes deste processo de especiação determinam sua disponibilidade (BIANCHINI et al., 2009). A especiação e solubilidade dos metais são definidas de acordo com as propriedades físicas e químicas do local, como pH, dureza, temperatura, oxigênio dissolvido e quantidade de matéria orgânica (GÓMEZ et al., 1998).

No ecossistema aquático os metais podem estar livres na coluna d'água ou ligados a compostos orgânicos ou inorgânicos presentes na água ou no sedimento, porém, uma vez que estejam em sua forma iônica, os metais podem ser absorvidos pelos organismos aquáticos, sendo capazes de causar diversos tipos de efeitos e atingir diferentes compartimentos celulares (DI GIULIO et al., 1995). A Figura 2 representa os processos de entrada e atuação dos metais em células eucarióticas.

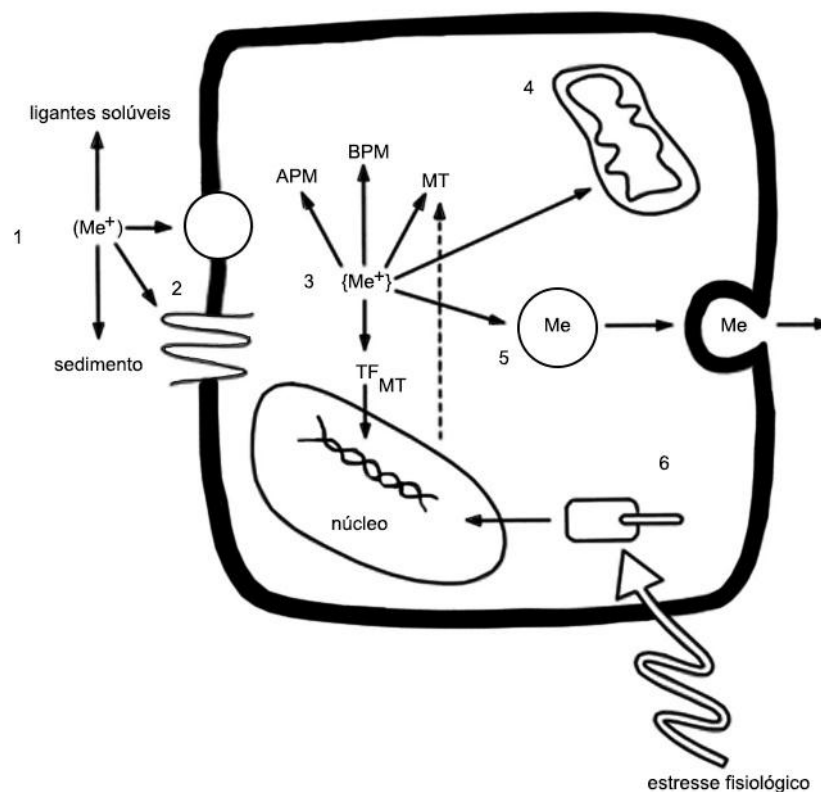


Figura 2 – Esquema dos processos de entrada e atuação dos metais nas células eucarióticas. A entrada do metal ocorre pela interação dos íons livres de metal (Me^+) com diversos ligantes e sua distribuição pode ser alterada pela mudança na concentração dos íons metálicos, bem como pela mudança de afinidade relativa de cada ligante. No ambiente aquático os íons podem interagir com ligantes abióticos no sedimento e na coluna d'água, reduzindo a concentração de íons metálicos livres na água (1). Metais normalmente entram nas células pela interação do íon com proteínas carreadoras ou canais de íons da membrana plasmática (2). Uma vez no citoplasma os íons interagem com ligantes, como proteínas de alto peso molecular (APM), de baixo peso molecular (BPM) e metalotioneínas (MT) (3). Os íons metálicos podem atingir outros compartimentos celulares, como as mitocôndrias, onde podem se ligar a enzimas da cadeia respiratória, reduzindo a eficiência de conversão de energia, causando danos oxidativos a estas células (4). Em alguns casos os metais também podem ser excretados diretamente pelos lisossomos e exportados por exocitose (5). Finalmente, o estresse fisiológico causado pela presença dos metais pode elevar hormônios esteroides, como os glicocorticoides, que se ligam aos seus receptores e aumentam a transcrição dos genes das MT e sua síntese (6). Modificado de Di Giulio et al. (1995).

1.3. Zinco

Dentre os metais traço mais comumente encontrados nos corpos d'água pode-se citar o zinco (Zn). Este metal está presente em todo o planeta, sendo o segundo metal traço mais abundante, ficando atrás apenas do ferro, e é

essencial a todas as formas de vida (SANDSTEAD e AU, 2007; VALLEE, 1986). Por ano são liberadas em média 45.000 toneladas métricas de Zn no ambiente através de processos naturais (NRIAGU, 1990).

O Zn passou a ser utilizado no processo industrial primeiramente na Europa no fim do século 18 e seu uso teve como consequência o aumento em seus níveis no ambiente (IZA, 1997). Porém, a partir dos anos de 1970 a preocupação com a qualidade do ambiente cresceu, levando a uma redução progressiva das emissões de zinco no ar e na água, e as indústrias atingiram a maior redução de emissão em décadas (IZA, 1997). No Brasil, nos últimos anos o consumo de zinco ficou em torno de 260.000 toneladas por ano, sendo de 261.248 t em 2012 e de 169.738 até o mês de Agosto de 2013 (ICZ, 2012; ICZ, 2013).

Na indústria o zinco é utilizado como revestimento protetor contra corrosão para outros metais e na produção de corante, na construção civil é utilizado em ligas metálicas não corrosivas e produção do bronze. Compostos inorgânicos do Zn são utilizados em equipamentos automotivos, baterias, na odontologia e tem aplicações médicas e uso doméstico. Os compostos orgânicos do Zn são usados em fungicidas, antibióticos e lubrificantes (SIMON-HETTICH et al., 2001). As concentrações totais de Zn em água doce podem variar desde 0,02 mg L⁻¹ em rios isolados até mais de 1000 mg L⁻¹ em áreas próximas a mineração, galvanoplastia e atividades industriais, sendo encontrado em média na concentração de 0,05 mg L⁻¹ (LUOMA e RAINBOW, 2008). De acordo com Farag e colaboradores (2003), a concentração de zinco dissolvido em corpos de água próximos a minas pode ser de até 5,7 mg L⁻¹, e nestas condições não se encontra população de peixes vivendo no local.

Normalmente, a maior parte do Zn presente na água encontra-se dissolvido em sua forma iônica Zn²⁺, a qual também é a forma mais perigosa para a biota, pois é a forma passível de ser absorvida (HOGSTRAND, 2012). O Zn pode ser absorvido tanto pelas brânquias como pelo intestino dos teleósteos, sendo esta última via de absorção maior em peixes marinhos, devido ao fato destes beberem água para manutenção de seu equilíbrio osmótico. Em teleósteos dulcícolas cerca de 50% do total de Zn absorvido ocorre através das brânquias (HOGSTRAND, 2012). As brânquias também são responsáveis pela maior parte da excreção de Zn, chegando a 1/3 do total excretado, sendo que apenas 1% do total é excretado através da urina (HARDY et al., 1987).

Nos animais, inclusive em peixes, existem duas famílias de proteínas responsáveis pelo transporte de Zn, são elas a Slc30 (Znt), responsável normalmente pelo transporte do Zn através dos compartimentos celulares e para fora da célula e a Slc39 (Zip), responsável principalmente pelo transporte através da membrana plasmática e com ação específica em cada tecido como demonstrado na Figura 3 (HOGSTRAND, 2012). Diante de uma exposição ao Zn os transportadores presentes na região apical das células, responsáveis pela tomada de Zn, são inibidos e os transportadores presentes na membrana basolateral, como o Znt 1, são estimulados, para que sejam capazes de eliminar o metal excedente no citosol (HOGSTRAND, 2012).

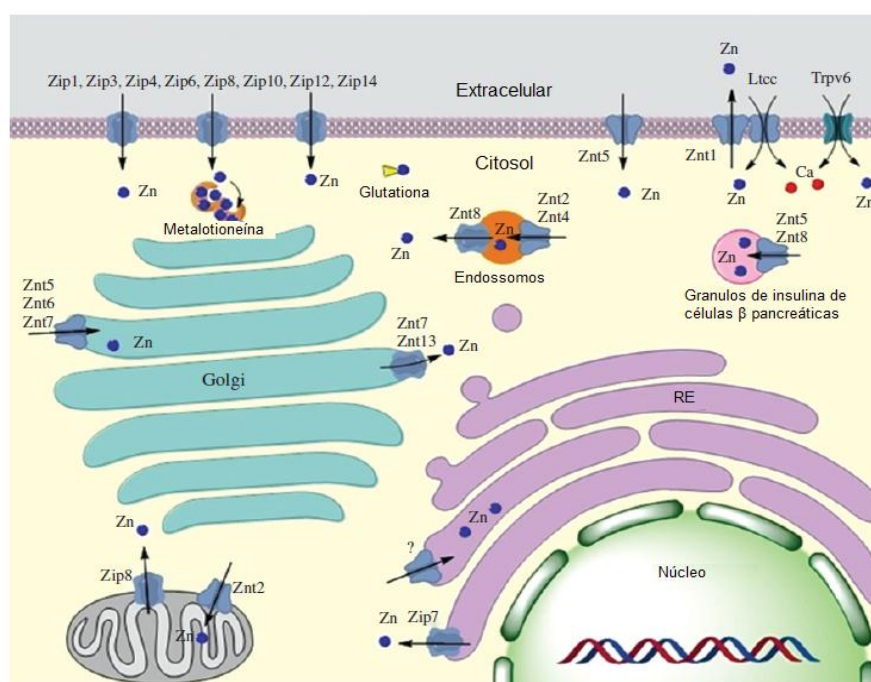


Figura 3 – Transportadores celulares de Zn. O Zn pode entrar nas células por meio de diversos transportadores como os da família Zip e o Znt 5 e também por canais de cálcio (Ltc e Trpv 6). Uma vez no citosol ele pode se ligar a moléculas, como metalotioneínas e glutatona, que os transportam para compartimentos de armazenamento como o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, endossomos e mitocôndria. Adaptado de Hogstrand (2012).

Outra via de entrada do Zn (Zn^{2+}) em peixes é através de sua competição com o cálcio (Ca^{2+}) pelo canal epitelial de cálcio (Ecac/Trpv6), que se localiza na região apical das membranas de células branquiais, porém acredita-se que esta entrada ocorra somente quando há excesso de Zn na água (HOGSTRAND et al., 1996; HOGSTRAND, 2012). Devido a esta competição pelo

mesmo canal de entrada do Ca^{2+} , um dos efeitos subletais mais importantes do Zn em peixes é a inibição da absorção de cálcio, podendo levar o peixe a hipocalcemia, prejudicar a integridade da membrana celular e a estabilização da permeabilidade branquial, podendo levar os animais à morte (HERSKOVITZ e HELGUERO, 1998).

Um dos principais papéis do Zn em peixes é sua atuação na indução da produção de metalotioneínas (MTs), que ocorre através da ligação dos íons metálicos ao fator de transcrição 1 das MTs (MTF-1). Esta proteína possui 6 domínios de ligação ao Zn, dos quais possuem menor afinidade do que os demais, assim, frente a um aumento de Zn^{2+} citosólico estes domínios se ligam ao metal permitindo que o MTF-1, por sua vez, se ligue ao elemento de resposta a metais (MRE) na região do gene promotora da síntese de MTs e esta ligação aumenta sua transcrição (KIMURA et al., 2009; NIKINMAA, 2014). A indução do gene responsável pela produção de MTs também pode ocorrer pela ligação de agentes oxidantes como H_2O_2 a elementos de resposta antioxidante (ARE) (NIKINMAA, 2014), como esquematizado na Figura 4.

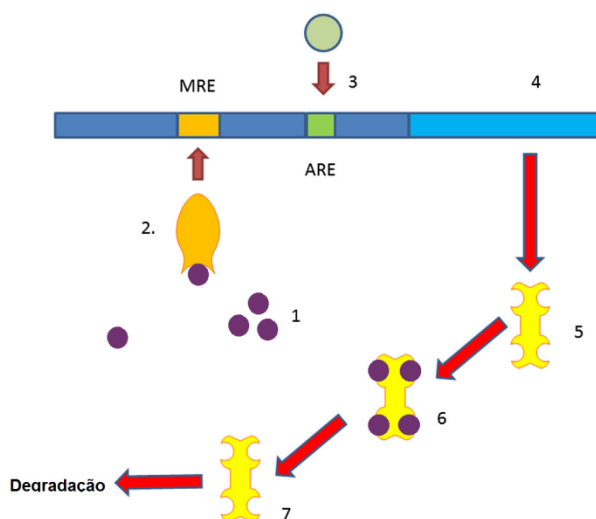


Figura 4 – Esquema de indução da metalotioneína pela exposição ao zinco e seu ciclo. (1) Os íons de Zn (Zn^{2+}) (círculos roxos) se ligam (2) ao fator de transcrição 1 (MTF-1), que se liga ao elemento de resposta a metais (MRE) na região promotora de do gene de MT. (3) Um agente oxidante (círculo verde) se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) e este também induz a produção de metalotioneínas. (4) O gene de MTs é transcrito e (5) é formada a apometalotioneína. (6) Quando existe Zn^{2+} na célula estes formam complexos com as MTs (7) que posteriormente perdem estes íons ligados para sua degradação. Adaptado de Nikinmaa, (2014).

A ativação do MTF-1 já foi comprovada como importante defesa contra o estresse causado por radicais livres, tanto em peixes como em humanos, devido à capacidade das MTs reduzirem estes radicais, enquanto seus grupamentos tióis são oxidados e o Zn é liberado dos domínios de ligação (HOGSTRAND, 2012). Diversos genes podem ser ativados pelo MTF-1, dentre eles genes de agentes antioxidantes como da glutaciona peroxidase (GPX), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), glutaciona-S-transferase (GST) e as próprias MTs (Fig. 5) (CHUNG et al., 2005; CHUNG et al., 2006).

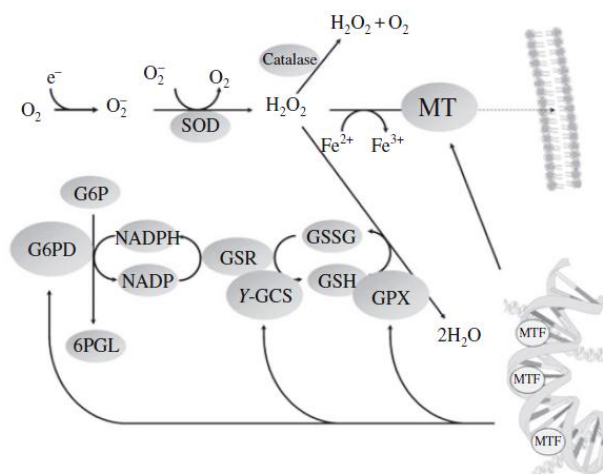


Figura 5 – O fator de transcrição MTF-1 ativado pelo Zn, aqui representado por MTF, ligado aos MREs induz a expressão de genes responsáveis pela codificação de proteínas constituintes do sistema de defesa antioxidante do organismo através de processos diretos ou indiretos, onde: SOD: superóxido dismutase; MT: metalotioneína; G6P: glicose-6-fosfato; G6PD: glicose-6-fosfato desidrogenase; NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADPH: forma reduzida do NADP; GSH: glutaciona; GSSG: forma oxidada da glutaciona; GSR: glutaciona redutase; γ -GCS: γ -glutamilcisteína sintetase; GPX: glutaciona peroxidase. Esquema retirado de Hogstrand (2012).

Uma vez no citosol das células o Zn se liga primeiramente à glutaciona e quando esta se encontra sobrecarregada o MTF-1 é ativado e por sua vez estimula a síntese do transportador Znt1, localizado na membrana basolateral e responsável pela excreção do Zn, e de metalotioneínas, aumentando assim a capacidade celular de extrusão e sequestro de íons livres (HOGSTRAND, 2012).

O Zn também pode atuar como um importante antioxidante celular através da sua capacidade inibitória sobre as enzimas NADPH oxidases, localizadas na membrana plasmática das células e que, a partir do oxigênio, catalisam a produção de $O_2^{\cdot-}$, utilizando o NADPH como doador de elétrons

(PRASAD, 2008). Outro papel do zinco como antioxidante se dá pela sua presença na enzima superóxido dismutase (SOD), que depende da presença deste metal para catalisar a reação do $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 (PRASAD, 2008).

O Zn é um elemento necessário nos peixes como grupo ativo de diversas enzimas, porém em altas concentrações ele pode causar danos nas brânquias destes organismos como, por exemplo, o espessamento do epitélio lamelar, prejudicando assim sua tomada de oxigênio (NIKINMAA, 2014).

Para a maioria dos peixes de água doce, como a carpa capim, *Ctenopharyngodon idella*, carpa prata, *Hypophthalmichthys molitrix* e a tilápia, *Tilapia mossambica*, a concentração de zinco em vários tecidos é de aproximadamente $10-50 \text{ mg.kg}^{-1}$, com exceção da carpa comum, *Cyprinus carpio* que possui uma concentração naturalmente maior (JENG e LO, 1974).

1.4. Ecotoxicologia e Biomonitoramento

Devido ao aumento na quantidade e variedade de poluentes presentes no ambiente aquático faz-se necessário o estudo de seus efeitos no local e sobre sua biota e neste âmbito se encontra a ecotoxicologia, a qual, de acordo com Newman e Unger (2003) é a ciência dos contaminantes na biosfera e seus efeitos em seus constituintes. A ecotoxicologia é uma ciência abrangente, que aborda o estudo dos efeitos dos poluentes tanto em pequenas escalas, como a molecular, mas também em escala biosférica (NEWMAN e CLEMENTS, 2008).

Efeitos deletérios de contaminantes sobre os organismos são classificados em letais e subletais. Estes últimos se referem às alterações não visíveis, como as de nível celular, que incluem indução e inibição de enzimas e os sistemas aos quais estão associadas, e também as visíveis, que ocorrem no comportamento, crescimento, reprodução e estrutura tecidual e geralmente se manifestam após um longo período de exposição e, quando ocorrem, o processo destrutivo na população pode ter ido além do ponto onde ações corretivas, de remediação ou redução de riscos seriam eficazes (RAND et al., 1995). Assim, a sequência de respostas dentro de um sistema biológico frente a exposição a um poluente segue uma escala, da menor para a maior, como demonstrado na Figura 6.

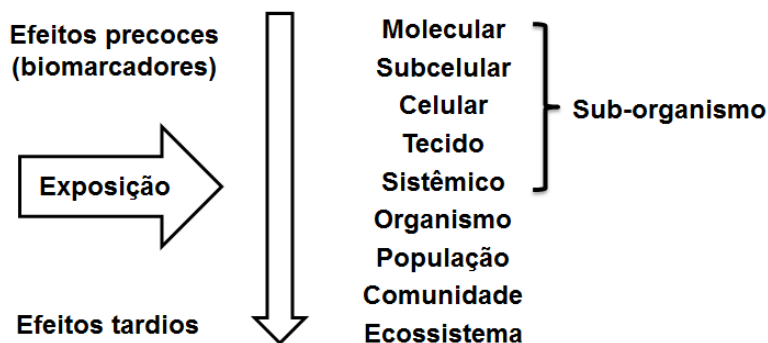


Figura 6 – Esquema representando os níveis de alterações possíveis decorrentes da exposição a poluentes. Modificado de Bayne et al. (1985).

Desta forma, quando os efeitos dos contaminantes são notados em níveis mais baixos de organização (nível de sub-organismo), podem-se desenvolver estratégias de remediação antes da ocorrência de danos ambientais irreversíveis (CAJARAVILLE et al., 2000).

Historicamente, o monitoramento aquático se baseia na medida de parâmetros físicos e químicos da água, porém, com o tempo foi crescendo a preocupação e necessidade de detecção dos impactos que os contaminantes causam na biota local (ARIAS et al., 2007; CAJARAVILLE et al., 2000; LAM, 2009). Assim, para a avaliação da qualidade da água e possíveis efeitos prejudiciais dos contaminantes à biota é necessário que seja feito o biomonitoramento, que tem como pressuposto o uso de respostas de organismos vivos para avaliação das mudanças que ocorrem no ambiente, sendo, portanto, uma ferramenta importante da avaliação da qualidade ambiental (BUSS et al., 2003).

Desta forma, destaca-se a importância do uso de animais como ferramentas para o biomonitoramento e a detecção de efeitos subletais nos organismos, antes que efeitos letais ocorram (ZHOU et al., 2008). Programas de biomonitoramento são normalmente utilizados na detecção e controle de um problema ambiental (SOUZA e FONTANETTI, 2007), sendo um modo de medida da qualidade ambiental dentro de tempo e espaço previamente definidos, podendo se estudar desde efeitos em um indivíduo como em uma comunidade inteira, onde o período de observação pode variar de dias a anos (LIMA, 2000).

Dentre as ferramentas utilizadas no biomonitoramento estão os biomarcadores, que são alterações em nível molecular, bioquímico, celular ou fisiológico, que podem ser mensuradas em nível sub individual, como em fluidos, tecidos e órgãos, podendo indicar a exposição e os efeitos da exposição a um xenobiótico (LAM, 2009). Assim, o biomonitoramento deve integrar análises

químicas, biológicas e toxicológicas, permitindo a compreensão dos efeitos toxicológicos dos contaminantes no ecossistema analisado (FENT, 2004).

No Brasil a Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) define os limites permissíveis de compostos orgânicos e inorgânicos para as diferentes classes de água. Porém, muitos destes limites para metais estão baseados em valores determinados por agências internacionais como a norte-americana (*United States Environmental Protection Agency – USEPA*) e a europeia (*European Environmental Agency – EEA*), não levando, portanto, em conta características do clima e das espécies nativas brasileiras (MARTINS e BIANCHINI, 2011).

De acordo com a resolução 357 do CONAMA (CONAMA, 2005), a água doce pode ser classificada em cinco classes, dependendo dos compostos nela presentes e de sua destinação: classe especial e classes 1, 2, 3 e 4. As águas de classe especial são destinadas ao consumo humano, depois de apenas uma etapa de desinfecção, à preservação do equilíbrio das comunidades aquáticas e preservação do ambiente aquático em unidades de conservação de proteção integral. As águas de classe 1 podem ser destinadas ao abastecimento humano, porém após tratamento simplificado, à proteção das comunidades aquáticas, a recreação de contato primário, como natação e mergulho, à irrigação de hortaliças para consumo cru e frutas com desenvolvimento no solo, que sejam consumidas cruas e à proteção das comunidades aquáticas em terras indígenas. As águas de classe 2 podem ser destinadas ao abastecimento humano, após tratamento convencional, à proteção de comunidades aquáticas, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças, frutas e de parques, jardins e campos de esporte e lazer, onde o público possa ter contato direto, e aquicultura e atividade de pesca. Já águas de classe 3 só podem ser destinadas ao abastecimento humano após tratamento convencional ou avançado, pode ser utilizada na irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras, para pesca amadora, recreação de contato secundário e dessedentação de animais. Por fim, as águas de classe 4 podem ser destinadas apenas à navegação e à harmonia paisagística. Esta resolução determina padrões de qualidade das águas com limites individuais para cada substância, em cada classe de água, e estas substâncias isoladas ou em interação não podem causar efeitos letais ou alterações de comportamento, na reprodução e na fisiologia, bem como restringir os usos previstos para cada classe.

1.5. Biomarcadores

Biomarcadores são alterações, em nível sub-individual, relacionadas com a exposição de um organismo a um composto no ambiente e medidas no próprio organismo ou em seus produtos (urina, fezes, penas e pelos), que indique um desvio do estado normal e que não pode ser detectada no organismo intacto (VAN DER OOST et al., 2003; VAN GESTEL e VAN BRUMMELEN, 1996). Assim, podemos utilizar os biomarcadores como um sinal prévio de alterações que podem ocorrer devido à presença de uma substância específica, possibilitando avaliar seu risco potencial para as populações, comunidades ou ecossistema (VAN DER OOST et al., 2003). Portanto, os biomarcadores são importantes ferramentas no monitoramento da contaminação do ambiente, indicando os efeitos subletais antes da ocorrência de danos irreversíveis (NIKINMAA, 2014). A utilização de apenas um biomarcador não é adequada, pois pode não representar os efeitos reais de um contaminante sobre os organismos, sendo necessária a avaliação de diversos biomarcadores para que se possa escolher os que melhor identificam os efeitos causados sobre a biota (CAJARAVILLE et al., 2000; NIKINMAA, 2014). Desta forma, devem ser escolhidos biomarcadores sensíveis à detecção da exposição do organismo ao poluente (biomarcadores de exposição), os efeitos e a resposta deste organismo a este poluente (biomarcadores de efeito) (CAJARAVILLE et al., 2000; NIKINMAA, 2014).

Para que um biomarcador seja considerado eficiente ele deve apresentar as seguintes características: ser facilmente medido, ter aplicação rápida e de custo relativamente baixo, ser sensível a um tipo específico de contaminante e suas respostas devem ser dose-dependente (NIKINMAA, 2014).

A seguir serão elencados e brevemente explicados os biomarcadores mais frequentemente empregados em estudos relacionados à contaminação em ambientes aquáticos, utilizando tantos os testes *in vitro* quanto *in vivo*.

1.5.1. Biomarcadores de Citotoxicidade

Biomarcadores celulares podem fornecer informações sobre os mecanismos específicos da ação de contaminantes, além da citotoxicidade (BOLS et al., 2005). Porém, a necessidade de testes de citotoxicidade confiáveis levou ao desenvolvimento de diversos ensaios passíveis de realização rotineira, para a verificação de efeitos citotóxicos *in vitro* (BOPP e LETTIERI, 2008). A citotoxicidade de um composto é considerada como a capacidade deste em induzir

morte celular através principalmente de necrose e apoptose (EISENBRAND et al., 2002). A morte celular pode ser causada por danos que os compostos são capazes de causar em funções básicas da célula, sendo assim os testes de citotoxicidade são de extrema importância para identificação destes danos (EISENBRAND et al., 2002).

A viabilidade celular pode ser determinada através de métodos colorimétricos e fluorimétricos, pela capacidade das células de incorporação ou metabolização de corantes como vermelho neutro, sais de tetrazólio e exclusão do azul de tripan, por exemplo (BOLS et al., 2005).

O método de exclusão pelo azul de Tripan é um método clássico, utilizado para determinar o número de células viáveis presentes em uma suspensão de células a partir do princípio de que células viáveis excluem o corante e as inviáveis se tornam azuis (STROBER, 2001). Porém, neste método alguns tipos de danos na viabilidade celular não são detectados, como o comprometimento na capacidade de crescimento ou de alguma função específica, enquanto a membrana plasmática ainda pode estar, pelo menos temporariamente mantida, mas ainda assim é um método muito indicado devido à sua facilidade e rapidez de realização (STROBER, 2001).

Por outro lado, um método mais sensível é o método de incorporação do vermelho neutro (2-metil-3-amino-7 dimetilamino fenazina), um corante fracamente catiônico que se acumula nos lisossomos de células viáveis. Ele é absorvido por difusão através da membrana plasmática (LULLMAN-RAUCH, 1979). Assim, a intensidade da coloração de vermelho neutro está diretamente relacionada ao número de células viáveis (REPETTO et al., 2008).

Outro método muito utilizado nos ensaios citotóxicos é o ensaio de redução do MTT. Trata-se de um ensaio colorimétrico onde o sal amarelo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é reduzido por células viáveis, através da ação da enzima succinato desidrogenase, presente nas mitocôndrias, em cristais de formazan, que são solubilizados no solvente dimetil sulfóxido (DMSO) (BOLS et al., 2005; MOSMANN, 1983).

1.5.2. Biomarcadores Bioquímicos

Normalmente efeitos bioquímicos são os primeiros a surgirem em decorrência da exposição de um organismo a agentes tóxicos (ADAMS et al., 1990). Estes biomarcadores são mais sensíveis a determinados poluentes,

altamente específicos, relativamente baratos, pouco variáveis e fornecem as informações necessárias sobre os efeitos de um xenobiótico sobre o organismo (STEGEMAN et al., 1992). A utilização de biomarcadores bioquímicos para a avaliação da contaminação aquática tem sido incorporada a programas de monitoramento da Europa e Estados Unidos e avaliados por grupos internacionais como ICES (Conselho Internacional para Exploração do Mar) e IOC (Comissão Oceanográfica Intergovernamental) (CAJARAVILLE et al., 2000).

Dependendo do composto estudado, este pode passar pelo processo de biotransformação. Neste processo, um composto, geralmente lipofílico, passa por um conjunto de alterações químicas estruturais, mediadas por processos enzimáticos, para sua transformação em metabólitos de composição mais hidrofílica, facilitando sua eliminação e constituindo assim a detoxificação (VAN DER OOST et al., 2003). Porém, no processo de biotransformação o composto formado (metabólito) pode ser mais perigoso para as células do que o composto original, caracterizando assim a bioativação (NEWMAN e CLEMENTS, 2008; RAND, 1995; VAN DER OOST et al., 2003).

Entretanto, alguns compostos, como os metais, não podem ser biotransformados e são excretados diretamente pelo organismo, podendo também causar danos ao organismo, como por exemplo através da instauração do estresse oxidativo (WINSTON e DI GIULIO, 1991).

1.5.2.1. Espécies reativas de oxigênio e Defesas antioxidantes

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são substâncias químicas extremamente reativas, que podem, dentro da célula, causar danos se ligando ao DNA, lipídeos e proteínas (MACKENZIE, 2008).

Diversos poluentes, devido ao seu efeito tóxico, podem gerar ERO, e muitas vezes o sistema de defesa antioxidante do organismo pode não ser suficiente para combatê-las, ocorrendo assim um desequilíbrio do balanço redox, instituindo na célula um desequilíbrio pró-oxidante, chamado de estresse oxidativo (LIVINGSTONE, 2003; LUSHCHAK, 2011; MASELLA et al., 2005; MONSERRAT et al., 2007). A estimulação para a produção de ERO pode ocorrer de diversas formas, tais como: indução dos mecanismos de biotransformação, comprometimento da cadeia transportadora de elétrons por íons metálicos, reações redox de metais de transição com O₂ e outras ERO, bem como pelo comprometimento das defesas antioxidantes (LIVINGSTONE, 2003). Esse

desequilíbrio pró-oxidante pode causar diversos tipos de danos ao organismo, de celulares a teciduais, como a degradação de proteínas e danos no DNA, podendo causar até mesmo a morte celular (AMADO et al., 2009; MANDUZIO et al., 2005).

As ERO compõem a classe mais importante de espécies de radicais geradas pelo próprio organismo, sendo o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) o mais reativo dentre eles, sendo produzido quando há excesso do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Através da reação de Fenton (Fig. 7) o H_2O_2 é quebrado e reage com Fe^{2+} e Cu^+ gerando grande parte do $\bullet\text{OH}$, que também pode ser formado a partir da reação de Haber Weiss (Figura 7) na presença do $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005; HERMES-LIMA, 2004).

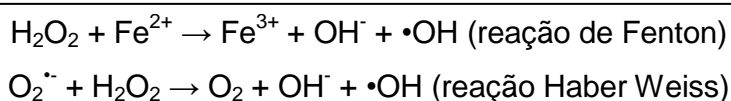


Figura 7 – Reações de Fenton e Haber Weiss

O radical superóxido, muito menos reativo quando comparado com o hidroxil, pode ser formado em diversos locais da célula, como nos peroxissomos, através da oxidação de adrenalina, noradrenalina e dopamina, porém o mais importante deles é pela cadeia transportadora de elétrons presente nas mitocôndrias. O peróxido de hidrogênio é formado naturalmente nos peroxissomos e nas mitocôndrias, não sendo considerado um radical devido ao fato de não apresentar elétrons desemparelhados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005).

Para que as ERO não causem danos celulares os organismos contam com mecanismos de defesa antioxidante, que podem ser enzimáticos ou não. Este sistema tem como principais enzimas a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), e como defesa não enzimática possuem moléculas hidrossolúveis e de baixo peso molecular, como a glutathione (GSH) e ácido ascórbico (vitamina C), e também as lipossolúveis como o β -caroteno (vitamina B) e o α -tocoferol (vitamina E) (MARTINEZ, 2006).

1.5.2.2. Danos oxidativos

Uma vez formado, o radical $\bullet\text{OH}$ quebra os fosfolípidios de membrana e reage com ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), ácidos nucleicos e proteínas, causando diversos tipos de danos celulares. Quando uma ERO retira um hidrogênio de um grupo metileno ($=\text{CH}_2$) dos PUFA inicia-se uma sequência de

reações chamada lipoperoxidação (LPO), que tem como resultado um radical carbono ($-C^{\bullet}$) que reage com oxigênio molecular formando um radical peroxil, que alimenta a cadeia de reações da LPO (HERMES-LIMA, 2004).

A LPO é uma das maiores causas de danos e morte celular, pois várias são as suas consequências, como redução da fluidez das membranas, deixando-as mais rígidas, inativação de receptores de membranas, alteração do fluxo transmembrana e até mesmo o rompimento da bicamada (HERMES-LIMA, 2004; MANDUZIO et al., 2005). Um dos produtos finais da LPO é o malondialdeído (MDA), formado a partir do rompimento da membrana, que é considerado mutagênico e cancerígeno. O MDA pode ser mensurado através da sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido em altas temperaturas e pode ser utilizado como biomarcador para identificação de danos resultantes da formação de ERO (HERMES-LIMA, 2004).

Outro efeito que o estresse oxidativo pode ter sobre o organismo é a carbonilação de proteínas, através da qual as cadeias laterais de aminoácidos são modificadas através da formação de grupamentos aldeídicos e cetônicos (FILIPAK e NETO, 2005; LEVINE et al., 1994). Na carbonilação de proteínas, um grupamento carbonil é formado nas cadeias laterais de aminoácidos como a leucina, valina, isoleucina e prolina, produzindo um efeito irreversível (GRUNE, 2000). A detecção de alterações nos níveis de proteínas carboniladas (PCO) pode ser sinal de estresse oxidativo e também de disfunção proteica (DALLE-DONNE et al., 2003), pois uma enzima que tem a formação de grupamento carbonil em sua estrutura pode ter sua funcionalidade comprometida e ser inativada (HERMES-LIMA, 2004). A presença de proteínas carboniladas nas células e tecidos tem sido amplamente aceita como biomarcador de estresse oxidativo (HERMES-LIMA, 2004).

1.5.2.3. Metalotioneínas

Uma vez dentro do organismo o metal pode ser detoxificado através da formação de um complexo entre o metal e grupamentos sulfidril, como é o caso das metalotioneínas, constituindo o grupo de ligantes a metais mais estudado (NIKINMAA, 2014). As metalotioneínas (MT) são um grupo de proteínas citosólicas de baixo peso molecular (6-7 kDa) e estrutura molecular composta de apenas uma cadeia contendo em média entre 61 e 68 aminoácidos, contendo um elevado número de cisteínas (18 a 23), representando cerca de 30 % do total de

aminoácidos. Estas proteínas possuem alta afinidade por íons metálicos livres graças à abundância de ligantes tióis (-SH) dos resíduos de cisteína presentes na sua estrutura, sendo, portanto, consideradas importantes biomarcadores associados à exposição a metais (NIKINMAA, 2014; NORDBERG, 1998; VIARENGO et al, 2007). Praticamente todos os organismos vivos possuem genes que codificam para MTs e ao todo existem 15 famílias de MTs, que são classificadas de acordo com o tipo de organismo em que são encontradas, por exemplo, a família 1 está presente em todos os vertebrados, inclusive peixes (NIKINMAA, 2014).

Diante do aumento da concentração de metais no organismo a expressão das MTs pode ser aumentada através da indução dos genes responsáveis por sua produção, atuando na detoxificação destes metais através do papel quelante que possuem. As MTs também podem atuar na defesa antioxidante do organismo, através do sequestro de ERO, e em condições normais atuam na manutenção de concentrações de metais essenciais, como o cobre e o zinco (FALFUSHYNSKA e STOLYAR, 2009; MONSERRAT et al., 2007; NIKINMAA, 2014; VIARENGO et al., 2007). As MTs podem ser encontradas em grande quantidade em órgãos como fígado, rins e brânquias, devido aos seus papéis na absorção, estocagem, detoxificação e eliminação de metais dos peixes (FREIRE et al., 2008).

1.5.2.4. Acetilcolinesterase

Outro biomarcador bioquímico muito utilizado é a acetilcolinesterase (AChE), responsável pela quebra da acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético nas fendas sinápticas, evitando a transmissão contínua do impulso nervoso (VAN DER OOST et al., 2003). A presença de contaminantes no ambiente pode inibir a atividade da AChE, fazendo com que o impulso nervoso não cesse, superestimulando os receptores da célula pós-sináptica, podendo afetar o equilíbrio, apetite, padrão natatório, comportamento reprodutivo e até causar a morte do animal (BRETAUD et al., 2000; CHEBBI e DAVID, 2009).

A inibição da AChE já é bem conhecida em consequência da contaminação da água por organofosforados e carbamatos (VAN DER OOST et al., 2003). Porém, também há relatos de inibição da AChE diante da exposição a metais (FRASCO et al., 2005; GIODA et al., 2013), mas ainda não há consenso

sobre a sensibilidade deste biomarcador a este tipo de contaminante (TILTON et al., 2011).

1.5.3. Biomarcadores genotóxicos

O grau de integridade do DNA tem sido proposto como um indicador sensível a compostos genotóxicos e, portanto, um biomarcador para a realização de monitoramento ambiental. De acordo com Zhu e colaboradores (2005), os danos no DNA encontrados em organismos aquáticos de ambientes poluídos podem ser utilizados para estudar a genotoxicidade de certos agentes tóxicos e também para análise de risco ecotoxicológico e ambiental. Compostos químicos em concentrações subletais podem interagir com o DNA causando diversos tipos de danos, como lesões mutagênicas e instabilidade no sistema de reparo do DNA (EISENBRAND et al., 2002). Mas também podem causar danos indiretamente, como é o caso de diversos metais que podem induzir a produção de ERO, que também são responsáveis por causar danos no DNA (GALARIS e EVANGELOU, 2002). Assim, o contaminante pode causar dano no DNA através da sua ligação covalente ou de seu metabólito à molécula de DNA, ou através das ERO, que se ligam às bases nitrogenadas, podendo causar troca de bases púricas e pirimídicas e modificar a cadeia de desoxirribose, que podem resultar em quebra de uma ou das duas fitas de DNA e formação de *crosslinks*, porém estes são danos que são reparados pelo próprio organismo (NEWMAN e CLEMENTS, 2008; TICE et al., 2000).

Um ótimo método de detecção de danos no DNA é o ensaio do cometa na versão alcalina, que detecta quebras na fita de DNA, sítios álcali-lábeis e *crosslinks* através de uma corrida de eletroforese, onde os fragmentos são separados do DNA intacto, formando uma cauda (SILVA et al., 2003; TICE et al., 2000).

1.5.4. Biomarcadores Fisiológicos

Ensaio para determinação de parâmetros fisiológicos são amplamente utilizados para o monitoramento de exposições a eventos agudos, sendo importantes como um alerta precoce, pois a resposta do organismo à exposição a um composto tóxico é geralmente instantânea e sensível a baixas concentrações deste composto (HANDY e DEPLEDGE, 1999).

1.5.4.1. Biomarcadores hematológicos

Em peixes, a única barreira presente entre o sangue e a água é o epitélio lamelar das brânquias, assim o sangue reflete as mudanças que ocorrem no ambiente (SAMPATH et al., 1993). Por isso, os parâmetros medidos no sangue, como a concentração de hemoglobina, hematócrito e a contagem do número de eritrócitos são importantes indicadores biológicos da saúde destes organismos (JESUS e CARVALHO, 2008) e largamente utilizados como indicadores de estresse em peixes (TAVARES-DIAS, 2001).

São três os índices hematológicos analisados primariamente: o conteúdo de hemoglobina (Hb), o hematócrito (Hct) e o número de eritrócitos (RBC). Estes parâmetros demonstram o estado fisiológico dos peixes e são utilizados no controle de patologias e como indicadores de estresse (MARTINEZ et al., 1994).

Mudanças nas concentrações de hemoglobina podem refletir a tentativa do organismo em manter a concentração de oxigênio estável, enquanto outros índices hematológicos como a contagem de eritrócitos e hematócrito são considerados respostas secundárias ao contaminante. Comumente, exposições a metais traços, mesmo que durante curtos períodos, induzem um aumento destes índices hematológicos (VOSYLIENÉ, 1999). A hemoglobina também pode ter sua concentração reduzida juntamente com o número de eritrócitos, indicando uma possível anemia causada pelo contaminante, como é o caso do cádmio, ferro e chumbo (HEATH, 1995). O hematócrito pode sofrer aumentos quando as brânquias estão danificadas, ocorrendo então um inchaço dos eritrócitos detectado pelo hematócrito (HEATH, 1995).

1.5.4.2. Osmolalidade plasmática

A osmorregulação é o processo pelo qual a quantidade total de eletrólitos e o volume da água de um organismo são mantidos relativamente constantes. A capacidade osmorregulatória de peixes de água doce é essencial para sua sobrevivência neste ambiente, visto que estes são hiperosmóticos em relação ao meio, estando sempre na presença de um gradiente iônico que favorece a perda de íons e o ganho de água (MARSHAL, 2002). A hiperrregulação consiste na eliminação da grande quantidade de água ganha devido ao gradiente osmótico e na manutenção dos sais corporais, que tendem a ser perdidos para o meio aquático (RANDALL et al., 2000). Em peixes de água doce ocorre a captação

ativa de íons da água através das brânquias e a reabsorção de sais nos túbulos renais, resultando na produção de uma urina diluída abundante (HUGGET, 1992). Porém, a osmorregulação de peixes pode ser prejudicada na presença de metais no ambiente aquático (MARTINEZ, 2004). Assim, as concentrações de íons e a osmolalidade plasmática são biomarcadores importantes, muito sensíveis e muito utilizados para avaliar efeitos dos metais em peixes (WENDELAAR-BONGA e LOCK, 2008).

Uma vez dentro do organismo os metais podem afetar a fisiologia, causando diversos prejuízos, como na osmorregulação devido à inibição de enzimas importantes como a Na^+/K^+ -ATPase (NKA) (ROGERS et al., 2003), Ca^+ -ATPase (ROGERS e WOOD, 2004) e anidrase carbônica (SKAGGS e HENRY, 2002). Estas enzimas, presentes em grandes quantidades nas células de cloreto das brânquias, são responsáveis pela manutenção do equilíbrio ácido-base e da osmorregulação (CLAIRBONE et al., 2002). Diante de uma situação de estresse, como a presença de um contaminante no ambiente, o animal sofre uma estimulação à produção de cortisol que tem como um dos resultados a proliferação das células cloreto nas brânquias, para que o equilíbrio osmorregulatório volte ao normal (MANCERA e Mc CORMICK, 2007).

1.5.4.3. Glicose plasmática

A contaminação aquática pode ter como resultado um estresse metabólico no organismo, devido a uma maior demanda energética, podendo afetar suas reservas nutricionais (DI GIULIO et al., 1995). Uma das primeiras respostas do organismo a este estresse é o aumento de glicose no sangue devido a glicogenólise, por meio da qual o glicogênio armazenado no fígado é quebrado, visando suprir a nova demanda energética causada pelo agente estressor (MORGAN e IWAMA, 1997; THOMAS, 2008). Este aumento de glicose no sangue se deve a secreção de hormônios como as catecolaminas e cortisol (HUSSEIN e NADIM, 2003), que são liberados no organismo como resposta ao estresse (BARTON, 2002).

1.6. Ensaios de Toxicidade

1.6.1. *In vivo*

Ensaios de toxicidade *in vivo* são utilizados para detecção e avaliação da capacidade de um agente químico produzir efeitos deletérios nos

organismos vivos. Estes testes se baseiam na exposição de determinados organismos a diferentes concentrações de substâncias ou compostos químicos, efluentes ou somente água, por um período de tempo e condições previamente determinados (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990).

Conhecer a toxicidade dos agentes químicos a diferentes organismos aquáticos nos permite estabelecer limites permissíveis de várias substâncias para a proteção da vida aquática e avaliar o impacto que estes contaminantes podem causar à biota dos ambientes aquáticos. As metodologias utilizadas são geralmente simples, como os testes de toxicidade de curto prazo para avaliação de efeitos agudos (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006). De acordo com Martins e Bianchini (2011) os resultados de testes de toxicidade são de extrema importância, pois podem ajudar agências reguladoras a padronizarem concentrações máximas permitidas para determinados compostos a partir de seus efeitos em espécies com grande importância ecológica na região.

Geralmente os testes de toxicidade aguda avaliam os efeitos sofridos pelos organismos por consequência da exposição ao xenobiótico em curto prazo (geralmente de um a quatro dias). São ensaios de baixo custo, fácil execução, curta duração e graças a essas vantagens estes testes foram os primeiros a serem desenvolvidos, constituindo a base de dados em ecotoxicologia (BIRGE et al., 1985, LOMBARDI, 2004).

1.6.2. *In vitro*

Outro método muito utilizado para a avaliação da qualidade ambiental é através de ensaios *in vitro*, devido às vantagens que a utilização de culturas celulares oferece, como rapidez, facilidade e reprodutibilidade na obtenção de resultados (BOLS et al., 2005). Os métodos sem a utilização de animais, como é o caso dos estudos *in vitro*, assim como abordagens baseadas em modelos computacionais, fornecem ferramentas importantes para compreensão dos efeitos de compostos químicos e prevenção de seus efeitos (BROADHEAD e COMBES, 2001). Originalmente, as linhagens celulares animais que começaram a ser utilizadas foram de humanos e roedores, e a partir do sucesso em experimentos com estas linhagens iniciou-se o estudo com linhagens de peixes (BOLS et al., 2005).

O uso de culturas celulares oferece diversas vantagens como ferramentas experimentais. Elas permitem o estudo de situações controladas,

independente de variações fisiológicas ou sistêmicas (BOLS et al., 2005), elas respondem rapidamente à presença de um composto tóxico podendo alterar taxas metabólicas, transcrição de genes e crescimento celular (EISENBRAND et al., 2002). Na toxicologia elas possuem algumas vantagens sobre o uso de animais, como a redução de resíduos tóxicos, a rapidez de obtenção de resultados, baixo custo de realização e redução do uso de animais nos testes de toxicidade (BOLS et al., 2005). O uso de linhagens celulares na ecotoxicologia também nos permite comparar a exposição de células de diferentes espécies de peixes a uma mesma situação específica, como uma concentração pré-determinada de um contaminante (BOLS et al., 2005).

Atualmente existem diversas linhagens celulares derivadas de diferentes órgãos de peixes, como fígado, brânquias, gônadas, dentre outros. Estas linhagens podem ser utilizadas para obtenção de diversos parâmetros, como citotoxicidade, genotoxicidade, alteração no padrão de crescimento e metabolismo de determinado xenobiótico (BOLS et al., 2005).

1.7. Modelos Experimentais

Peixes são sensíveis ao aumento na concentração de metais traço na água, combinando efeitos tanto das condições bióticas quanto das abióticas do ambiente aquático (DRAGUN et al., 2009). Além disso, eles estão presentes em vários ambientes e tem ampla distribuição geográfica, sendo, portanto considerados ótimos modelos biológicos. Entretanto, no Brasil ainda são poucas as espécies utilizadas nos testes de toxicidade e ainda pouco se sabe sobre a sensibilidade de muitas espécies de peixes neotropicais aos diversos tipos de poluentes presentes nos ecossistemas tropicais de água doce (MARTINEZ et al., 2004). Contrariando esta situação podemos citar o peixe *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Fig. 8), que é considerado adequado para análises toxicológicas do ambiente, pois representa uma espécie nativa neotropical, com grande sensibilidade a vários tipos de contaminantes, como os metais alumínio (CAMARGO et al., 2009), chumbo (MONTEIRO et al., 2011), cobre (NASCIMENTO et al., 2012) e níquel (PALERMO et al., 2015).

A espécie de peixe *P. lineatus* é nativa da região neotropical, da ordem Characiformes, família Prochilodontidae, conhecida popularmente como curimba ou curimatá. Ela está presente em toda a bacia do Rio Paraná-Rio Paraguai, em rios do Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia (CASTRO e VARI, 2004). Esta espécie

de peixe é considerada vulnerável à presença de contaminantes no ambiente aquático devido a características como seu hábito alimentar detritívoro e comportamento migratório (SHIBATTA et al., 2007).



Figura 8 – Foto de um indivíduo jovem de *Prochilodus lineatus* Foto: LEFA/UEL.

O teleósteo *Danio rerio* (Hamilton, 1822), conhecido como *zebrafish* ou paulistinha (Fig. 9) é amplamente utilizado como modelo biológico em ensaios ecotoxicológicos para identificação de efeitos à exposição a vários tipos de contaminantes, devido ao alto conhecimento de sua genética, morfologia, bioquímica e fisiologia (GHOSH et al., 1994). Recentemente a linhagem celular de hepatócitos de *zebrafish*, denominada linhagem ZF-L (Fig. 10), ganhou espaço nos ensaios ecotoxicológicos se tornando assim um modelo importante para este tipo de estudo (HE, 2010). Esta linhagem foi estabelecida por Ghosh e colaboradores em 1994, a partir de fígados de indivíduos adultos, e apresenta propriedades características de células do parênquima hepático mesmo após 100 gerações em cultura celular, fornecendo assim um ótimo sistema *in vitro* para estudos de metabolismo em células de fígado (GHOSH et al., 1994).

A



B

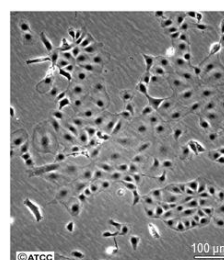


Figura 9 – A: Foto de um indivíduo de *Danio rerio*. B: Imagem de linhagem celular ZF-L.

Alguns trabalhos já mostraram que as células ZF-L apresentam sensibilidade à exposição a metais, utilizando-se alguns tipos de biomarcadores, como indução de mRNA de metalotioneínas em células expostas ao arsênio, cobre, zinco e mercúrio (CHAN et al., 2006; CHEUK et al., 2008) e redução da

viabilidade celular e aumento da formação de ERO (SANDRINI et al., 2009) após exposição ao cobre.

1.8. Referências

- ADAMS, S.M.; SHUGART, L.R.; SOUTHWORTH, G.R.; HINTON, D.E. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (editors) **Biomarkers of Environmental Contamination**, Boca Raton, Lewis Publishers, p. 333-353. 1990.
- AMADO, L.L.; GARCIA, M.L.; RAMOS, P.B.; FREITAS, R.F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, L.R.; YUNES, J.S.; MONSERRAT, J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms. Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 2115-2123, 2009.
- ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**, Rima Editora, São Carlos, p. 117-152. 2006.
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência da Saúde Coletiva [online]**, v.12, n.1, p. 61-72, 2007.
- BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 517-525, 2002.
- BAYNE, B.L.; BROWN, D.A.; BURNS, K.; DIXON, D.R.; IVANOVICI, A., LIVINGSTONE, D.A.; LOWE, D.M.; MOORE, M.N.; STEBBING, A.R.D.; WIDDINGS, J. **The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals**, Praeger, New York, USA, 1985.
- BIANCHINI, A.; MARTINS, S.E.; JORGE, M.B. **O Modelo do Ligante Biótico e suas Aplicações em Ecotoxicologia**. 34p. 2009.
- BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; WESTERMAN, A. G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 49, p. 807-821, 1985.
- BOLS, N.C.; DAYEH, V.R.; LEE, L.E.J.; SCHIRMER, K. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, Elsevier B.V., Amsterdam, Holanda. 6ª ed. Cap. 2. p. 43-84, 2005.
- BOPP, S.K.; LETTIERI, T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. **BMC Pharmacology**. v. 8. 2008.
- BRETAUD, S.; TOUTANT, J.P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 117-124, 2000.
- BROADHEAD, C.L.; COMBES, R.D. The current status of food additives toxicity testing and the potential for application of the three Rs. **Alternatives to laboratory animals: ATLA**, v. 29 (4), p. 471-485, 2001.
- BURATINI, V.B.; BRANDELLI, A. Bioacumulação In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. (Eds) **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações**. Ed. Rima, São Carlos, 478p. 2006.
- BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Caderno da Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 465-473, 2003.

- CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTED, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.
- CAMARGO, M.M.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p. 40-46, 2009.
- CAMPOS, M. L.; DA SILVA, F. N.; NETO, A. E. F.; GUILHERME, L. R. G.; MARQUES, J. J.; ANTUNES, A. S. Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo e zinco em fosfatos de rocha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 361-367, 2005.
- CASTRO R.M.C.; VARI, R.P. Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n. 622, 2004.
- CHAN, K.M.; KU, L.L.; CHAN, P.C.Y.; CHEUK, W.K. Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. **Marine Environmental Research**, v. 62, p. 83-87, 2006
- CHEBBI, S.G.; DAVID, M. Neurobehavioral responses of the freshwater teleost, *Cyprinus carpio* (Linnaeus.) under quinalphos intoxication. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 25, p. 241-249, 2009.
- CHEUK, W.K.; CHAN, P.C.Y.; CHAN, K.M. Cytotoxicities and induction of metallothionein (MT) and metal regulatory element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1) messenger RNA levels in the zebrafish (*Danio rerio*) ZFL and SJD cell lines after exposure to various metal ions. **Aquatic Toxicology**, v. 89, p. 103-112, 2008.
- CHUNG, M. J.; HOGSTRAND, C.; LEE, S. J. Cytotoxicity of nitric oxide is alleviated by zinc-mediated expression of antioxidant genes. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, p. 1555-1563, 2006.
- CHUNG, N. J.; WALKER, P. A.; BROWN, R. W.; HOGSTRAND, C. Zinc-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 205, p. 225-236, 2005.
- CLAIRBONE, J. B.; EDWARDS, S. L.; MORRISON-SHETLAR, A.I. Acid-base regulation in fishes: Cellular and molecular mechanisms. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, p. 302-319, 2002.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. **Resolução Nº 357** de 17 de março de 2005. 2005.
- DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v.329, p.23-38, 2003.
- DI GIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity. In: RAND, G.M. (Eds) **Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**, CRC Press, c. 17, p. 523-561, 1995.
- DRAGUN, Z.; PODRUG, M.; RASPOR, B. Combined use of bioindicators and passive samplers for the assessment of river water contamination with metals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57 (2), p. 211-220, 2009.
- EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods on *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.

- ESTEVEES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**, 2^a. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 575 p. 1998.
- FALFUSHYNSKA, H.I.; STOLYAR, O.B. Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 729-736, 2009.
- FARAG, A. M., SKAAR, D., NIMICK, D. A., MACCONNELL, E., AND HOGSTRAND, C. Characterizing aquatic health using salmonid mortality, physiology, and biomass estimates in streams with elevated concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, and zinc in the Boulder River watershed. Montana. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 132, p. 450-467, 2003.
- FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, v. 205, p. 223-240, 2004.
- FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BUSSOLARO, D.; FERRARO, M.V.M.; RANDI, M.A.F.; ALVES COSTA, J R.M.; CESTARI, M.M.; ROCHE, H.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. **Toxicology In Vitro**, v.21, p.706-715, 2007.
- FRASCO, M.F.; FOURNIER, D.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L.; Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. **Biomarkers**, v.10, p. 360-375, 2005.
- FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.S.F.; ARIAS, A.R.L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p.347-354, 2008.
- GALARIS, D.; EVANGELOU, A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 42, p. 93-103, 2002.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAUJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. Sao Paulo. **CETESB: Serie Manuais**, v. 6, 17p. 1990.
- GHOSH, C.; ZHOU, Y.L.; COLLODI, P. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. **Cell Biology and Toxicology**, v. 10, p. 167-176, 1994.
- GIODA, C.R.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; SALBEGO, J.; DRESSLER, V.; FLORES, E.M.M. Sublethal Zinc and Cooper Exposure affect Acetylcholinesterase Activity and Accumulation in Different Tissues of *Leporinus obtusidens*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, p. 12-16, 2013.
- GÓMEZ, S.; VILLAR, C.; BONETTO, C. Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná River and Rio de la Plata Estuary. **Environmental Pollution**, v. 99, p.159-165, 1998.
- GRUNE, T. Oxidative stress, aging and the proteasomal system. **Biogerontology**, v.1, p. 31-40, 2000.
- HANDY, R.D.; DEPLEDGE, M.H. Physiological Responses: Their Measurement and use as Environmental Biomarkers in Ecotoxicology. **Ecotoxicology**, v. 8, p. 329-349, 1999.
- HARDY, R. W.; SULLIVAN, C. V.; KOZIOL, A. M. Absorption, body distribution, and excretion of dietary zinc by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Fish Physiology Biochemistry**, v. 3, p. 133-143, 1987.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3^a ed. Clarendon Press, Oxford, p.146-148, 2005.

- HE, S. Cancer and Inflammation Studies Using Zebrafish Cell Lines. Tese de Doutorado. Institute of Biology (IBL), Faculty of Science, Leiden University. 2010. In: TENG, Q., EKMAN, D.R., HUANG, W., COLLETE, T.W. Impacts of 17 α -ethynylestradiol exposure on metabolite profiles of zebrafish (*Danio rerio*) liver cells. **Aquatic Toxicology**, v. 130, p. 184-191, 2013
- HEATH, A.G. **Water Pollution and Fish Physiology**, 2^a ed. CRC Press, Inc, Boca Raton, New York, London, Tokyo, 395p. 1995.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: STOREY, K.B. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**, John Wiley and Sons, New York, p.319-368, 2004
- HERSKOVITZ, J.; HELGUERO, L. A. Copper toxicity and copper-zinc interactions in amphibians embryos. **Science of the Total Environment**. Amsterdam. v. 221, p. 1-10. 1998.
- HOGSTRAND, C.; VERBOST, P. M.; BONGA, S. E.; WOOD, C. M. Mechanisms of zinc uptake in gills of freshwater rainbow trout: interplay with calcium transport. **American Journal of Physiology**, v. 270, p. R1141-R1147, 1996.
- HOGSTRAND, C. Zinc. In: WOOD, C., FARRELL, A.P., BRAUNER, C.J. (Eds). **Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals**. Academic Press. p. 135-200. 2012.
- HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, J.R.; BERGMAN, H.L. **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 347p. 1992.
- HUSSEIN, A.J.; NADIM, C. Bioaccumulation of zinc and cadmium in freshwater fishes. **Indian Journal of Fisheries**, v. 50. p. 53-65, 2003.
- ICZ - Instituto de Metais não Ferrosos. **Estatísticas do Zinco – 2012**. Disponível em: <http://www.icz.org.br/estatisticas-dos-metais-2012.php> Acesso em 15 dez. 2014.
- ICZ - Instituto de Metais não Ferrosos. **Estatísticas do Zinco – 2013**. Disponível em: <http://www.icz.org.br/estatisticas-dos-metais-2013.php> Acesso em 15 dez. 2014.
- IZA - International Zinc Association. **Zinc in the Environment: An Introduction**. 2^a ed. 1997.
- JENG, S.S.; LO, H.W. High zinc concentration in common carp viscera. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 1974. In: SUN, L.T.; JENG, S.S. Comparative Zinc Concentrations in tissues of Common Carp and Other Aquatic Organisms. **Zoological Studies**, v. 37, p. 184-190, 1998.
- JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 680-693, 2008.
- KIMURA, T.; ITOH, N.; ANDREWS, G. K. Mechanisms of heavy metal sensing by metal response element-binding transcription factor-1. **Journal of Health Science**, v. 55 (4), p. 484-494, 2009.
- LAM, P.K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**, v.52, p.348-354, 2009.
- LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p.346-357, 1994.
- LIMA, J. S. O biomonitoramento como ferramenta complementar na avaliação de impactos ambientais: Discutindo conceitos. **EcoTerra Brasil**. Junho, 2000.
- LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S.M.; Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v.8, p.469-484, 2010.

- LIVINGSTONE, D.R. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.154, p. 427-430, 2003.
- LOMBARDI, J.L. Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Varela. São Paulo – SP, p. 263-272. 2004.
- LULLMANN-RAUCH, R. Drug-induced lysosomal storage disorders. In: DINGLE, J.J.; JAQUES, P.J.; SHAW, I.H. (Eds) **Lysosomes in applied biology and therapeutics**, North Holland Publishers, Amsterdam, p. 49-129, 1979.
- LUOMA, S. N.; RAINBOW, P. S. **Metal Contamination in Aquatic Environments: Science and Lateral Management**, Cambridge University Press, New York, 2008.
- LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 13-30, 2011.
- MACKENZIE, E.L. Reactive Oxygen/Reactive Metabolites and Toxicity. In: SMART RC, HODGSON E (Eds) **Molecular and Biochemical Toxicology**, 4^a ed. John Wiley & Sons, New Jersey, p. 389-412, 2008.
- MANCERA, J.M.; MCCORMICK, S.D. Role of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol in teleost osmoregulation. In BALDISSEROTTO, B.; ROMERO, J.M.M.; KAPOOR, B.G. (Eds) **Fish Osmoregulation**, Science Publishers, California. 1^aed. c. 16, p. 497-515, 2007.
- MANDUZIO, H.; ROCHER, B.; DURAND, F.; GALAP, C.; LEBOULENGER, F. The point about oxidative stress in mollusks. **Invertebrate Survival Journal**, v.2, p. 91-104, 2005.
- MARSHALL, W. S. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ Transport by Fish Gills: Retrospective Review and Prospective synthesis. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, p. 264-283, 2002.
- MARTINEZ, C.B.R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: SILVA-SOUZA, A. T. (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**, Maringá: ABRAPOA, p. 43-62, 2006.
- MARTINEZ, C. B. R.; CÔLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.) **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina: MC Gráfica. c.29. p. 551-577. 2002.
- MARTINEZ, F.J.; GARCI-RIEIRA, M.P.; CANTERAS, M.; COSTA, J.; ZAMORA, S. Blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): simultaneous influence of various factors. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 107, p. 95-100, 1994.
- MARTINEZ, C.B.R.; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 797-807, 2004.
- MARTINS, S. E.; BIANCHINI, A. J. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 1866-1875, 2011.
- MASELLA, R. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.16, p.577-586, 2005.
- MATSUURA, K. Bioindicadores em Ecossistemas. **Unesco**, 2000.
- MONSERRAT, J.M.; MARTINEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M.G.; PINHO, G.L.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals:

- Critical review and new perspectives **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v.146, p.221-234, 2007.
- MONTEIRO, V.; CAVALCANTE, D.G.; VILÉLA, M.B.; SOFIA, S.H.; MARTINEZ, C.B. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v.104, p.291-298, 2011.
- MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. Measurements of stressed states in the field. In: IWAMA, G.W.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Editors) **Fish stress and health in aquaculture**, Cambridge: University Press, c. 10, p.247-270, 1997.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J.A.; RESGALLA Jr. C. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladocero *Daphnia magna*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, p. 93-100, 2006.
- NASCIMENTO, C.R.; SOUZA, M.M.; MARTINEZ, C.B. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v.155, p.456-461, 2012.
- NEWMAN, M.C.; CLEMENTS, W.H. **Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment**, CRC Press, Boca Raton. 880p. 2008.
- NIKINMAA, M. **An Introduction to Aquatic Toxicology**, Academic Press. Elsevier. 252p. 2014.
- NORDBERG, M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. **Talanta**, v. 46, p. 243-254, 1998.
- NRIAGU, J. O. Global Metal Pollution: Poisoning the Biosphere? **Environment: Science and Policy for Sustainable Development**, v. 32, p. 7-33, 1990.
- PALERMO, F.F.; RISSO, W.E.; SIMONATO, J.D.; MARTINEZ, C.B.R. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.116, p. 19-28, 2015.
- PEREIRA, G.C.; EBECKEN, N.F.F. Knowledge discovering for coastal waters classification. **Expert Systems with Applications**, v. 36, n. 4, p. 8604-8609, 2009.
- PRASAD, A.S. Mini Review: Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. **Experimental Gerontology**, v. 43, p. 370-377, 2008.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Eckert, Fisiologia Animal – Mecanismos e Adaptações**, 4ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.
- RAND, G.M.; WELLS, P.G.; MCCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G.M. (Eds.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**, 2ª ed. Washington: Taylor & Francis. c. 1, p. 03-70, 1995.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-31, 2008.
- REYNDERS, H.; VAN CAMPENHOUT, K.; BERVOETS, L.; DE COEN, W. M.; BLUST, R. Dynamics of cadmium accumulation and effects in common carp (*Cyprinus carpio*) during simultaneous exposure to water and food (*Tubifex tubifex*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 1558-1567, 2006.

- ROGERS, J.T.; RICHARDS, F.G.; WOOD, C.M. Ionoregulatory disruption as acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 215-234, 2003.
- ROGERS, J.T.; WOOD, C.M. Characterization of branchial lead-calcium interaction on the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 813-825, 2004.
- SAMPATH, K.; VALAMMAR, S.; KENNEDY, I.J.J.J.; JAMES, R. Haematological changes and their recovery in *Oreochromis mossambicus* as a function of exposure period and sublethal levels of Ekalux. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 35, p. 73-83, 1993.
- SANDRINI, J.Z.; BIANCHINI, A.; TRINDADE, G.S.; NERY, L.E.M.; MARINS, L.F.F. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. **Aquatic Toxicology**, v. 95, p. 285-291, 2009.
- SANDSTEAD, H.H.; AU, W. Zinc. In: NORDBERG, G.F., FOWLER, B.A., NORDBERG, M., FRIBERG, L.T. **Handbook on the Toxicology of Metals**, Amsterdam: Elsevier. 3^a ed., Cap. 47, p. 925-947, 2007.
- SHIBATTA, O.A.; GEALH, A.M.; BENNEMANN, S.T. Ichthyofauna from the middle and upper stretches of rio Tibagi basin, Paraná, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 125-134, 2007.
- SHRIVASTAVA, P.; SAXENA, A.; SWARUP, A. Heavy metal pollution in a sewage-fed lake of Bhopal, (M. P.) India. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**, v. 8, p. 1-4, 2003.
- SILVA, J.; ERDTMANN, B.; PEGAS, H.J.A. **Genética toxicological**, Alcance, Porto Alegre, 2003.
- SIMON-HETTICH, B.; WIBBERTMANN, A.; WAGNER, D. TOMASKA, L.; MALCOLM, H. **Zinc** (Environmental Health Criteria; 221). Review. World Health Organization, Geneva. 2001.
- SKAGGS, H.S.; HENRY, R.P. Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 605-612, 2002.
- SOARES, S. S.; MARTINS, H.; GUTIÉRREZ-MERINO, C.; AURELIANO, M. Vanadium and cadmium *in vivo* effects in teleost cardiac muscle: metal accumulation and oxidative stress markers. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 147, p. 168-178, 2008.
- SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Ensaio do cometa para avaliação das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. In: **Congresso Brasileiro de P & D em Petróleo e Gás-PDPETRO**. 2007
- STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 21, p. A.3B.1-A.3B.2, 2001.
- STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR, P.M.; BERGMAN, H.L. (Eds.) **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**, Boca Raton, Lewis Publishers, p. 235-335, 1992.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.F. Physiological responses of "tambaqui" *Colossoma macropomum* (CHARACIDAE) to acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, p. 43-48, 2001.

- TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação da exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: Exemplos no Recôncavo Baiano. **Química Nova**, v.5, p.147-153, 1992.
- THOMAS, P. The endocrine system. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. (Eds) **The Toxicology of Fishes**, CRC Press, Boca Raton. c. 10, p. 457-488, 2008.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.
- TILTON, F. A.; BAMMLER, T. K.; GALLAGHER, E. P. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebra fish exposed to copper or chlorpyrifos separately or as a mixture. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 153, p. 9-16, 2011.
- VALLEE, B. L. A synopsis of zinc biology and pathology. In: GRAY, H. (Eds) **Zinc Enzymes**, Birkhäuser, Basel, p. 1-15, 1986.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p. 57-149, 2003.
- VAN GESTEL, C. A. M.; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporations of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v.5, p. 217-225, 1996.
- VIARENGO, A. Heavy metals in marine invertebrates. Mechanism of regulation and toxicity at the cellular level. **Aquatic Sciences**, v. 1, p. 295-317, 1989.
- VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABRI, E.; KOEHLER, A. Review: The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v.146, p.281-300, 2007.
- VOSYLIENÉ, M.Z. The Effect os Heavy Metals on Haematological Indices of Fish (Survey). **Acta Zoologica Lituanica**, v. 9, p. 76-82, 1999.
- WENDELAAR BONGA, S.E.; LOCK, R.A.C. The osmoregulatory system. In: DI GIULIO, R.T. E HILTON, D.E. (Eds). **The Toxicology of Fishes**, New York, CRC Press. v. 8, p. 401-415, 2008.
- WINSTON, G. W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 19, p. 137-161, 1991.
- WOOD, C.M. An Introduction to Metals in Fish Physiology and Toxicology: Basic Principles In: WOOD, C., FARRELL, A.P., BRAUNER, C.J. (Eds). **Fish Physiology**. Academic Press, p. 1-53. 2012.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**, Rima Editora, São Carlos, p. 55-88, 2006.
- ZHOU, Q.; ZHANG, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, p. 135-150, 2008.
- ZHU, L.; HUANG, Y.; LIU, G. Using DNA damage to monitor water environment. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v.23, p.340-348, 2005.

2. Hipóteses

As concentrações de zinco previstas pela legislação brasileira (Resolução 357, CONAMA, 2005) para águas continentais não serão capazes de promover alterações em biomarcadores de uma espécie de peixe nativa e na linhagem celular ZF-L, após exposições *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, se mostrando seguras para a biota aquática.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do zinco (Zn), em concentrações dentro dos limites previstos pela legislação brasileira para corpos de água doce, para o peixe *Prochilodus lineatus* e para a linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZF-L), por meio de biomarcadores.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar se ocorre aumento da concentração de Zn em diferentes tecidos do teleósteo dulcícola *Prochilodus lineatus* após 24 h de exposição às concentrações de 0,2 mg Zn L⁻¹ e 2 mg Zn L⁻¹;
- Analisar as possíveis alterações em biomarcadores bioquímicos, genotóxicos e fisiológicos em *P. lineatus* expostos a 0,2 mg Zn L⁻¹ e 2 mg Zn L⁻¹ durante 24 h;
- Examinar se a exposição *in vitro* ao Zn, nas mesmas concentrações utilizadas nos testes *in vivo*, promove efeitos citotóxicos, genotóxicos e bioquímicos nas células ZF-L, após curtos períodos de exposição (1, 3 e 6 h);
- Comparar os efeitos do Zn observados nos testes *in vivo* e *in vitro*;
- Averiguar, com base nos parâmetros analisados, se as concentrações de Zn permitidas pela legislação brasileira (CONAMA 357/2005) para as águas doces são seguras para a biota.

4. Manuscrito 1

**Efeitos agudos da exposição ao zinco para o teleósteo *Prochilodus lineatus*:
bioacumulação, estresse oxidativo, danos genotóxicos e alterações
fisiológicas**

Nadjha Tanassovia Salvestrin^{1,2} e Cláudia Bueno dos Reis Martinez^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina. Paraná. Brasil.

² Laboratório de Ecofisiologia Animal – Departamento de Ciências Fisiológicas Universidade Estadual de Londrina. Paraná. Brasil.

Manuscrito a ser encaminhado para o Periódico Aquatic Toxicology.

RESUMO

O zinco (Zn) é um metal traço essencial aos organismos, no entanto como é muito utilizado na indústria pode contaminar os corpos de água. Assim, para avaliar os efeitos deste metal para o peixe *Prochilodus lineatus*, animais jovens foram expostos, durante 24 h, ao Zn, nas concentrações de 0,2 mg L⁻¹ (grupo Zn 0,2) e 2 mg L⁻¹ (grupo Zn 2) ou apenas a água desclorada (grupo CTR). Essas concentrações de Zn estão dentro dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira para águas continentais. Após a exposição, amostras de água e os tecidos dos peixes foram coletados para quantificação de zinco. Além disso, o fígado foi utilizado para quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e capacidade antioxidante total (CAOT), e também, junto com as brânquias, para as seguintes análises bioquímicas: conteúdo de glutatona (GSH), peroxidação lipídica (LPO), conteúdo de proteínas semelhantes às metalotioneínas (PSMT). O conteúdo de proteínas carboniladas (PCO) foi quantificado no fígado, brânquias e rim dos peixes. Cérebro e músculo foram utilizados para determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE). O sangue foi utilizado para verificação de danos no DNA através do ensaio do cometa com eritrócitos, para avaliação dos parâmetros hematológicos como hemoglobina (Hb), contagem de eritrócitos (RBC) e hematócrito (Hct) e para medida de osmolalidade e glicose no plasma. A exposição ao Zn 0,2 e Zn 2 não promoveu alterações em parâmetros como LPO, CAOT, AChE, RBC e Hb. Os resultados também mostraram que os peixes expostos ao Zn 2 apresentaram maior acúmulo de Zn no sangue, fígado e músculo, menor concentração de ERO no fígado e maiores concentrações de GSH e PSMT, apesar disso ocorreu aumento de danos oxidativos no fígado (aumento de PCO) e danos no DNA, além de alterações fisiológicas como aumento de Hct e osmolalidade. Estes resultados indicam que a concentração de 2 mg L⁻¹ de zinco não é segura para esta espécie de peixe neotropical, sendo, portanto, necessária uma revisão da legislação visando a melhoria do ambiente para estes organismos.

Palavras-chave: biomarcadores, defesas antioxidantes, lipoperoxidação, proteínas carboniladas, metalotioneínas danos no DNA.

4.1. Introdução

O aumento da população mundial está intimamente relacionado à expansão das atividades industriais, sendo este um dos principais responsáveis pela contaminação do ambiente aquático. Dentre os principais contaminantes encontrados no ambiente aquático estão os metais, que podem chegar aos corpos d'água através de processos naturais ou por atividades humanas por meio do uso de fertilizantes e pesticidas, pela queima de biomassa em zonas rurais, combustão de carvão e óleo, emissões veiculares, mas principalmente através de mineração, fundição e refinamento de metais (Nikinmaa, 2014). Uma vez nos ambientes aquáticos, os metais podem estar em sua forma iônica dissolvida ou complexados a moléculas presentes na coluna d'água ou no sedimento (Shrivastava et al., 2003; Nikinmaa, 2014). Um dos principais motivos da preocupação sobre a presença destes compostos no ambiente aquático é o fato de que estes não podem ser destruídos ou modificados, permanecendo assim indefinidamente no ambiente uma vez que foram retirados da superfície terrestre (Wood, 2012).

O zinco (Zn) é um dos metais traço de maior importância biológica e toxicológica, pois é um metal essencial e o segundo metal traço mais abundante na terra, ficando atrás apenas do ferro (Vallee, 1986; Sandstead e Au, 2007). Por ano, no mundo, são liberadas em média 45.000 toneladas métricas de Zn no ambiente apenas através de processos naturais (Nriagu, 1990). Entretanto, grandes quantidades de Zn são liberadas no ambiente como resultados de atividades antropogênicas, dentre as quais pode-se citar seu uso no revestimento de superfícies metálicas contra corrosão, fabricação de borracha, aditivos e pigmentos, na alimentação animal, na indústria farmacêutica, na produção de ligas metálicas para construção civil, produção de bronze e na produção de pilhas e baterias (Landner e Lindstrom, 1998; Simon-Hettich et al., 2001). O Brasil é o décimo segundo maior produtor de zinco no mundo (IBRAM, 2012) com uma média de 240.000 toneladas por ano (ICZ, 2012).

Normalmente o Zn pode ser encontrado em corpos d'água na concentração de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, podendo variar entre $0,02$ e 1000 mg L^{-1} em regiões próximas a áreas de mineração, galvanoplastia e atividades industriais (Luoma e Rainbow, 2008). Apesar da Resolução 357 (CONAMA, 2005) permitir a presença de 5 mg L^{-1} em água doce no território brasileiro, Farag e colaboradores (2003) já observaram peixes não eram encontrados habitando corpos d'água com concentrações de $5,7 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn.

Apesar da conhecida capacidade de metais aumentarem a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em peixes, instaurando o estresse oxidativo, responsável por diversos tipos de danos celulares e genéticos (Gioda et al., 2007) o Zn tem função importante na defesa antioxidante dos organismos. Isto se deve principalmente à sua capacidade de indução da produção de diversas defesas antioxidantes, através da ativação do fator de transcrição de metalotioneínas (MTF-1), responsável pela indução de produção das próprias metalotioneínas (MTs), glutathiona peroxidase (GPX), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e glutathiona-S-transferase (GST) (Chung et al., 2005; Chung et al., 2006; Kimura et al., 2009; Hogstrand, 2012; Nikinmaa, 2014). Outra forma do Zn atuar como antioxidante é através da inibição das enzimas NADPH oxidases, responsáveis por catalisar a produção de $O_2^{\cdot-}$, e também pela sua atuação na estrutura da enzima superóxido dismutase (SOD), responsável pela conversão do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (Prasad, 2008).

Em peixes, apesar do Zn atuar como antioxidante e participar de diversos sistemas enzimáticos, em altas concentrações ele pode se tornar tóxico, causando danos nas brânquias, onde pode ocasionar o espessamento do epitélio lamelar, prejudicando a tomada de oxigênio (Nikinmaa, 2014) e competindo por canais de cálcio presentes nas brânquias, comprometendo a tomada de cálcio, podendo levar o organismo à hipocalcemia e até à morte (Hogstrand et al., 1996; Hogstrand, 2012).

Dentre as ferramentas mais utilizadas na avaliação dos efeitos de contaminantes sobre organismos estão os biomarcadores, e dentre eles pode-se citar o aparato de defesa antioxidante, que envolve defesas enzimáticas e não enzimáticas, como a glutathiona (GSH), os danos oxidativos como danos no DNA, lipoperoxidação, oxidação de proteínas e alteração de parâmetros hematológicos (Van der Oost et al., 2003), a quantificação de metalotioneínas, principalmente frente a exposição a metais, que são proteínas que tem como principal função a detoxificação do organismo (Viarengo et al., 2007; Monserrat et al., 2007). A atividade da acetilcolinesterase tem sido muito utilizada para avaliação de efeitos de exposição a contaminantes orgânicos (Van der Oost et al., 2003), porém têm seu uso recente em contaminações por metais traço (Frasco et al., 2005).

Peixes são descritos como ótimos indicadores à contaminação aquática, sendo sensíveis à exposição a metais traço na água, combinando efeitos abióticos, devido ao ambiente, como abióticos, por estarem no topo da cadeia

alimentar (Dragun et al., 2009). Dentre as espécies utilizadas, particularmente em ambientes tropicais, pode-se citar a espécie *Prochilodus lineatus*, conhecida popularmente como curimba, considerada adequada para análises toxicológicas do ambiente, devido ao fato de ser uma espécie nativa neotropical, com grande sensibilidade a vários tipos de xenobióticos, dentre eles vários tipos de metais como alumínio (Camargo et al., 2009), chumbo (Monteiro et al., 2011), cobre (Nascimento et al., 2012) e níquel (Palermo et al., 2015).

Assim, considerando a escassez de estudos envolvendo os possíveis efeitos do zinco, em concentrações previstas pela legislação brasileira, sobre a biota aquática, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição aguda de juvenis de *Prochilodus lineatus* a diferentes concentrações de zinco na água através de alterações em parâmetros bioquímicos, hematológicos, osmorregulatórios, genéticos e sua bioacumulação nos organismos.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Modelo Experimental

Foram utilizados exemplares juvenis de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL), medindo $10,8 \pm 1,07$ cm e pesando $13,73 \pm 4,75$ g (média \pm DP, n = 120).

4.2.2. Substância teste

Para a realização da exposição dos peixes foi utilizado o sal sulfato de zinco (ZnSO_4) de peso molecular igual a 161,4. As condições de exposição foram: apenas água desclorada, $0,2 \text{ mg Zn L}^{-1}$ e 2 mg Zn L^{-1} . A concentração de $0,2 \text{ mg Zn L}^{-1}$ foi determinada por se tratar de uma concentração próxima da máxima permitida pela legislação brasileira (CONAMA, 2005) para águas de Classe 1 e 2, igual a $0,18 \text{ mg L}^{-1}$. A concentração de 2 mg L^{-1} por sua vez foi escolhida por se tratar de uma concentração intermediária entre a permitida para águas de Classe 1 e 2 e águas de Classe 3 e 4, igual a 5 mg L^{-1} . A concentração de 5 mg L^{-1} não foi utilizada, pois em testes preliminares esta causou mortalidade de metade dos indivíduos de *P. lineatus* após 24 h de exposição.

4.2.3. Ensaio de Toxicidade

Os peixes foram aclimatados em laboratório durante cinco dias, em tanques de 300 L, contendo água desclorada e com aeração constante e alimentação com ração a cada 48 h que foi suspensa 48 h antes do início do período de exposição. Após o período de aclimação os peixes foram submetidos a ensaios de toxicidade, realizados em aquários de 100 L, com 80 L de água contendo 8 peixes em cada. A exposição foi realizada durante o período de 24 h em teste estático. Os peixes foram separados em três grupos experimentais ($n = 8$ por grupo) com exposição simultânea: grupo controle (CTR), com peixes expostos apenas à água desclorada; grupo Zn 0,2, com peixes expostos ao zinco na concentração nominal de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$; e grupo Zn 2, com peixes expostos à concentração nominal de 2 mg L^{-1} de zinco na água. Foram realizadas 5 repetições dos experimentos, totalizando a utilização de 120 peixes.

4.2.4. Parâmetros físicos e químicos e quantificação de zinco na água

Durante a aclimação e também durante o tempo experimental foram feitas medidas dos parâmetros físicos e químicos da água a cada 24 h: temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD), turbidez, condutividade da água e sólidos dissolvidos, por meio de um medidor multiparâmetro (Horiba U-52). O valor de dureza da água nos grupos experimentais foi determinado pelo método titrimétrico do EDTA e expresso em mg CaCO_3 .

A concentração de Zn total e dissolvido na água foi medida no início e fim do período de exposição. Para verificação de Zn total, a água foi coletada e armazenada em tubos plásticos de 50 mL e fixadas com ácido nítrico (1% HNO_3), para análise de Zn dissolvido a água coletada foi filtrada (filtros de $0,45 \mu\text{m}$) e fixadas em ácido nítrico (1% HNO_3). As amostras foram armazenadas em refrigerador a 4°C e analisadas em Espectrofotômetro de Absorção Atômica (EAA) (AA 700 Perkin Elmer) por atomização em chama com base em uma curva feita com concentrações entre 0 e 4 mg L^{-1} de zinco a partir de um padrão de zinco 1000 ppm (Spec Sol).

Para quantificação de carbono orgânico dissolvido (COD) as amostras dos três grupos experimentais também foram fixadas e filtradas no caso dos compostos dissolvidos assim como foi realizado para a quantificação de Zn na água, e armazenados em tubos escuros, a fim de evitar contato com a luz, e

refrigerados a 4°C. As amostras foram analisadas em um analisador de carbono (TOC-VCPN, Shimadzu), conforme descrito por Rodrigues e Bianchini (2007).

4.2.5. Amostragem

Decorridas as 24 h de exposição, os exemplares de *P. lineatus* foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹), pesados e medidos, foi feita a retirada de sangue através da veia caudal, utilizando uma seringa previamente heparinizada. Em seguida os peixes foram mortos por secção medular e foram retiradas amostras de brânquia, fígado, rim, músculo e cérebro. Estas amostras foram mantidas em tubos de microcentrífuga para congelamento em ultra-freezer (-70°C) até o momento das análises dos biomarcadores. O sangue total foi utilizado para as análises hematológicas e ensaio genotóxico, posteriormente as células foram separadas por centrifugação (10 min, 1870 g) e o plasma armazenado em freezer -20°C para posteriores análises.

4.2.6. Determinação de Zinco nos Tecidos

A concentração de zinco foi determinada em amostras de sangue, brânquias, fígado, rim, músculo e cérebro. Logo depois de retirados os órgãos foram lavados com solução salina (26 mM NaCl, 4,3 mM sacarose, pH: 7,4) e armazenados em freezer -70°C. Tubos plásticos, previamente descontaminados em solução de ácido nítrico 10% durante 24 h, foram utilizados para armazenamento dos tecidos. Antes das análises as amostras foram mantidas em estufa a 60°C até a secagem total do tecido. Depois de secos os tecidos foram submetidos a digestão ácida em ácido nítrico suprapuro 5N (1:20, p/v), durante 48 h em estufa a 60°C. O material resultante da digestão foi diluído em HNO₃ 0,5% (1:10) e a determinação de Zn foi feita em Espectrofotômetro de Absorção Atômica (AA 700 Perkin Elmer) por atomização em chama.

4.2.7. Biomarcadores bioquímicos

Todos os resultados dos biomarcadores bioquímicos foram expressos por mg de proteína, determinada pelo método de Bradford (1976) em microplaca. Este método se baseia na reação das proteínas com o corante Coomassie Blue (Brilliant Blue) G250. A curva de calibração foi feita com albumina de soro bovino (BSA) e a leitura feita em leitora de microplaca em comprimento de onda de 595 nm.

4.2.7.1. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e Capacidade Antioxidante Total (CAOT)

Tanto as espécies reativas de oxigênio (ERO), quanto a capacidade antioxidante total (CAOT) contra radicais peroxil (ROO^\cdot), foram medidas de acordo com protocolo proposto por Amado e colaboradores (2009). O fígado, recém-retirado, foi homogeneizado (1:4 m/v) em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,5) contendo EDTA 2 mM e Mg^{+2} 5 mM e centrifugado (15600 g, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi diluído para a concentração de 1 mg de proteína mL^{-1} e as mesmas amostras foram submetidas a duas situações: presença e ausência de ABAP (2,2'-azobis (2-metilpropinamida) dihidroclorido) e tiveram sua autofluorescência medida. Todas as amostras foram tratadas com 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (1mM $\text{H}_2\text{DCF-DA}$), que é clivado por esterases presentes nas amostras formando H_2DCF que reage com as ERO, liberando diclorofluoresceína (DCF) e esta fluorescência é medida em espectrofluorímetro de microplaca (ex/em: 485/520 nm) durante 30 minutos a 35° C. Assim, quanto maior a quantidade de ERO, maior a fluorescência da amostra. O ABAP, quando decomposto, a 35°C, gera radicais peroxil. A partir da fluorescência emitida ao longo da leitura calcula-se a área dos gráficos pelo cálculo da integral das unidades de fluorescência com o passar do tempo. Para a quantificação de ERO foram analisados os valores das integrais das amostras que não receberam ABAP. Na análise da CAOT foi feita a diferença dos valores de área das amostras tratadas e não tratadas com ABAP, como na fórmula:

$$\text{Área relativa} = \frac{(\text{Área}_{ABAP} - \text{Área}_{SEM ABAP})}{\text{Área}_{SEM ABAP}}$$

Quanto maior a diferença entre as áreas, menor a CAOT pois altos valores de fluorescência indicam altos níveis de ERO e menor capacidade de neutralização destes compostos. Estes parâmetros foram expressos pela área dos gráficos.

4.2.7.2. Glutathiona (GSH)

Para este ensaio amostras de brânquia e fígado foram pesadas e homogeneizadas (1:5 m/v para brânquias e 1:10 m/v para o fígado) em tampão fosfato de potássio 0,1 M em pH 7,0. As amostras foram centrifugadas (20 min., 16000 g, 4°C) e o sobrenadante utilizado para a análise da concentração de GSH.

A concentração de GSH foi estimada de acordo com protocolo proposto por Beutler e colaboradores (1963), através da reação da glutathiona com o substrato 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) formando o ânion tiolato (TNB). No ensaio, cada amostra foi diluída na proporção 1:1 em ácido tricloroacético 6%, em DTNB (2,5 mM) e tampão fosfato de potássio 0,1M e pH 7,0. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas a 412 nm, com curva padrão de 5 a 200 μ M de GSH. O conteúdo de GSH foi expresso em μ g GSH mg proteína⁻¹.

4.2.7.3. Peroxidação Lipídica (LPO)

Para a determinação de ocorrência de peroxidação lipídica (LPO) foi realizado o ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), onde as amostras de brânquia e fígado foram pesadas e homogeneizadas (1:5 m/v para brânquias e 1:10 m/v para o fígado) em tampão fosfato de potássio 0,1 M em pH 7,0. As amostras foram centrifugadas (20 min, 16000 g, 4°C) e o sobrenadante utilizado para a análise de LPO. A LPO foi estimada, seguindo-se a metodologia de Federici e colaboradores (2007), por meio da quantificação do malondialdeído (MDA) através da sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em espectrofluorímetro de microplacas (ex/em: 535/590nm). Os resultados foram expressos em μ mol MDA mg de proteína⁻¹, utilizando uma curva padrão de MDA.

4.2.7.4. Proteínas Carboniladas (PCO)

Para quantificação de proteínas carboniladas (PCO), amostras de brânquias e fígado foram pesadas, homogeneizadas (1:5 m/v para brânquias e 1:10 m/v para o fígado) em tampão fosfato de potássio 0,1 M em pH 7,0, centrifugadas (20 min, 16000 g, 4°C) e o sobrenadante utilizado para a análise, pelo método descrito por Yan e colaboradores (1995) e modificado por Toni e colaboradores (2010). O conteúdo de grupamentos carbonila foi quantificado nas amostras a partir da reação das proteínas carboniladas com o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em HCl 2M em espectrofotômetro de microplaca em comprimento de onda de 370 nm. O resultado foi expresso em nmol carbonilas mg proteína⁻¹.

4.2.7.5. Proteínas semelhantes às Metalotioneínas (PSMTs)

Devido ao método utilizado foi possível apenas a quantificação de proteínas semelhantes a metalotioneínas (PSMT), pois este não é capaz de

putificar completamente apenas MTs. Para a quantificação de PSMT, as brânquias, rim e fígado foram pesados e homogeneizados (1:2 m/v para brânquia e rim e 1:3 m/v para fígado) em tampão (sacarose 0,5 M, Tris 26 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,5 mM, β -mercaptaetanol 1,3 mM) e centrifugados (45 min, 18000 g, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para análise. O procedimento para a quantificação de PSMTs presentes no tecido é baseado no protocolo estabelecido por Viarengo e colaboradores (1997) com modificações, no qual o sobrenadante passa por diversas etapas de fracionamento com a utilização de solução etanol-clorofórmio ácida e sucessivas agitações e centrifugações para obtenção de uma fração de metalotioneínas parcialmente purificadas. Foram quantificados os grupos sulfidril (-SH) fazendo-se uso do reagente de Ellman (2 M NaCl, 0,43 mM DTNB em tampão fosfato de Na 0,2 M, pH 8), com leitura em espectrofotômetro a 412 nm. A curva padrão foi feita com glutatona reduzida (GSH). O conteúdo de PSMTs foi expresso em nmol de GSH mg de proteína⁻¹.

4.2.7.6. Acetilcolinesterase (AChE)

Para a determinação da atividade da AChE, amostras de cérebro e músculo foram homogeneizadas (1:10 m/v) em tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,5), centrifugadas (10000 g, 20 min, 4°C) e sobrenadante foi utilizado para análise, segundo protocolo descrito por Ellman e colaboradores (1961), adaptado para microplaca por Alves Costa e colaboradores (2007). A quantificação da atividade da AChE, expressa em nmol DTNB min⁻¹ mg de proteína⁻¹, ocorreu a partir da reação de iodeto de acetilcolina (9 mM) com o reagente de cor que continha DTNB (0,5 mM). A degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE gera a tiocolina que reage com o DTNB, formando o nitrobenzoato, de coloração amarela. As leituras de variação de absorvância ocorreram durante 6 minutos em três leituras, em leitor de microplaca a comprimento de onda de 415 nm.

4.2.8. Biomarcadores genotóxicos: Ensaio do Cometa

O ensaio alcalino do cometa foi realizado com eritrócitos, de acordo com a metodologia descrita por Singh e colaboradores (1988), com modificações descritas por Ramsdorf e colaboradores (2009). Após a amostragem 10 μ L de sangue foram adicionados a 1 mL de soro bovino fetal, com o objetivo de manter as células viáveis até o momento do teste. Da solução de sangue e soro foi retirada uma alíquota de 10 μ L e misturada a 120 μ L de agarose de baixo ponto de

fusão, essa mistura foi dividida em duas lâminas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal e estas foram cobertas com lamínulas e em seguida mantidas em refrigerador a temperatura de 4-8°C, por 30 min. Após esse período as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas a 4-8°C, em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM), durante 2 h. Em seguida as lâminas foram acondicionadas em posição horizontal em cubas imersas em gelo, contendo tampão de eletroforese (NaOH 10 N e EDTA 200 mM, pH > 13), durante 30 min, para posterior corrida de eletroforese durante 20 min a 25 volts e 300 mA. Terminada a corrida, as lâminas foram lavadas com tampão de neutralização a cada 5 min, por três vezes. Depois de secas em posição inclinada as lâminas foram fixadas em etanol absoluto durante 10 min. Após todo o processo as lâminas foram armazenadas em refrigerador a 4-8°C até o momento de análise.

Para análise as lâminas foram coradas com *GelRed* (Uniscience) e cobertas com lamínulas e analisadas em microscópio de fluorescência, em objetiva de 40x, onde foram analisados 100 nucleóides por lâmina, totalizando 200 nucleóides por animal. A classificação de danos no DNA de cada nucleóide foi feita através de teste cego e estes danos classificados em 4 classes, de acordo com Kobayashi e colaboradores (1995), considerando-se o comprimento da cauda formada pelos fragmentos de DNA: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a de uma a duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. Com base nesta classificação foram calculados os escores de danos para cada indivíduo, pela multiplicação do número de nucleóides encontrados para cada classe pelo número da classe, de acordo com a seguinte fórmula: $(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$, onde A, B, C e D correspondem ao número de nucleóides em cada uma das classes.

4.2.9. Biomarcadores fisiológicos

4.2.9.1. Biomarcadores hematológicos

Hematócrito

Parte do sangue retirado de cada animal foi colocada em tubo capilar heparinizado e centrifugado a 1200 g, durante 5 min, em centrífuga de

microhematócrito, para a separação das células sanguíneas do plasma para a estimativa dessas células em porcentagem.

RBC

Um volume de 5 μL de sangue foi adicionado a um tampão formol citrato (citrato de sódio diluído em solução de 0,4% de formol) para posterior contagem do número eritrócitos (RBC), em câmara de Neubauer em microscópio óptico. O resultado foi expresso em nº de células por milímetro cúbico de sangue ($\text{n}^\circ \text{ céls mm}^{-3}$).

Hemoglobina

O conteúdo de hemoglobina de cada animal foi estimado através do método colorimétrico com cianeto da meta-hemoglobina (HiCN), utilizando-se um kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil), em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm (Libra S32, Biochrom). O resultado do conteúdo de hemoglobina foi expresso em gramas por decilitro (g dL^{-1}).

4.2.9.2. Osmolalidade plasmática

A osmolalidade do plasma sanguíneo foi determinada através do ponto de congelamento de cada amostra em osmômetro (Osmomat, 030, Gonotec, Alemanha) e os resultados foram expressos em mOsm kg^{-1} .

4.2.9.3. Glicose plasmática

A quantidade de glicose presente no plasma foi determinada pelo método da glicose oxidase, utilizando-se um kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro de microplacas (em comprimento de onda de 505 nm, Victros 3, Perkin Elmer, USA). Os resultados foram expressos em mg dL^{-1} .

4.3. Análises Estatísticas

Para todas as análises foi feita a média dos valores obtidos para cada biomarcador, para cada grupo, e foram feitas comparações entre os grupos experimentais (CTR X Zn 0,2 X Zn 2). Para estas comparações foi utilizada análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Teste de Kruskal-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade de homogeneidade de variância), seguido por teste de comparações múltiplas (Teste de Student-Newman-Keuls ou Dunn's), para a localização das diferenças. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

4.4. Resultados

4.4.1. Parâmetros físicos e químicos da água

Os parâmetros físicos e químicos da água durante o período de aclimação foram analisados a cada 24 horas; durante o período amostral as medidas destes parâmetros foram feitas no início e final do experimento e os resultados estão descritos na Tabela 1. Os valores de temperatura, pH, OD, condutividade, turbidez, sólidos dissolvidos, carbono orgânico dissolvido (COD) e dureza não apresentaram diferenças entre os grupos. Sendo importante ressaltar a baixa concentração de COD e o baixo valor de dureza encontrados em todos os grupos experimentais, indicando assim provavelmente uma grande disponibilidade de Zn na água.

Depois de 24 h que o sulfato de zinco ($ZnSO_4$) foi adicionado à água, a exposição dos juvenis de *P. lineatus* teve início. Amostras de água para quantificação de zinco foram coletadas no início e no fim do período experimental (Tabela 2).

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos da água do tanque de aclimação e dos aquários dos testes, contendo apenas água desclorada (CTR), 0,2 mg L⁻¹ de Zn (Zn 0,2) e 2 mg L⁻¹ de Zn (Zn 2).

	Aclimação	CTR	Zn 0,2	Zn 2
Temperatura (°C)	22,89 ± 0,33	21,99 ± 0,19	22,10 ± 0,14	22,27 ± 0,13
pH	7,37 ± 0,16	7,28 ± 0,32	7,11 ± 0,28	6,89 ± 0,30
Oxigênio Dissolvido (mg L⁻¹)	7,69 ± 0,27	7,00 ± 0,59	6,63 ± 0,20	7,10 ± 0,29
Condutividade (µS cm⁻¹)	120 ± 1,98	101 ± 0,88	103 ± 1,44	111 ± 1,40
Turbidez (NTU)	0,12 ± 0,01	0	0	0
Sólidos dissolvidos (g L⁻¹ TDS)	0,08 ± 0,001	0,07 ± 0,001	0,07 ± 0,001	0,07 ± 0,001
Carbono orgânico dissolvido (mg L⁻¹)	-	1,81 ± 0,18	1,80 ± 0,17	1,76 ± 0,15
Dureza (mg CaCO₃ L⁻¹)	-	35,7	30,6	40,8

Valores representam as médias ± EP (n = 10-24).

Tabela 2 – Concentração de zinco total e dissolvido na água dos aquários do grupo controle (CTR) e dos aquários contendo 0,2 mg L⁻¹ de Zn (Zn 0,2) e 2 mg L⁻¹ de Zn (Zn 2). As amostras de água foram coletadas no início e no final da exposição dos peixes.

CONCENTRAÇÃO DE Zn (mg L⁻¹)				
	Inicial Zn Total	Inicial Zn Dissolvido	Final Zn Total	Final Zn Dissolvido
CTR	0,031 ± 0,020	0,022 ± 0,018	0,015 ± 0,022	0,011 ± 0,026
Zn 0,2	0,161 ± 0,025	0,126 ± 0,012	0,135 ± 0,011	0,118 ± 0,030
Zn 2	1,727 ± 0,041	1,617 ± 0,038	1,656 ± 0,008	1,576 ± 0,027

Valores representam as médias ± EP (n = 5).

4.4.2. Bioacumulação

Nenhum tecido analisado dos peixes do grupo Zn 0,2, apresentou diferença significativa na concentração de Zn em relação ao controle (Fig. 10). Já os animais do grupo Zn 2 apresentaram maior concentração de Zn no sangue (Fig. 10 A) ($P = 0,005$, ANOVA), músculo (Fig. 10 C) ($P = 0,017$, Kruskal-Wallis) e

fígado (Fig. 10 E) ($P < 0,001$, ANOVA) quando comparados aos animais do grupo CTR. As brânquias (Fig. 10 B) ($P = 0,934$, ANOVA), cérebro (Fig. 10 D) ($P = 0,260$, Kruskal-Wallis) e rins (Fig. 10 F) ($P = 0,985$, ANOVA) não apresentaram variação significativa na concentração de zinco, quando comparados com o grupo CTR.

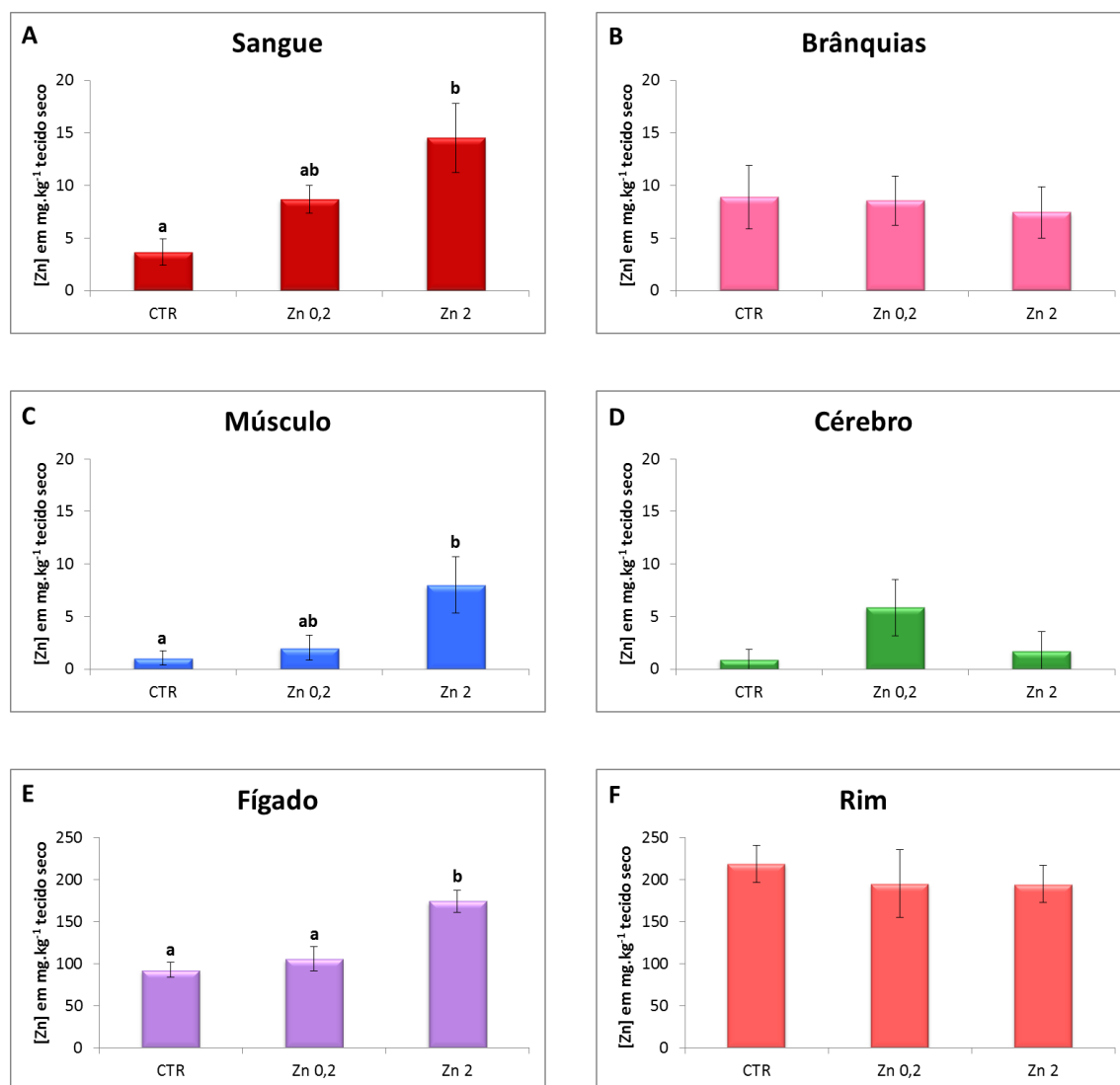


Figura 10: Concentração de zinco (média \pm EP, n = 6-8) em sangue (A), brânquias (B), músculo (C), cérebro (D), fígado (E) e rim (F) de *Prochilodus lineatus* expostos ao Zn nas concentrações 0,2 mg L⁻¹ (Zn 0,2) e 2 mg L⁻¹ (Zn 2) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). As escalas do eixo Y não são as mesmas para todos os gráficos.

4.4.3. Biomarcadores bioquímicos

4.4.3.1. Formação de ERO e CAOT

Após as 24 h de exposição não ocorreu alteração na quantidade de espécies reativas de oxigênio encontradas no fígado (Fig. 11 A) de *P. lineatus* ($P = 0,079$, Kruskal-Wallis) apesar da nítida tendência de menos ERO no grupo Zn 2. A capacidade antioxidante total medida em fígado (Fig. 11 B) também não apresentou diferença entre os grupos ($P = 0,235$, ANOVA).

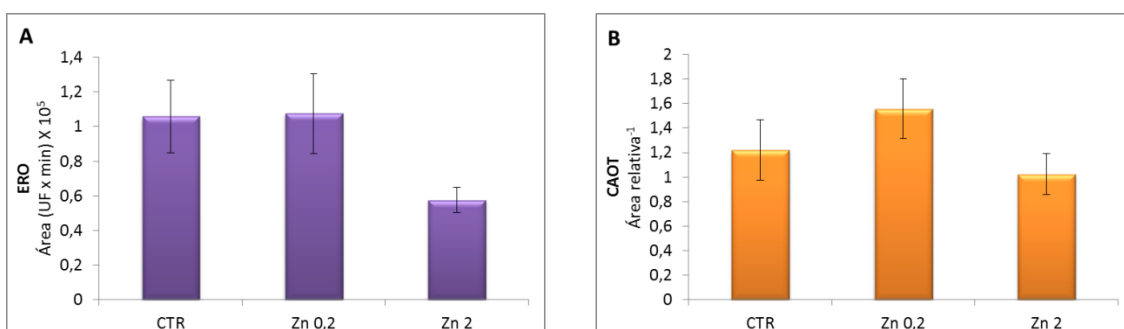


Figura 11: Quantidade (média \pm EP, $n = 6-7$) de espécies reativas de oxigênio (ERO) (A) e capacidade antioxidante total (CAOT) (B) em fígado de *Prochilodus lineatus* expostos ao Zn nas concentrações $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn 0,2) e 2 mg L^{-1} (Zn 2) ou apenas à água (CTR).

4.4.3.2. GSH

A concentração de GSH foi significativamente maior no fígado dos animais do grupo Zn 2 ($P = 0,031$, ANOVA), quando comparados com fígados de animais CTR (Fig. 12 A). Porém, nas brânquias (Fig. 12 B) esta diferença ocorreu nos animais do grupo Zn 0,2 ($P = 0,044$, ANOVA), voltando a se igualar ao CTR no grupo Zn 2.

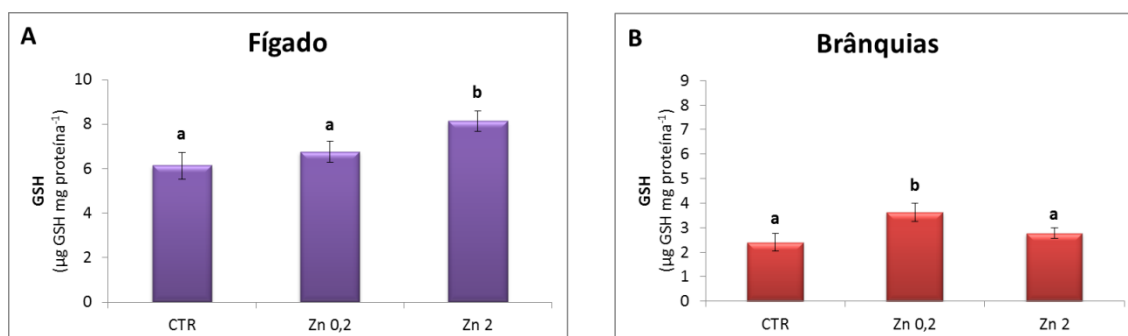


Figura 12: Conteúdo de GSH (média \pm EP, $n = 6-8$) no fígado (A) e brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* expostos ao Zn nas concentrações $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn 0,2) e 2 mg L^{-1} (Zn 2) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

4.4.3.3. LPO

A quantidade de MDA, em fígado (Fig. 13 A) e nas brânquias (Fig. 13 B) não apresentou alteração significativa em nenhum dos grupos expostos ao zinco, sendo $P = 0,091$ (ANOVA) em fígado e $P = 0,214$ (ANOVA) nas brânquias.

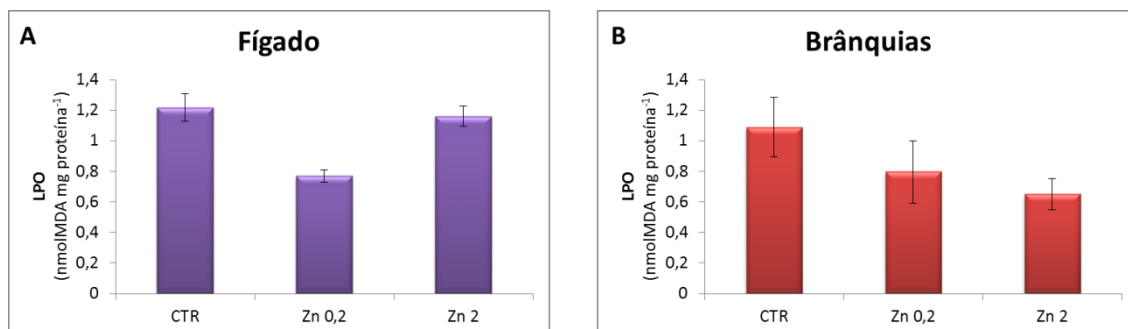


Figura 13: Conteúdo de MDA (média \pm EP, $n = 7-8$) no fígado (A) e brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* expostos ao Zn nas concentrações $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn 0,2) e 2 mg L^{-1} (Zn 2) ou apenas à água (CTR).

4.4.3.4. PCO

O conteúdo de proteínas carboniladas no fígado (Fig. 14 A) foi significativamente maior nos peixes dos grupos Zn 0,2 e Zn 2, em relação ao CTR ($P = 0,003$, ANOVA). Porém nas brânquias (Fig. 14 B) não foi verificada alteração significativa da PCO entre os grupos ($P = 0,272$, ANOVA).

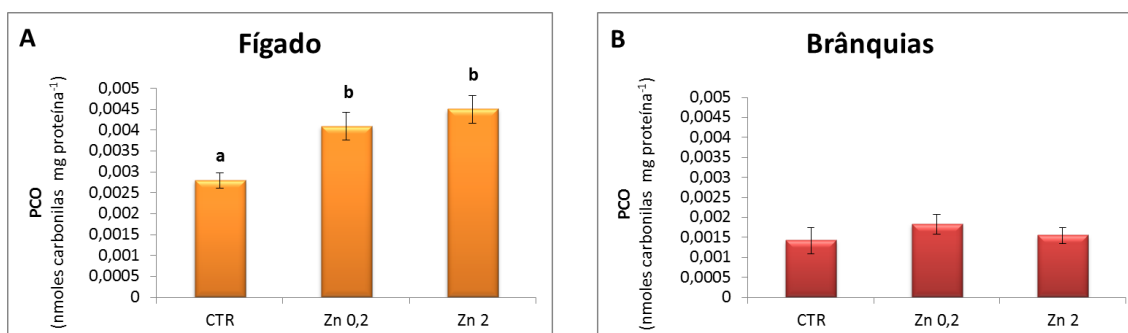


Figura 14: Conteúdo de proteínas carboniladas (média \pm EP, $n = 6-8$) no fígado (A) e brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* expostos ao Zn nas concentrações $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn 0,2) e 2 mg L^{-1} (Zn 2) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

4.4.3.5. PSMT

O conteúdo de proteínas semelhantes às metalotioneínas no fígado (Fig. 15 A) apresentou um aumento significativo no grupo Zn 2 quando comparado com os outros dois grupos ($P = 0,005$, ANOVA), resultado também observado nas

brânquias (Fig. 15 B) ($P = 0,009$, ANOVA). Já os rins (Fig. 15 C), estes não apresentaram alterações significativas na quantidade de PSMT ($P = 0,634$, ANOVA).

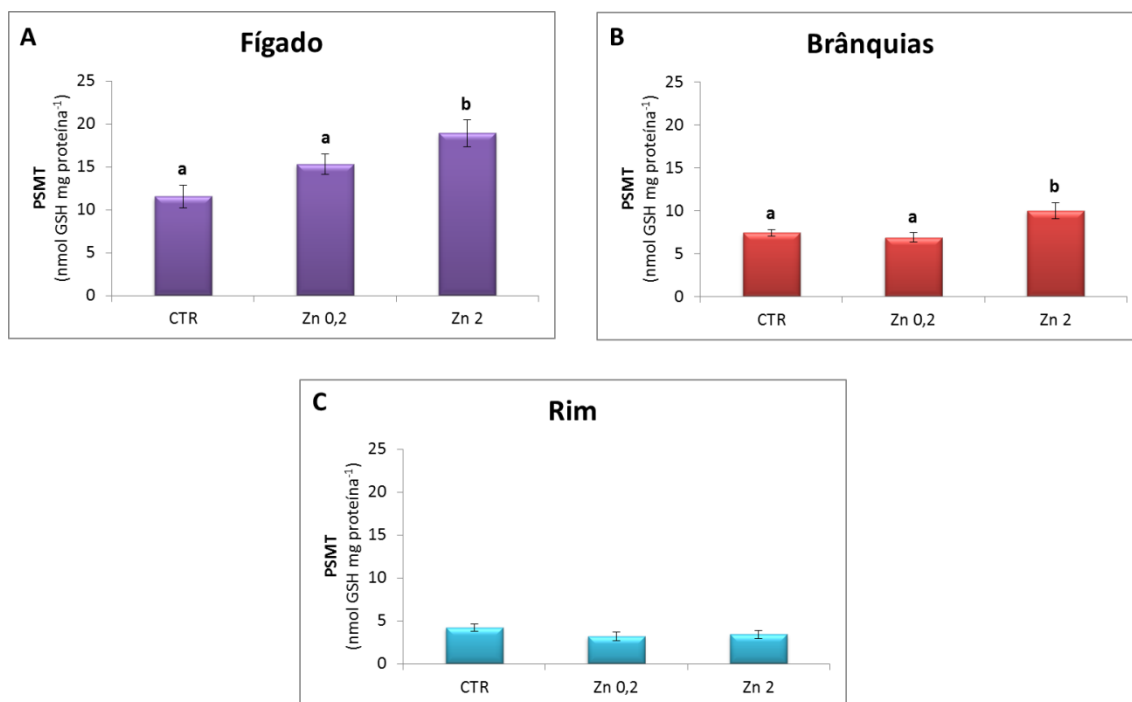


Figura 15: Conteúdo de PSMT (média \pm EP, $n = 6-8$) no fígado (A), brânquias (B) e rim (C) de *Prochilodus lineatus* expostos ao Zn nas concentrações $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn 0,2) e 2 mg L^{-1} (Zn 2) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

4.4.3.6. AChE

Não foram verificadas alterações significativas na atividade da acetilcolinesterase em músculo (Fig. 16 A) ($P = 0,232$, ANOVA) e em cérebro (Fig. 16 B) ($P = 0,252$, ANOVA) entre os grupos analisados.

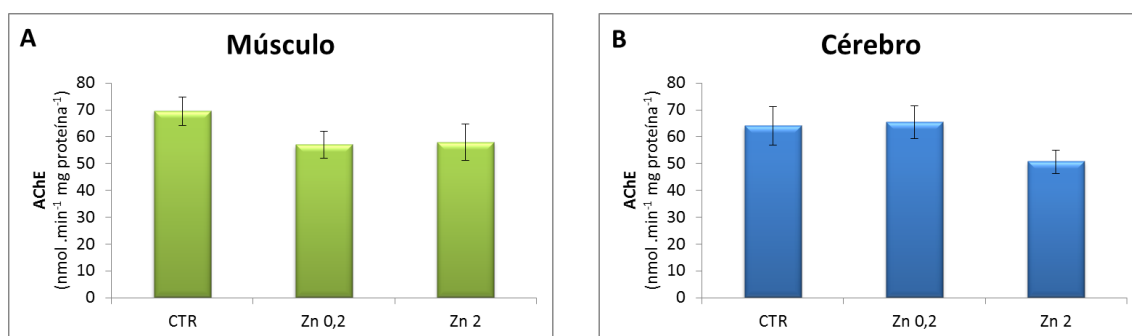


Figura 16: Atividade da acetilcolinesterase (média \pm EP, $n = 7-8$) no cérebro (A) e músculo (B) de *Prochilodus lineatus* expostos ao Zn nas concentrações $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn 0,2) e 2 mg L^{-1} (Zn 2) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

4.4.4. Biomarcador genotóxico: Ensaio do Cometa

Verificou-se escore de danos no DNA (Fig. 17) significativamente maior nos eritrócitos dos animais dos grupos Zn 0,2 e Zn 2 em relação ao CTR ($P < 0,001$, ANOVA). O número de nucleóides danificados e suas classes estão representados na Tabela 3.

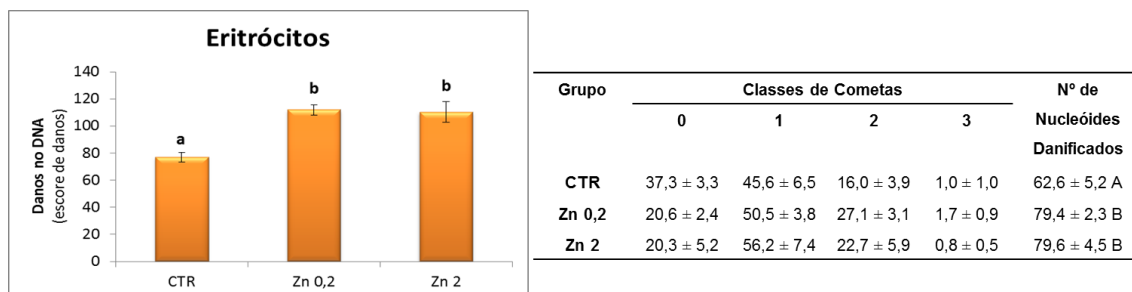


Figura 17: Escore de danos no DNA e número de nucleóides em cada de classe de cometa e número total de nucleóides danificados (média ± EP, n = 6-8) em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* expostos ao Zn nas concentrações 0,2 mg L⁻¹ (Zn 0,2) e 2 mg L⁻¹ (Zn 2) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

4.4.5. Biomarcadores fisiológicos

4.4.5.1. Biomarcadores hematológicos

Na Figura 18 estão representados os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros hematológicos. Os animais do grupo Zn 0,2 apresentaram valores de Hct significativamente maiores em relação aos demais grupos ($P < 0,001$, ANOVA). Os demais parâmetros hematológicos, RBC ($P = 0,652$, ANOVA) e conteúdo de hemoglobina ($P = 0,41$, ANOVA) não apresentaram variações significativas entre os grupos.

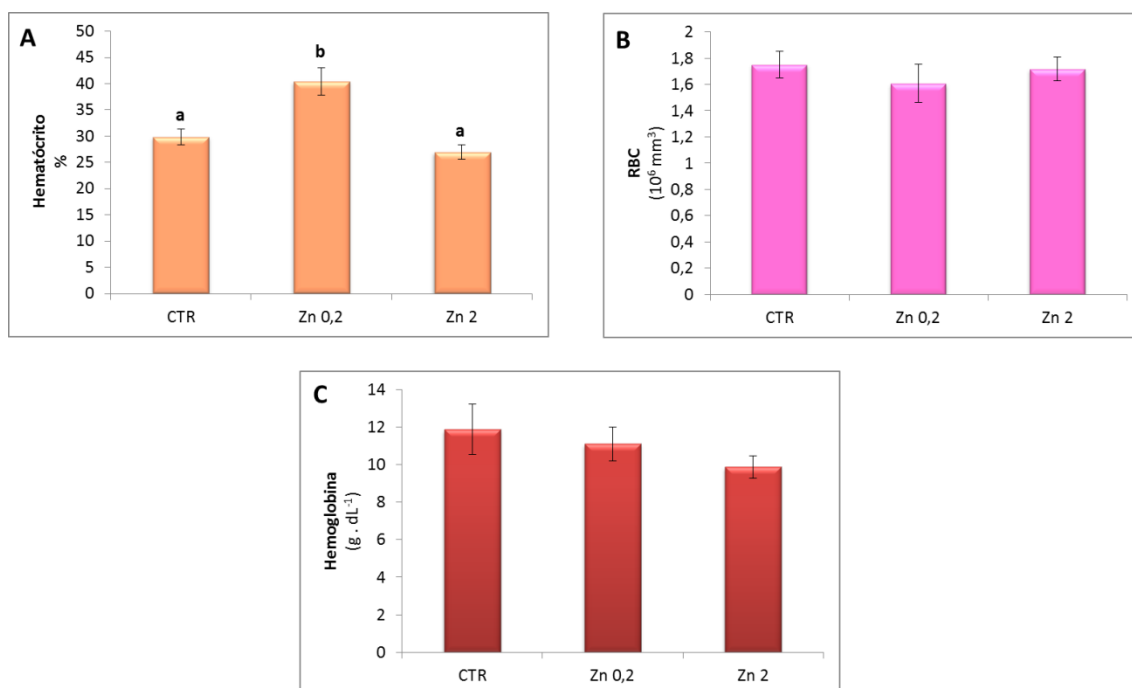


Figura 18: Parâmetros hematológicos (média \pm EP, n = 7-8) de *Prochilodus lineatus* expostos ao Zn nas concentrações 0,2 mg L⁻¹ (Zn 0,2) e 2 mg L⁻¹ (Zn 2) ou apenas à água (CTR): hematócrito (A), número de células vermelhas (B) e concentração de hemoglobina (C). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

4.4.5.2. Osmolalidade plasmática

Decorridas as 24 h de exposição, apenas os animais do grupo Zn 0,2, apresentaram valores de osmolalidade plasmática significativamente maiores ($P < 0,001$, ANOVA) quando comparados ao CTR (Fig. 19).

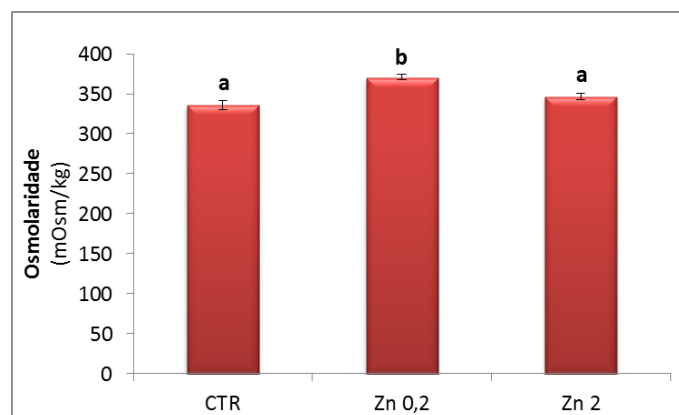


Figura 19: Osmolalidade do plasma sanguíneo (média \pm EP, n = 6) de *Prochilodus lineatus* expostos ao Zn nas concentrações 0,2 mg L⁻¹ (Zn 0,2) e 2 mg L⁻¹ (Zn 2) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

4.4.5.3. Glicose plasmática

A concentração de glicose plasmática (Fig. 20) não variou significativamente entre os grupos experimentais ($P = 0,474$, Kruskal-Wallis).

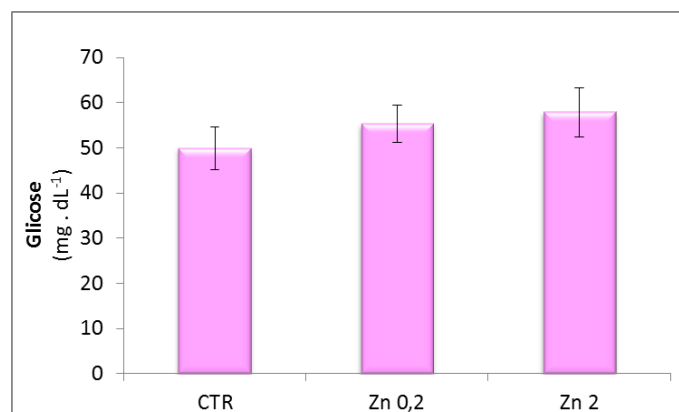


Figura 20: Glicose plasmática (média \pm EP, $n = 7-8$) de *Prochilodus lineatus* expostos ao Zn nas concentrações $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn 0,2) e 2 mg L^{-1} (Zn 2) ou apenas à água (CTR).

4.5. Discussão

As concentrações de Zn utilizadas no presente trabalho refletem as condições que podem ser encontradas no ambiente natural, visto que estão dentro da faixa de concentrações máximas permitidas para este metal pela legislação brasileira (CONAMA, 2005). Normalmente, a maior parte do Zn disponível em água doce se encontra na forma de Zn^{2+} , constituindo cerca de 30% do Zn dissolvido em água doce, possuindo alta biodisponibilidade, estando, portanto passível de absorção pelos animais (Hogstrand, 2012). Assim, pode-se concluir que, devido às concentrações próximas de Zn total e dissolvido encontradas neste trabalho e ao fato de que a maior parte deste estivesse provavelmente na forma de Zn^{2+} , este provavelmente se encontrava biodisponível, passível de absorção pelos peixes expostos e com capacidade de causar efeitos sobre eles.

Normalmente a concentração de Zn encontrada em diversos órgãos de peixes pode variar entre 10 e 40 mg kg^{-1} de massa úmida (Hogstrand, 2012). A legislação brasileira (ANVISA, 1965) prevê um máximo de 50 mg kg^{-1} de Zn no pescado e outros alimentos, assim a quantidade de Zn presente nos tecidos de *P. lineatus* não pode ultrapassar este limite, para que a saúde humana não seja prejudicada. No presente trabalho, verificou-se um aumento na concentração do Zn no fígado dos peixes, que vai de encontro com o esperado, devido ao seu importante papel na detoxificação do organismo e potencial de bioacumulação de

metais (Cogun et al., 2006). Independente da rota de entrada do metal no organismo, o fígado é o órgão alvo da sua acumulação (Jeziarska e Witeska, 2006). Além disso, frente a um possível desencadeamento na produção de ERO e consequente oxidação celular, o próprio organismo pode gerar uma liberação de Zn, que acaba se concentrando no fígado (Kozlowski et al., 2009), corroborando assim os resultados do presente estudo e justificando a utilização deste órgão nas outras análises realizadas neste estudo. O aumento na concentração de Zn também já foi observado no fígado do peixe *Carassius auratus* após exposição ao Zn na concentração de 0,1 mg Zn L⁻¹ (Qu et al., 2014). Além do fígado, Loro e colaboradores (2014) encontraram maior concentração de Zn em plasma sanguíneo, brânquias, intestino e carcaça de *Fundulus heteroclitus* expostos à concentração de 0,5 mg Zn L⁻¹, justificando assim a utilização de diversos órgãos para a realização da quantificação do Zn. Juntamente com o fígado, os rins são os órgãos que possuem naturalmente maior quantidade de Zn em peixes (Begum, 2009), também foi verificado para o rim de *P. lineatus*, que foi o órgão que apresentou as maiores concentrações de Zn. Entretanto, o rim não apresentou aumento na concentração de Zn após a exposição ao metal, sendo possível então que o Zn tenha sido excretado em taxas tão altas como as de absorção, através de uma maior produção de urina, controlando as quantidades presentes de Zn dentro do organismo e nos rins.

Em peixes, tradicionalmente, o aumento na concentração de metais ocorre primeiramente nas brânquias, pois este órgão constitui a principal via de entrada de metal no organismo, tanto através de transportadores específicos como através da competição do Zn²⁺ com o Ca²⁺ nos canais de cálcio presentes nas membranas das células branquiais (Hogstrand, 2012). Esta competição pode trazer diversos danos ao organismo, sendo o principal deles a instauração de hipocalcemia nos organismos, podendo prejudicar a integridade das membranas celulares e a estabilização da permeabilidade branquial, sendo capaz de levar os animais à morte (Herskowitz e Helguero, 1998). Porém, visto a mesma quantidade de Zn em brânquias de animais expostos ou não ao Zn conclui-se que, apesar de ter sido absorvido através das brânquias, o Zn foi rapidamente transferido, tanto para o meio externo como, principalmente para o sangue dos animais, através também de transportadores específicos que estão presentes nas membranas basolaterais (Hardy et al., 1987; Hogstrand, 2012). Devido ao rápido transporte do Zn para a circulação houve aumento na concentração deste metal no sangue dos

peixes expostos ao Zn, verificado no presente trabalho, e, através dele, o zinco foi distribuído por todo o organismo. Porém não se conhece uma proteína presente no sangue responsável pelo transporte do Zn, sendo que este é realizado através de um complexo conjunto de transportadores (Hogstrand, 2012). Uma vez que foram encontradas maiores concentrações de Zn no músculo dos peixes expostos ao metal deve-se ter atenção especial, pois a espécie aqui estudada tem importância comercial e alimentícia para a população, pois é esta parte do animal que é consumida. Assim, testes de maior duração e até mesmo com maior concentração de zinco são necessários para que se verifique se a quantidade acumulada de zinco no músculo destes animais não ultrapasse o limite permitido pela ANVISA, igual a 50 mg kg^{-1} de massa úmida. Quanto ao cérebro, a presença de canais específicos que são altamente regulados presentes na barreira hematoencefálica (Colvin et al., 2003) podem ter sido responsáveis pela manutenção das concentrações de Zn inalteradas neste órgão.

A exposição de organismos aquáticos a metais pode causar a formação de ERO e levar ao organismo o estabelecimento de um estresse oxidativo (Roméo et al., 2000). O aumento na formação de ERO pela exposição ao contaminante pode ter diversos resultados no organismo, como a lipoperoxidação, danos em proteínas e quebras no DNA (Halliwell e Gutteridge, 2005). Como um metal essencial, o zinco tem sua concentração interna rigidamente regulada naturalmente pelo organismo (Bury et al., 2003; Hogstrand, 2012), assim, os danos causados pela exposição de peixes a ele ocorrem provavelmente de forma indireta, como pela instauração do estresse oxidativo (Loro et al., 2012). Apesar do papel conhecido do zinco na defesa contra as ERO em concentrações normais, quando presente em concentrações altas pode ter seu papel invertido, passando assim a ele próprio causar um estresse oxidativo (Chung et al., 2005). Apesar de não ter sido encontrada diferença entre a quantidade de ERO presente no fígado de animais expostos ou não ao zinco, pôde-se observar uma tendência de menor concentração destas no grupo Zn 2 ($P = 0,079$), que ocorreu, provavelmente, devido à ação das defesas antioxidantes do organismo, que foram, portanto suficientes no combate às ERO formadas, apesar de não ter sido observado aumento na CAOT. Assim pode-se concluir que algumas defesas podem ter sido ativadas, como GSH, e outras não (Hermes-Lima, 2004), que não foram quantificadas no presente trabalho. Outra explicação para o ocorrido seria a de que este ensaio detecta apenas radicais peróxido (ROO^{\cdot}) (Amado et al., 2009) e o

combate a ele, assim, se houve formação e combate a outras espécies reativas este ensaio não foi capaz de detectar.

A glutatona (GSH) é o principal tiol não proteico citosólico e um importante componente do sistema de defesa antioxidante das células, pois através de sua ligação com as ERO, a GSH é capaz de neutralizá-las, impedindo assim possíveis danos celulares (Meister e Anderson, 1983; Hermes-Lima, 2004). Além deste papel como o principal antioxidante não enzimático, a GSH também pode se ligar diretamente aos metais, que podem causar estresse oxidativo no organismo (Stohs e Bagchi, 1995). Acredita-se que a GSH tem sua síntese aumentada na presença de metais, visto que alguns estudos demonstraram um aumento da sua concentração dose e tempo dependentes (Ali et al., 2004). O maior conteúdo de GSH em fígado e brânquias de *P. lineatus* expostos ao zinco sustentam a ideia de aumento de síntese de GSH para a proteção contra a ação das ERO e também contra íons de zinco livres no citoplasma das células, evitando que estes causem danos em diversos compartimentos celulares. Este aumento de GSH poderia explicar a tendência de diminuição de ERO encontrada no fígado, sendo provavelmente a defesa antioxidante mais estimulada no organismo.

O estresse oxidativo pode ter diversos efeitos, podendo ser medido, por exemplo, através da lipoperoxidação lipídica (Oakes e Vander Kraak, 2003). Porém no presente estudo não foi observada alteração na LPO medida pelo ensaio TBARS. Estes resultados corroboram os resultados do estudo de Gioda e colaboradores (2007), no qual a exposição de *Leporinus obtusidens* a 2,3 mg Zn L⁻¹ por 15 dias também não causou alteração na concentração de MDA no fígado dos peixes expostos ao metal. Entretanto, quando o período de exposição foi aumentado para 30 dias a LPO sofreu um aumento, indicando que esta alteração está associada com o tempo de exposição dos animais (Gioda et al., 2007). Assim a atuação da GSH e de outras defesas antioxidantes se mostraram eficientes na proteção do animal à curta exposição ao Zn, impedindo danos nas membranas celulares que poderiam ter sido causados pela peroxidação dos lipídeos.

Apesar de não ter ocorrido LPO, outro tipo de dano oxidativo foi observado neste estudo, com a ocorrência significativamente maior de oxidação de proteínas no fígado dos animais expostos às duas concentrações de Zn. Estes resultados indicam que as defesas antioxidantes não foram capazes de impedir todos os danos oxidativos que a exposição ao Zn é capaz de promover sobre *P. lineatus*. A oxidação de proteínas pode ocorrer devido, principalmente, à oxidação

catalisada por metal (Requena et al., 2003), justificando assim sua maior concentração. Uma maior quantidade de PCO também já foi evidenciada em outros estudos de exposição de peixes ao Zn, como descrito por Loro e colaboradores (2012), no qual as proteínas carboniladas tiveram maior concentração em brânquias, fígado, intestino e músculo de *F. heteroclitus*. Devido a mudança conformacional nas proteínas oxidadas o organismo pode apresentar perda de função de algumas delas, prejudicando seu metabolismo.

A glutathione e as metalotioneínas (MTs) são as principais moléculas de ligação de Zn presentes no citosol das células (Colvin et al., 2008) e têm sua importância aumentada quando os peixes são expostos a uma concentração elevada de Zn (Hogstrand, 2012). No geral, os metais, quando dentro das células podem se ligar a metalotioneínas que tem sua síntese induzida pela exposição a estes (Olsson, 1993) como cobre, mercúrio, cádmio e zinco (Hogstrand, 2012). Esta indução pode ser um mecanismo do organismo de conferir resistência ao metal presente no meio (Hamilton e Mehrle, 1986; Hogstrand, 2012). No caso do Zn, acredita-se que primeiramente ele se liga à GSH, e quando esta se torna escassa o metal passa a se ligar às MTs, aumentando a capacidade da célula eliminar o excesso de Zn (Hogstrand e Wood, 1996). A maior concentração de PSMT encontrada no fígado e brânquias reflete uma relação concentração dependente do Zn na água, e mostram como os níveis de Zn estão relacionados à MT, provavelmente devido ao fato dessa proteína estar relacionada à regulação homeostática dos metais, como Zn e Cu (O'Halloran e Culotta, 2000). As MTs são responsáveis não apenas pela detoxificação de metais traço, mas também participam ativamente na proteção das células contra o dano causado pelo estresse oxidativo (Cai e Cherian, 1996; Cai et al., 1999). Análises de mecanismos de ação de MTs com superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radicais hidroxil ($HO\cdot$) tem demonstrado uma possível ação antioxidante das MTs contra vários danos causados por espécies reativas de oxigênio *in vitro* e *in vivo* (Cai et al., 1999; Kang, 1999). Assim, com o aumento da concentração de zinco na água à que os organismos foram expostos, maior foi a quantificação de MTs, pois em altas concentrações deste metal elas são induzidas para as funções descritas, justificando o aumento encontrado destas proteínas no fígado e brânquias dos animais do grupo Zn 2.

Outro biomarcador bioquímico utilizado neste estudo foi a atividade da AChE, que tem como função a quebra da acetilcolina na fenda sináptica em colina e ácido acético (Van der Oost et al., 2003). A ação inibidora da AChE por

organoclorados e carbamatos já é bem conhecida (Ferrari et al., 2007), porém metais também podem causar alteração na atividade da AChE, como já foi relatado por Frasco e colaboradores (2005). Considerando-se a ausência de alteração na atividade desta enzima no presente estudo e os relatos contraditórios sobre os efeitos dos metais sobre a ação desta (Frasco et al., 2005), são necessários mais estudos com exposição a metais para o real entendimento da ação destes sobre a atividade da acetilcolinesterase em peixes. Porém podemos afirmar que em *P. lineatus* o Zn não foi capaz de alterar sua funcionalidade, pois apesar de ter sido encontrado em maiores concentrações no tecido, como demonstrado no músculo de peixes expostos ao grupo Zn 2, a atividade da AChE não foi modificada. Já no cérebro o Zn pode não ter conseguido ultrapassar a barreira hematoencefálica, como já citado, e assim não causou efeitos neste órgão.

Frenzili e colaboradores (2004) propõem o grau de integridade do DNA como um indicador sensível de genotoxicidade de contaminantes a ser usado no monitoramento ambiental. Cerca de 90% dos danos no DNA são ocasionados devido às ERO (Riley, 1994) e várias alterações na estrutura do DNA podem ser causadas pelo ataque das ERO, como as quebras na molécula, perda de bases purínicas e modificações de bases (Hermes-Lima, 2004). Assim o aumento na concentração de MTs e GSH pode atuar na prevenção de danos no DNA de peixes expostos ao zinco e a outros metais traço. Apesar das defesas que foram ativadas em *P. lineatus*, foi observado aumento no escore de danos no DNA de eritrócitos dos peixes expostos ao Zn. Estes danos podem ter origem oxidativa, resultante da formação de ERO, indicando, portanto que o sistema de defesa antioxidante não foi suficiente. Mas os danos no DNA também podem ser consequência da ação direta do Zn em proteínas associadas ao DNA, como, por exemplo, através da carbonilação de proteínas, que foi verificada neste trabalho e que pode comprometer sua função. Resultados demonstrando a genotoxicidade do zinco já foram descritos em truta arco-íris por Bagdonas e Vosyliene (2006) e efeitos genotóxicos de diversos metais já foram observados em eritrócitos de *P. lineatus*, quando expostos ao alumínio (Galindo et al., 2010), ao chumbo (Monteiro et al., 2011) e ao níquel (Palermo et al., 2015). Vale ressaltar também que grande parte dos nucleóides danificados em todos os grupos foi de Classe 1, danos esses passíveis de reparo e considerados danos menos severos, pois muito dificilmente causam mutação ou são transferidos para prole (Tice et al., 2000).

A ausência de alteração na quantidade de eritrócitos no sangue de *P. lineatus* corrobora os resultados encontrados por Kori-Siakpere e colaboradores (2008) no peixe dulcícola *Heteroclaris* sp. exposto ao Zn na concentração de 5 mg Zn L⁻¹ e por Witeska e Kosciuk (2003) em carpas comuns expostas a 20 mg Zn L⁻¹. Resultado semelhante também foi encontrado por Bagdonas e Vosylienè (2006), assim como ausência de alteração no conteúdo de hemoglobina em truta arco-íris exposta ao Zn na concentração de 0,948 mg Zn L⁻¹ por 96 h. Já o maior valor de hematócrito nos peixes do grupo Zn 0,2 também já foi verificado por Flos e colaboradores (1987), que mostraram esse mesmo padrão de resposta em diferentes espécies de peixes expostas ao Zn. O aumento de hematócrito deve-se possivelmente ao inchaço dos eritrócitos devido ao aumento de dióxido de carbono no sangue, visto que o Zn é um elemento envolvido no controle da acidose sanguínea, relacionado com a atuação da enzima anidrase carbônica. Quando ocorre um desequilíbrio e a quantidade de dióxido de carbono (CO₂) no sangue aumenta, aumenta também a quantidade de íons H⁺, responsável pela acidificação sanguínea (Wood, 2012). Assim a exposição ao zinco pode causar alterações hematológicas devido ao desequilíbrio de pH.

De acordo com Heath (1995), diante de uma exposição a metais traço são frequentes alterações na regulação iônica de peixes. McGeer e colaboradores (2000) já descreveram a capacidade que o zinco possui, em altas concentrações, de causar distúrbios osmorregulatórios em organismos aquáticos. O aumento na osmolalidade plasmática de *P. lineatus* pode ter como explicação um aumento na perda de água através da urina, como citado anteriormente. Assim, devido ao esforço de eliminação do Zn excedente o animal acabou sofrendo uma perda significativa de água, acarretando no aumento de sua osmolalidade plasmática. Um aumento na quantidade de glicose plasmática também poderia explicar o aumento da osmolalidade, porém esta não foi observada. Estudos comprovam que a presença de metais como o zinco causa aumento da glicose presente no sangue, devido ao aumento na glicólise realizada pelo organismo com o intuito de suprir a nova exigência por energia do peixe. Hog (2014) mostrou que em exposição do peixe *Heteropneustes fossilis* a diversas concentrações de zinco levou a um aumento da glicose sanguínea proporcional ao aumento do período de exposição e também da concentração de Zn na água. Estudos com maior período de exposição devem ser realizados para verificação de ocorrência ou não de maior concentração de glicose no sangue de *P. lineatus* tempo-dependente.

Assim, com esse estudo pudemos observar danos causados pela exposição ao zinco a partir da concentração de $0,2 \text{ mg Zn L}^{-1}$, como ativação de elementos da defesa antioxidante como a GSH, danos causados pelo estresse oxidativo como oxidação de proteínas e danos no DNA. Com o aumento na concentração de zinco na água outros efeitos puderam ser verificados, como a maior concentração de Zn encontrada em músculo, sangue e fígado, a maior concentração de PSMT, atuando na defesa do organismo, e possível indução do sistema de defesa antioxidante, visto a menor concentração de ERO encontradas no organismo. O zinco também foi capaz de causar efeitos fisiológicos como aumento na osmolalidade e de porcentagem de hematócrito na menor concentração testada. Assim, pode-se concluir que o zinco, é capaz de causar diversos tipos de danos em juvenis de *P. lineatus* a partir da concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, e estes danos são agravados com a elevação da concentração para 2 mg L^{-1} , sendo necessária a revisão da legislação brasileira, visto que estas concentrações de Zn testadas se encontram dentro do permitido para as águas nacionais, não sendo adequadas para os organismos que habitam estes locais.

4.6. Referências

- Ali, M., Parvez, S., Pandey, S., Atif, F., Kaur, M., Rehman, H., Raisuddin, S. 2004. Flyash leachate induces oxidative stress in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environment International**. 30, 933-938.
- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Silva De Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C. A. 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 67, 82-88.
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monsserat, J.M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the total environment**. 407, 2115-2123.
- ANVISA. 1965. Limite máximo de tolerância de contaminantes inorgânicos em alimentos. **Decreto nº 55871**, 26 de março de 1965.
- Bagdonas, E., Vosylienè, M.Z. 2006. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) **Biologija**. 1, 8-13.
- Begum, A., Harikrishna, S., Khan, I. 2009. Analysis of Heavy metals in Water, Sediments and Fish samples of Madivala Lakes of Bangalore, Karnataka. **International Journal of ChemTech Research**. 1, 245-249.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. 61, 882-890.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72, 248-54.

- Bury, N.R., Walker, P.A., Glover, C.N. 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish. **Journal of Experimental Biology**. 206, 11-23.
- Cai, L., Cherian, M.G. 1996. Adaptive response to ionizing radiation-induced chromosome aberrations in rabbit lymphocytes: effect of pre-exposure to zinc, and copper salts. **Mutation Research**. 369, 233-241.
- Cai, L., Satoh, M., Tohyama, C., Cherian, M. G. 1999. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. **Toxicology**. 132, 85-98.
- Camargo, M.M., Fernandes, M.N., Martinez, C.B. 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**. 94, 40-46.
- Chung, M. J., Hogstrand, C., Lee, S. J. 2006. Cytotoxicity of nitric oxide is alleviated by zinc-mediated expression of antioxidant genes. **Experimental Biology and Medicine**. 231, 1555-1563.
- Chung, M.J., Walker, P.A., Brown, R.W., Hogstrand, C. 2005. Zinc mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 205, 225-236.
- Cogun, H.Y., Yuzereroglu, T.A., Firat, O., Gok, G., Kargin, F. 2006. Metal concentrations in fish species from the Northeast Mediterranean sea. **Environmental Monitoring and Assessment**. 121, 431-438.
- Colvin, R.A., Bush, A.I., Volitakis, I., Fontaine, C.P., Thomas, D., Kikuchi, K., Holmes, W.R. 2008. Insights into Zn²⁺ homeostasis in neurons from experimental and modeling studies. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. 294, 726-742.
- Colvin, R.A., Fontaine, C.P., Laskowski, M., Thomas, D. 2003. Zn²⁺ transporters and Zn²⁺ homeostasis in neurons. **European Journal of Pharmacology**. 479. 171-185.
- CONAMA. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. **Resolução Nº 357** de 17 de março de 2005.
- Dragun, Z., Podrug, M., Raspor, B. 2009. Combined use of bioindicators and passive samplers for the assessment of river water contamination with metals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 57 (2), 211-220.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, J.R.V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. 7, 88-95.
- Farag, A. M., Skaar, D., Nimick, D. A., Macconnell, E., And Hogstrand, C. 2003. Characterizing aquatic health using salmonid mortality, physiology, and biomass estimates in streams with elevated concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, and zinc in the Boulder River watershed. Montana. **Transactions of the American Fisheries Society**. 132, 450-467.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R. D. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**. 84, 415-430.
- Ferrari, A., Venturino, A., D'Angelo, A.M.P. 2007. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**. 146, 308-313.
- Flos, R., Tort. L., Balacch, J. 1987. Effects of Zinc Sulphate on haematological parameters in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*) and Influence off MS 222. **Marine Environmental Research**. 2, 289-298.

- Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. **Biomarkers**. 10, 360-375.
- Frenzili, G., Scarcelli, V., Barga, I., Nigro, M., Forlin, L., Bolognesi, C., Sturve, J. 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbor. **Mutation Research**. 552, 187-195.
- Galindo, B.A., Troilo, G., Cólus, I.M.S., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H. 2010. Genotoxic effects of Aluminum on the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*. **Water, Air, & Soil Pollution**. 212, 419-428.
- Gioda, C.R., Lissner, L.A., Preto, A., Da Rocha, J.B.T., Schetinger, M.R.C., Neto, J.R., Morsch, V.M., Loro, V.L. 2007. Exposure to sublethal concentrations of Zn(II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. **Chemosphere**. 69, 170-175.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2005. **Free Radicals in Biology and Medicine**, third ed. Clarendon Press, Oxford.
- Hamilton, S.J., Mehrle, P.M. 1986. Metallothionein in fish, review of its importance in assessing stress from metal contaminants. **Transactions American Society For Artificial Internal Organs**. 115, 596-609.
- Hardy, R. W., Sullivan, C. V., and Koziol, A. M. 1987. Absorption, body distribution, and excretion of dietary zinc by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Fish Physiology and Biochemistry**. 3, 133-143.
- Heath, A.G. 1995. **Water pollution and fish physiology**, second ed. CRC Press, Lewis publishers. 342p.
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: Storey, K.B. (Eds.) **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**, John Wiley and Sons, New York, pp.319-368.
- Herskowitz, J., Helguero, L. A. 1998. Copper toxicity and copper-zinc interactions in amphibians embryos. **Science of the Total Environment**. 221, 1-10.
- Hog, H. 2014. Effects of sublethal concentration of Zinc II sulphate heptahydrate ($Zn SO_4 \cdot 7 H_2O$) on blood glucose level of fresh water fish *Heteropneustes fossilis*. **International Journal of Scientific Technology Research**. 3(5),128-131.
- Hogstrand, C. 2012. Zinc. In: Wood, C., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds). **Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essencial Metals**. Academic Press, pp. 135-200.
- Hogstrand, C., Wood, C. M. 1996. The physiology and toxicology of zinc in fish. In: Taylor, E.W. **Toxicology of Environmental Pollution - Physiological, Molecular, and Cellular Approaches**. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 61-84.
- IBRAM (Instituto Brasileiro de Mineração). 2012. **Informações e análises da economia mineral brasileira**, Seventh ed. 65p.
- ICZ - Instituto de Metais não Ferrosos. **Estatísticas do Zinco – 2012**. Disponível em: <http://www.icz.org.br/estatisticas-dos-metais-2012.php> Acesso em 15 dez. 2014.
- Jezierska, B., Witeska, M. 2001. Metal Toxicity to Fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. 11, 279.
- Kang, Y. J. 1999. The antioxidant function of metallothionein in the heart. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. 222, 263-273.
- Kimura, T., Itoh, N., Andrews, G. K. 2009. Mechanisms of heavy metal sensing by metal response element-binding transcription factor-1. **Journal of Health Science**. 55 (4), 484-494.

- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T.A. 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Comum**, 3, 103-115.
- Kori-Siakpere, O., Oghoghene, U.E. 2008. Sublethal haematological effects of zinc on the freshwater fish, *Heteroclaris* sp. (Osteichthyes: Clariidae). **African Journal of Biotechnology**. 7, 2068-2073.
- Kozłowski, H., Janicka-Kłos, A., Brasun, J., Gaggelli, E., Valensin, D., Valensin, G. 2009. Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). **Coordination Chemistry Reviews**. 253, 2665-2685.
- Landner, L., Lindstrom, L. 1998. Zinc in society and in the environment. **Swedish Environmental Research Group (MFG)**. pp. 160.
- Loro, V.L., Jorge, M.B., Da Silva, K.R., Wood, C.M. 2012. Oxidative stress and antioxidant response to sublethal waterborne zinc in a euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: protective effects of salinity. **Aquatic Toxicology**. 110-111, 187-193.
- Loro, V.L., Nogueira, L., Nadella, S.R., Wood, C.M. 2014. Zinc bioaccumulation and ionoregulatory impacts in *Fundulus heteroclitus* exposed to sublethal waterborne zinc at different salinities. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. 166, 96-104.
- Luoma, S. N., Rainbow, P. S. 2008. **Metal Contamination in Aquatic Environments: Science and Lateral Management**. Cambridge University Press, New York, pp. 588.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: iono-regulatory disturbance and metabolic costs. **Aquatic Toxicology**. 50, 231-243.
- Meister, A., Anderson, M.E. 1983. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**. 52, 711-760.
- Monserrat, J.M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. 146, 221-234.
- Monteiro, V., Cavalcante, D.G., Viléla, M.B., Sofia, S.H., Martinez, C.B. 2011. *In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**. 104, 291-298.
- Nascimento, C.R., Souza, M.M., Martinez, C.B. 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**. 155, 456-461.
- Nikinmaa, M. 2014. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Academic Press. Elsevier. 252p.
- Nriagu, J. O. 1990. Global Metal Pollution: Poisoning the Biosphere? **Environment: Science and Policy for Sustainable Development**. 32, 7-33.
- O'Halloran, T.V, Culotta, V.C. 2000. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. **Journal of Biological Chemistry**. 275, 25025–25060.
- Oakes, K.D., Van Der Kraak, G.J. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**. 63. 447-463.

- Olsson, P.E. 1993. Metallothionein gene expression and regulation in fish. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds) **Molecular Biology Frontiers**. Amsterdam. Elsevier. vol. 2, pp. 259-278.
- Palermo, F.F., Risso, W.E., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R. 2015. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 116, 19-28.
- Prasad, A.S. 2008. Mini Review: Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. **Experimental Gerontology**. 43, 370-377.
- Qu, R., Feng, M., Wang, X., Quin, L., Wang, C., Wang, Z., Wang, L. 2014. Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. **Aquatic Toxicology**. 150, 9-16.
- Ramsdorf, W.A., Guimarães, F.S.F., Ferraro, M.V.M., Gabardo, J., Trindade, E.S., Cestari, M.M. 2009. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research**. 673, 78-81.
- Requena, J. R., Levine, R. L. And Stadtman, E. R. 2003. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. **Amino Acids**. 25, 221-226.
- Riley, P. A., 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**. 65, 27-33.
- Rodrigues S.C., Bianchini A., 2007. Extraction and concentration of freshwater – and seawater – derived dissolved organic matter for use in aquatic toxicology studies. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**. 2, 275-281.
- Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**. 48, 185-194.
- Sandstead, H.H., Au, W. 2007. Zinc. In: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg, L.T. **Handbook on the Toxicology of Metals**. Amsterdam: Elsevier. Third ed., c. 47, p. 925-947.
- Simon-Hettich, B., Wibbertmann, A., Wagner, D. Tomaska, L., Malcolm, H. 2001. **Zinc** (Environmental Health Criteria, 221). Review. World Health Organization, Geneva.
- Singh, N. P., Mccoy, M. T., Tice R. R., Schneider E. L. 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. 175, 184-191.
- Stohs, S.J., Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine**. 18, 321-336.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 35, 206-221.
- Toni, C., Menezes, C.C., Loro, V.L., Clasen, B.E., Cattaneo, R., Santi, A., Pretto, A., Zanella, R., Leitemperger, J. 2010. Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. **Journal Applied Toxicology**. 30, 590-595.
- Vallee, B. L. 1986. A synopsis of zinc biology and pathology. In: Gray, H. (Eds) **Zinc Enzymes**. Birkhäuser, Basel, 1-15.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 13, 57-149.

- Viarengo, A., Ponzano E., Dondero, F., Fabbri, R. 1997. A simple spectrophotometric Method for Methallothionein Evaluations in Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antartic Molluscs. **Marine Environmental Research**. 44, 69-84.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. 2007. Review: The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**. 146, 281-300.
- Witeska, M., Kosciuk, B. 2003. The changes in common carp blood after short-term zinc exposure. **Environmental Science and Pollution Research**. 10, 284-286.
- Wood, C.M. 2012. An Introduction to Metals in Fish Physiology and Toxicology: Basic Principles In: Wood, C., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds) **Fish. Physiology. Academic Press**, c.1, p. 1-53.
- Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L. 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. **Analytical Biochemistry**. 228, 349-351.

5. Manuscrito 2

Efeitos do zinco para a linhagem ZF-L: citototoxicidade, genotoxicidade e parâmetros de estresse oxidativo

Nadjha Tanassovia Salvestrin^{1,2} e Cláudia Bueno dos Reis Martinez^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina. Paraná. Brasil.

² Laboratório de Ecofisiologia Animal – Departamento de Ciências Fisiológicas Universidade Estadual de Londrina. Paraná. Brasil.

Manuscrito a ser encaminhado para o Periódico *Toxicology In Vitro*.

RESUMO

Neste estudo, ensaios *in vitro* foram realizados com o objetivo de verificar se o zinco (Zn), em concentrações dentro dos limites previstos na legislação brasileira para águas continentais, pode causar efeitos citotóxicos, genotóxicos e bioquímicos na linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZF-L). Para tanto, as células ZF-L foram expostas *in vitro*, por 1, 3 e 6 h, apenas ao meio de cultura (CTR), ou ao meio de cultura contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) ou 2 mg Zn L⁻¹ (Zn 2). Após as exposições foram realizados ensaios de citotoxicidade para avaliar a integridade da membrana plasmática (ensaio de exclusão do Azul de Tripán), a integridade dos lisossomos (ensaio de incorporação do vermelho neutro) e das mitocôndrias (ensaio de redução do MTT); ensaios bioquímicos para a quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante total (CAOT) e o ensaio do cometa, para avaliar a integridade do DNA. Os resultados encontrados mostraram que o Zn foi capaz de causar diminuição na viabilidade de membrana tempo e dose dependente, maior atividade lisossomal a partir de 3 horas de exposição às duas concentrações de Zn testadas, maior CAOT do grupo Zn 2 depois de 1 h de exposição e maior escore de danos no DNA no grupo Zn 2 para todos os tempos testados. Os resultados indicam assim que a concentração permitida no território nacional causa efeitos sobre ZF-L e esta deve ser revista.

Palavras-chave: capacidade antioxidante, *Danio rerio*, danos no DNA, integridade mitocondrial, espécies reativas de oxigênio, integridade do lisossomo.

5.1. Introdução

Estudos ecotoxicológicos têm se baseado na abrangência do princípio dos 3 Rs: *reduction*, *refinement* e *replacement* (redução, aperfeiçoamento e substituição) e para isso a utilização de ensaios *in vitro* é muito promissora, devido a suas vantagens como rapidez, facilidade e reprodutividade na obtenção de resultados (Bols et al., 2005; Teng et al., 2013). Embora a substituição integral não seja possível, a substituição parcial de testes *in vivo* por testes *in vitro* é importante para a redução na quantidade de animais utilizados em estudos toxicológicos (Anadón et al., 2014).

Atualmente, existem diversas linhagens celulares derivadas de peixes que podem ser utilizadas para avaliação do efeito de contaminantes em diversos parâmetros, como citotoxicidade, genotoxicidade, alteração no padrão de crescimento e metabolismo de determinado xenobiótico (Bols et al., 2005). Uma das linhagens que pode ser citada é a ZF-L que foi desenvolvida e caracterizada por Ghosh e colaboradores (1994). A linhagem ZF-L é derivada de hepatócitos do teleósteo *Danio rerio*, conhecido popularmente como paulistinha ou *zebrafish* e largamente utilizado em testes ecotoxicológicos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Bopp et al., 2006). Esta linhagem já mostrou sensibilidade a exposição a metais, como indução de mRNA de metalotioneínas após exposição ao arsênio, cobre, zinco e mercúrio (Chan et al., 2006; Cheuk et al., 2008), redução da viabilidade celular e aumento da formação de ERO (Sandrini et al., 2009).

Testes de toxicidade *in vitro* são de extrema importância, pois além de identificarem a capacidade do composto de causar morte celular, também possibilitam a identificação de quais funções celulares eles prejudicam (Eisenbrand et al., 2012). Os biomarcadores celulares podem fornecer informações importantes sobre o mecanismo de ação de determinado composto e existem vários ensaios de citotoxicidade para a verificação destes efeitos *in vitro* (Bols et al., 2005; Bopp e Lettieri, 2008).

Dentre os ensaios de citotoxicidade mais realizados podem ser citados o ensaio de exclusão do azul de Tripan, o de incorporação do vermelho neutro e o de redução do MTT (Bols et al., 2005). O ensaio de exclusão do corante azul de Tripan (AT) é utilizado para determinar o número de células viáveis presentes em uma suspensão de células a partir do princípio de que células viáveis excluem o corante e as inviáveis se tornam azuis (Strober, 2001). O método de incorporação do vermelho neutro (VN) se baseia na capacidade de células viáveis de incorporar

o corante aos lisossomos celulares, assim, quanto menor a absorção, menor a viabilidade celular (Repetto et al., 2008). O método de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) avalia a redução deste sal pela ação da enzima succinato desidrogenase, que se localiza na membrana interna das mitocôndrias, e resulta na formação de cristais de formazan, de cor púrpura. Assim, a redução do MTT indica a integridade funcional das mitocôndrias (Bols et al., 2005)

Os testes de toxicidade *in vitro* também podem estar associados a avaliação de genotoxicidade de um dado contaminante, que pode ser feita pelo ensaio do cometa, que detecta quebras nas fitas de DNA e tem sido empregado com sucesso na avaliação dos danos no DNA de linhagens celulares de peixes (Bols et al., 2005). Além dos parâmetros de cito e genotoxicidade, a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade das células em neutralizá-las são de grande importância, pois indicam se o contaminante estudado tem a capacidade de instaurar o estresse oxidativo nas células (Lushchak, 2011).

Dentre os contaminantes mais encontrados nos corpos d'água estão os metais e como consequência de sua presença no ambiente aquático eles são os compostos mais utilizados na realização de bioensaios (Van der Oost et al., 2003). Metais tem a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) em peixes, podendo instaurar estresse oxidativo, que pode causar danos celulares e no DNA (Gioda et al., 2007). Dentre os metais pode-se citar o zinco, que é um metal traço essencial, de ocorrência natural, mas também muito utilizado na indústria, nos processos de revestimento de superfícies metálicas contra corrosão, fabricação de borracha, aditivos e pigmentos, e também na alimentação animal e na indústria farmacêutica (Landner e Lindstrom, 1998). As concentrações de Zn na água doce podem variar de 0,02 até 5,7 mg L⁻¹ nas proximidades de minas, galvanoplastia e atividades industriais, porém esta concentração normalmente fica em torno de 0,05 mg L⁻¹ (Farag et al., 2003; Luoma e Rainbow, 2008). O zinco é constituinte de várias metaloenzimas e participa de vários sistemas enzimáticos, importante, por exemplo, na biossíntese de ácidos nucleicos e polipeptídeos. Apesar de serem essenciais para a funcionalidade do organismo, alguns metais como o zinco podem se tornar tóxicos aos organismos quando presentes em altas concentrações (Ashraf, 2006).

Assim, o objetivo deste trabalho foi contribuir com o conhecimento dos efeitos que a exposição ao zinco pode causar em organismos aquáticos a partir de testes realizados com a exposição da linhagem ZF-L a diferentes concentrações de Zn permitidas pela legislação nacional durante 1, 3 e 6 h de exposição para avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e de estresse oxidativo.

5.2. Material e Métodos

A linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZF-L) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ). As células foram cultivadas em meio de cultura contendo 50% de meio Leibovitz L-15 (Gibco®), 40% de meio RPMI (Gibco®) e 10% de soro bovino fetal (Gibco®) e mantidas em estufa seca a 28°C. Os frascos de cultura (50 mL) foram monitorados diariamente e o meio trocado a cada 2 dias.

As células foram cultivadas em monocamadas e quando a densidade atingia esse limite era realizado o repique das ZF-L, dividindo-as em 2 ou 3 frascos. Cada vez que um frasco era repicado, considerava-se uma nova passagem ou geração, para assim fazer o controle interno do número de passagens das células utilizadas. Para a realização de todos os testes foram utilizadas células entre as passagens 6 e 8 de repiques.

5.2.1. Preparo dos meios experimentais

As células ZF-L foram expostas apenas ao meio de cultura (CTR) ou ao meio de cultura contendo Zn nas concentrações de 0,2 mg L⁻¹ (Zn 0,2) e 2 mg L⁻¹ (Zn 2). Os meios contendo Zn foram preparados a partir de uma solução estoque de 100 mg L⁻¹ de sulfato de zinco (ZnSO₄) diluído em meio de cultura. A exposição era feita imediatamente após o preparo das soluções teste, pois o armazenamento destas soluções poderia comprometer a disponibilidade do metal.

Amostras dos meios contendo Zn, previamente filtradas (filtro de 0,45 µm) ou não filtradas, foram fixadas com ácido nítrico (1% HNO₃) para quantificação da concentração de Zn dissolvido (amostras filtradas) e total (amostras não filtradas). A análise de Zn foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica (AA 700 Perkin Elmer) por atomização em chama com base em uma curva feita com concentrações entre 0 e 4 mg L⁻¹ de zinco a partir de um padrão de zinco 1000 ppm (Spec Sol).

5.2.2. Ensaios de Citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade com o VN e MTT as células ZF-L foram expostas aos diferentes tratamentos (CTR, Zn 0,2 e Zn 2) em placas de 96 poços, em uma densidade de 10^6 células mL^{-1} . Para cada ensaio foram montadas 4 placas, com 8 réplicas por tratamento em cada placa. Após 24 h em estufa a 28°C , as células foram incubadas por 1, 3 e 6 h nos diferentes tratamentos.

Ensaio de incorporação do Vermelho Neutro

Após exposição das ZF-L aos diferentes tratamentos, os poços foram lavados com solução salina (NaCl 136,8 mM; KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 0,9 mM; Na_2HPO_4 8,13 mM; pH 7,4) e receberam 500 μL da solução de VN ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) e as placas foram incubadas a 28°C durante 3 h. Em seguida as placas foram centrifugadas (200 g, 5 min) e os poços foram lavados novamente com PBS para a remoção do excesso de corante. Em seguida, os poços sofreram lavagens com solução de formaldeído (0,5%) em cloreto de cálcio 1% e solução de álcool ácido (1% de ácido acético em 50% de álcool etílico) para a extração do VN das células e as placas foram agitadas durante 15 min. A quantificação do VN foi realizada em espectrofotômetro de microplaca a 540 nm. A absorbância obtida para os poços dos tratamentos CTR foi considerada como 100% de viabilidade lisossomal (VL). A VL das outras amostras foi determinada pela fórmula:

$$VL_{AM} = \frac{Abs_{AM} - Abs_{Br}}{Abs_{CTR} - Abs_{Br}} \times 100$$

Onde: VL_{AM} = viabilidade lisossomal da amostra

Abs_{AM} = absorbância da amostra

Abs_{Br} = absorbância do branco

Abs_{CTR} = absorbância do controle

Ensaio de redução do MTT

Este ensaio consiste na redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetiliazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) (Mosmann,1983) que é um sal solúvel em água e de cor amarelada. O MTT é reduzido pelas células viáveis pela ação da enzima succinato desidrogenase, presente na membrana interna das mitocôndrias, formando cristais de formazan de coloração arroxeada, insolúvel em água, mas solúvel em DMSO (dimetil sulfóxido) (Bopp et al., 2006).

Após a exposição das ZF-L aos diferentes tratamentos o meio foi retirado, os poços lavados com PBS (NaCl 136,8 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 0,9 mM; Na₂HPO₄ 8,13 mM; pH 7,4). Em seguida μ L da solução de MTT (2mM em meio de cultura) foi adicionado aos poços e as células foram incubadas durante 3 h a 28°C. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (200 g, 5 min), o meio foi retirado e foi adicionado DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância de cada poço foi determinada em espectrofotômetro de microplaca a 540 nm.

A absorbância obtida para as células do CTR foi considerada como 100% de viabilidade metabólica (VM). A VM das outras amostras foi determinada pela fórmula:

$$VM_{AM} = \frac{Abs_{AM} - Abs_{Br}}{Abs_{CTR} - Abs_{Br}} \times 100$$

Onde: VM_{AM} = viabilidade metabólica da amostra

Abs_{AM} = absorbância da amostra

Abs_{Br} = absorbância do branco

Abs_{CTR} = absorbância do controle

5.2.3. ERO e Capacidade Antioxidante Total (CAOT)

Para a análise da quantidade de ERO e CAOT foi utilizado o protocolo de Amado e colaboradores (2009) com modificações. As células ZF-L foram expostas aos diferentes tratamentos (CTR, Zn 0,2 e Zn 2) em placas pretas de 96 poços, em uma densidade de 10⁶ células mL⁻¹ e foram montadas 4 placas, com 6 replicas de cada tratamento por placa. Na mesma placa foram realizadas as exposições de 1, 3 e 6 h.

Depois da exposição, três poços referentes a um mesmo tratamento receberam apenas tampão fosfato de potássio 0,1 M em pH 7,0 e os outros três poços receberam ABAP (2,2'-azobis (2metilpropinamida) dihidroclorido) diluído em tampão fosfato de potássio (10 nM). O ABAP é uma substância geradora de radicais peroxil. Em seguida foi feita a leitura da autofluorescência em espectrofotômetro de microplacas (ex: 485 nm/ em: 520 nm). Em seguida, foi adicionado 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína (1mM H₂DCF-DA) e feita a determinação da fluorescência (ex: 485 nm/ em: 520 nm) durante 70 min, com intervalo de 5 min, totalizando 15 leituras, a 35°C. Nesta temperatura o ABAP é

degradado e libera nas células radicais peróxido (ROO[•]). O H₂DCF-DA é clivado pelas esterasas das amostras, liberando H₂DCF que reage com ERO, liberando diclorofluoresceína, responsável pela fluorescência liberada. Assim, quanto maior a quantidade de ERO, maior a fluorescência da amostra.

Para o cálculo da quantidade de ERO e da CAOT, foi feito inicialmente o ajuste da variação das unidades de fluorescência ao longo do tempo (UF X min) para uma função polinomial de segunda ordem e calculado o valor da integral. Para a quantificação de ERO, foram analisados os valores das integrais das amostras tratadas apenas com tampão fosfato. Já para avaliação da CAOT, foi feita a diferença dos valores de área das amostras tratadas e não tratadas com ABAP, seguindo a fórmula:

$$\text{Área relativa} = \frac{(\text{Área}_{ABAP} - \text{Área}_{SEM\ ABAP})}{\text{Área}_{SEM\ ABAP}}$$

Quanto maior a diferença entre as áreas, menor a CAOT devido ao fato de que altos valores de fluorescência indicam altos níveis de ERO e menor capacidade de neutralização destes compostos.

5.2.4. Biomarcador genotóxico: Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado conforme Singh e colaboradores (1988) com modificações. Para esse ensaio as células ZF-L foram expostas aos diferentes tratamentos (CTR, Zn 0,2 e Zn 2), durante 1, 3 e 6 h, em placas de 6 poços, aos quais adicionava-se 2 mL de meio contendo ZF-L, mantendo-se sempre a densidade de 10⁶ células por mL. Para cada tempo experimental foram montadas 4 placas, com duas réplicas para cada tratamento em cada placa.

O ensaio do cometa só foi realizado nos tratamentos nos quais a viabilidade celular foi maior ou igual a 80% (Tice et al., 2000). O ensaio de exclusão do azul de Tripán (Freshney, 2010) foi utilizado para estimar a viabilidade das ZF-L após as exposições. Para a realização deste ensaio, após o período de exposição das ZF-L aos diferentes tratamentos, as células foram lavadas com solução salina (PBS: NaCl 136,8 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 0,9 mM; Na₂HPO₄ 8,13 mM; pH 7,4) e soltas dos poços pela adição de tripsina 0,125%, que foi posteriormente inativada com PBS contendo soro bovino fetal (SBF) a 10%. Após a inativação da tripsina o conteúdo de cada poço foi transferido para um tubo de microcentrífuga, centrifugado (7 min, 275 g) e o pellet foi ressuscitado em solução de PBS com 10% de SBF. Desta solução foi retirada uma alíquota que foi

adicionada ao azul de Tripán 0,4%. Em Câmara de Neubauer, 100 células foram contadas seguindo-se uma ordem pré-determinada. A viabilidade celular foi dada pela porcentagem de células viáveis encontradas, sendo selecionados apenas os tratamentos com viabilidade celular maior ou igual a 80%.

Para a realização do teste do cometa uma alíquota de 20 µL da solução contendo o pellet ressuspendido em PBS com SBF foi transferida para microtubos onde foram acrescentados 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 37°C. Esta mistura foi dividida em duas lâminas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal que foram cobertas com lamínulas e em seguida mantidas em refrigerador a temperatura de 4-8°C por aproximadamente 30 minutos. Após esse período as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas a 4-8°C, em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM) durante o período de 2 h. Em seguida as lâminas foram acondicionadas em posição horizontal em cubas imersas em gelo, contendo tampão de eletroforese (NaOH 10 N e EDTA 200 mM, pH>13) durante 30 min, para posterior corrida de eletroforese durante 20 min a 25 volts e 300 mA. Terminada a corrida, as lâminas foram lavadas com tampão de neutralização a cada 5 min, por três vezes. Depois de secas as lâminas foram fixadas em etanol absoluto durante 10 min e armazenadas em refrigerador a 4-8°C até o momento de análise.

Para análise as lâminas codificadas foram coradas com GelRed (Uniscience), cobertas com lamínulas e observadas em microscópio de fluorescência, em aumento de 400 vezes. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina, totalizando 200 nucleóides por poço. Os danos no DNA foram classificados em 4 classes, de acordo com Kobayashi e colaboradores (1995), considerando-se o comprimento da cauda formada pelos fragmentos de DNA: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a de uma a duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. Com base na classificação descrita foram calculados os escores de danos para cada indivíduo, onde o número de nucleóides encontrados para cada classe foi multiplicado pelo número da classe e calculado pela fórmula: $(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$, onde A, B, C e D correspondem ao número de nucleóides em cada uma das classes.

5.3. Análises Estatísticas

Os resultados obtidos para os diferentes grupos experimentais, para cada tempo de exposição (1, 3 e 6 h), foram comparados entre si (CTR X Zn 0,2 X Zn 2) por meio de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Teste de Kruskal-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade de homogeneidade de variância), seguido por teste de comparações múltiplas (Teste de Student-Newman-Keuls ou Dunn's) para a localização das diferenças. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

5.4. Resultados

5.4.1. Quantificação de zinco no meio de cultura

As soluções de exposição utilizadas tiveram sua quantidade de zinco medida e os resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração de zinco inicial e final encontrada nas soluções de exposição, contendo apenas o meio de cultura (CTR), ou o meio de cultura com Zn nas concentrações 0,2 mg L⁻¹ (Zn 0,2) e 2 mg L⁻¹ (Zn 2). ND: não detectado.

CONCENTRAÇÃO DE ZINCO (mg L ⁻¹)		
	TOTAL	DISSOLVIDO
CTR	ND	ND
Zn 0,2	0,22 ± 0,07	0,13 ± 0,04
Zn 2	1,64 ± 0,09	1,61 ± 0,11

Valores representam as médias ± EP (n = 5).

5.4.2. Biomarcadores de citotoxicidade: viabilidade celular

5.4.2.1. Azul de Tripan (AT)

Os resultados de viabilidade celular pelo método da exclusão do azul de Tripan (Tabela 4) mostraram que, após todos os tratamentos, as células apresentaram viabilidade celular superior a 90%. Entretanto, foi observada uma menor viabilidade das células do grupo Zn 2, após 6 h de exposição ($P < 0,001$, ANOVA). Não foram detectadas diferenças após a exposição de 1 h ($P = 0,282$, Kruskal-Wallis) e de 3 h ($P = 0,150$, ANOVA).

Tabela 4: Viabilidade celular, determinada pelo método de exclusão por azul de Tripán, das células ZF-L expostas apenas ao meio de cultura (CTR), ou ao meio de cultura contendo Zn nas concentrações de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn 0,2) e 2 mg L^{-1} (Zn 2) durante 1, 3 e 6 h.

	1 h	3 h	6 h
CTR	100,0 ± 0,0	99,8 ± 0,2	99,2 ± 0,4 a
Zn 0,2	99,6 ± 0,3	98,8 ± 0,4	99 ± 0,6 a
Zn 2	99,4 ± 0,4	99,4 ± 0,4	95,4 ± 0,7 b

Valores representam as médias ± EP (n = 4). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para um mesmo tempo de exposição ($P < 0,05$).

5.4.2.2. Vermelho Neutro (VN)

Os resultados referentes à viabilidade celular (VC), determinada através da incorporação do VN, estão representados na Figura 21. Após 1 h de exposição, a VC das ZF-L não variou significativamente entre os diferentes tratamentos ($P = 0,198$, ANOVA). Entretanto, as células expostas ao Zn durante 3 h apresentaram VC significativamente maior em relação ao CTR ($P = 0,002$, Kruskal-Wallis). Após 6 h de exposição, as ZF-L expostas ao Zn 2 também apresentaram VC significativamente maior tanto em relação ao CTR, quanto às células do grupo Zn 0,2 ($P = 0,016$, Kruskal-Wallis).

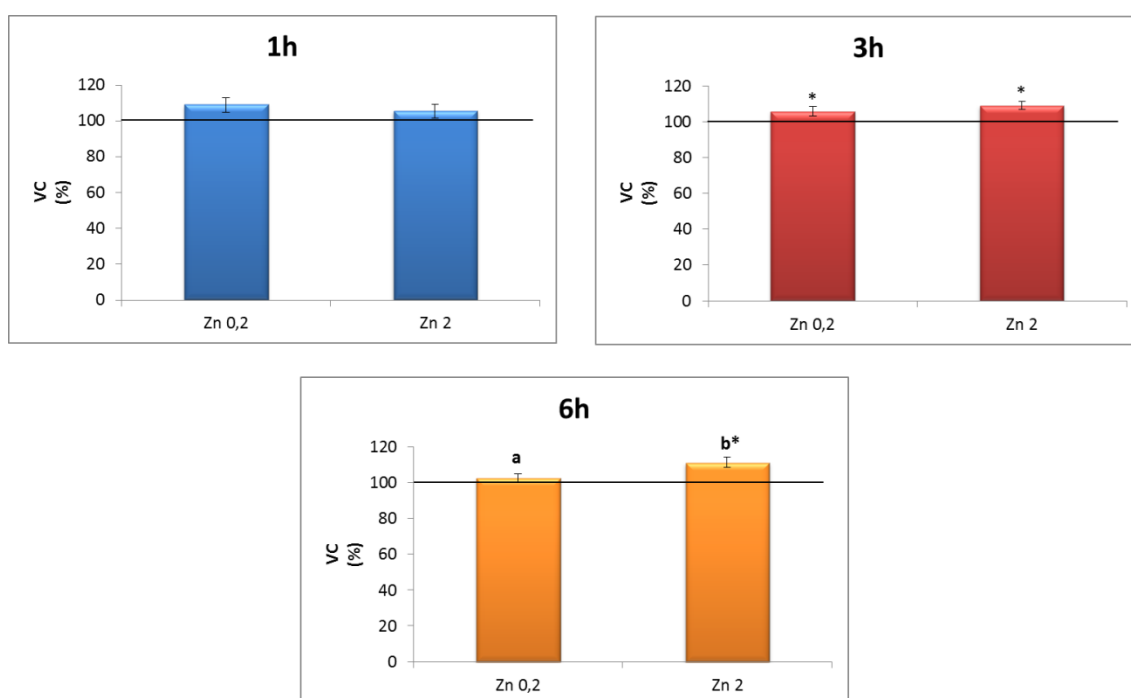


Figura 21: Viabilidade celular (média ± EP, n = 4), calculada pelo método de incorporação do VN, das células ZF-L expostas apenas ao meio de cultura (CTR), ou ao meio de cultura contendo Zn nas concentrações de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn 0,2) e 2 mg L^{-1} (Zn 2), durante 1, 3 e 6 h. Asteriscos indicam diferença em relação ao grupo CTR e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

5.4.2.3. MTT

A viabilidade celular, determinada através da redução do MTT (Fig. 22), mostrou menor atividade mitocondrial nas células expostas, durante 1 h, ao Zn 0,2 em relação ao CTR e maior atividade nas ZF-L do grupo Zn 2, tanto em relação ao CTR quanto ao grupo Zn 0,2 ($P < 0,001$, Kruskal-Wallis). Nos tempos experimentais de 3 h ($P = 0,370$, Kruskal-Wallis) e 6 h ($P = 0,188$, ANOVA) não houve variação da viabilidade metabólica mitocondrial.

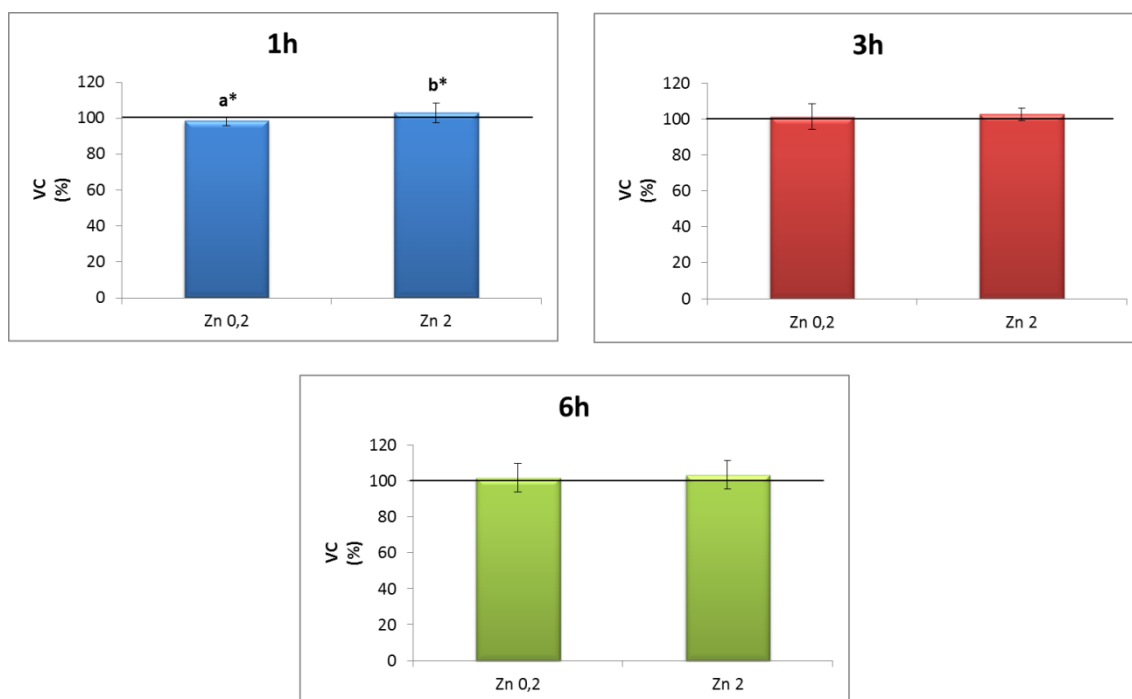


Figura 22: Viabilidade celular (média \pm EP, $n = 4$), calculada pelo método de redução do MTT, das células ZF-L expostas apenas ao meio de cultura (CTR), ou ao meio de cultura contendo Zn nas concentrações de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn 0,2) e 2 mg L^{-1} (Zn 2), durante 1, 3 e 6 h. Asteriscos indicam diferença em relação ao grupo CTR e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

5.4.3. Biomarcadores bioquímicos: quantificação de ERO e CAOT

Não foi observada alteração significativa na geração de espécies reativas de oxigênio nas células ZF-L expostas aos diferentes tratamentos, por 1 h ($P = 0,352$, ANOVA), 3 h ($P = 0,969$, ANOVA) e 6 h ($P = 0,834$, ANOVA) (Fig. 23). Entretanto, após 1 h de exposição, a CAOT apresentou-se maior nas células do grupo Zn 2 em comparação ao CTR e ao grupo Zn 0,2 ($P = 0,018$, ANOVA). Nenhuma variação significativa na CAOT das ZF-L foi observada entre os grupos experimentais nas exposições de 3 h ($P = 0,957$, ANOVA) e 6 h ($P = 0,906$, ANOVA) de exposição (Fig. 24).

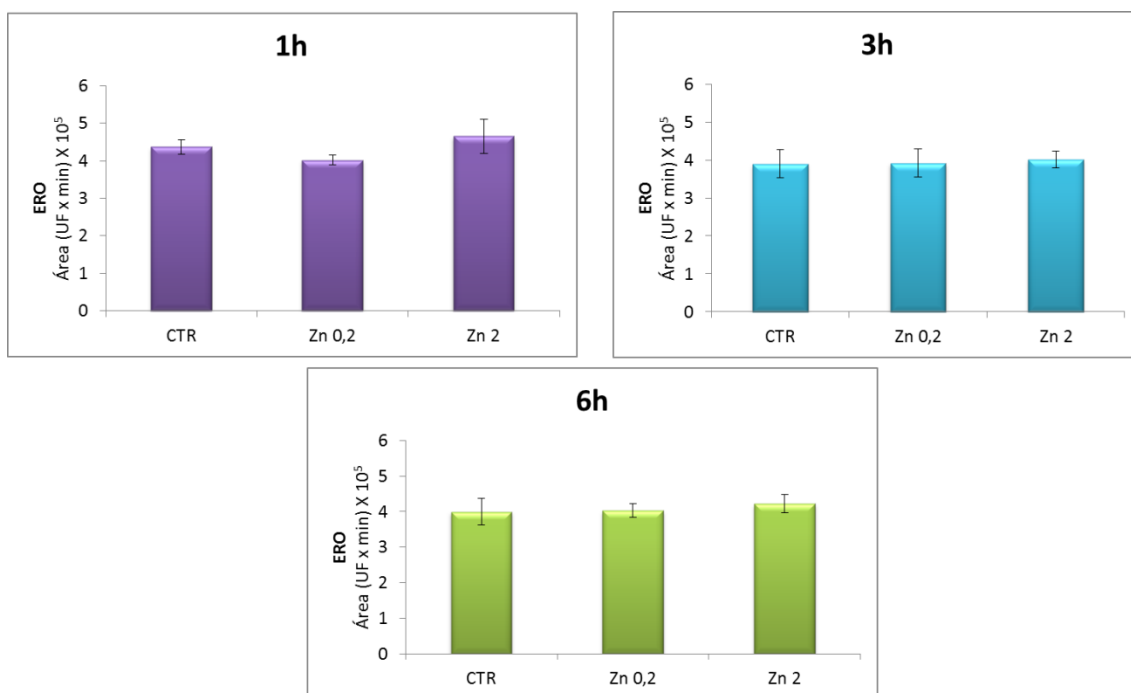


Figura 23: Valores (média \pm EP, $n = 4$) referentes à geração de espécies reativas de oxigênio pelas células ZF-L expostas apenas ao meio de cultura (CTR), ou ao meio de cultura contendo Zn nas concentrações de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn 0,2) e 2 mg L^{-1} (Zn 2), durante 1, 3 e 6 h.

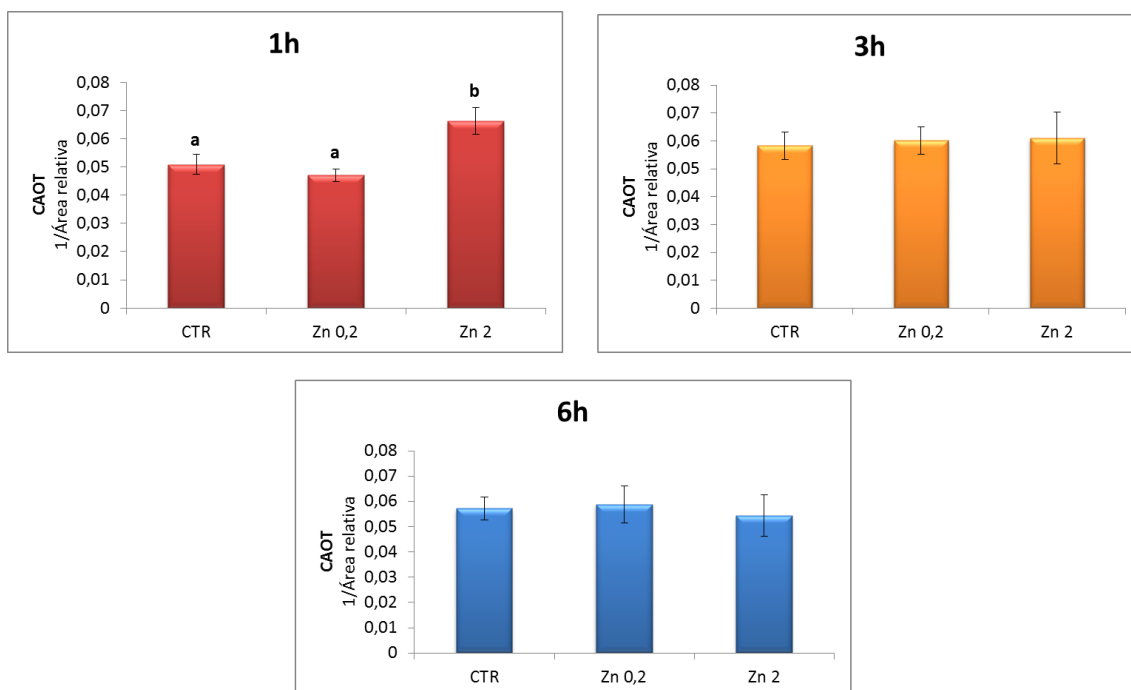


Figura 24: Valores (média \pm EP, $n=4$) referentes à capacidade antioxidante total (1/Área relativa) das células ZF-L expostas apenas ao meio de cultura (CTR), ou ao meio de cultura contendo Zn nas concentrações de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn 0,2) e 2 mg L^{-1} (Zn 2), durante 1, 3 e 6 h. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

5.4.4. Biomarcador genotóxico: danos no DNA

O escore de danos no DNA foi significativamente maior nas ZF-L do grupo Zn 2, nas exposições de 1 h ($P = 0,004$, ANOVA), 3 h ($P = 0,007$, ANOVA) e 6 h ($P = 0,049$, ANOVA). Não foram observadas diferenças no escore de danos das ZF-L do grupo Zn 0,2, em relação ao CTR (Fig. 25), para nenhum período experimental. Nas Tabelas 6, 7 e 8 estão apresentados o número de nucleóides observados em cada classe de dano e o número total de nucleóides danificados (classe 1 + classe 2 + classe 3), para os tempos de 1, 3 e 6 h respectivamente.

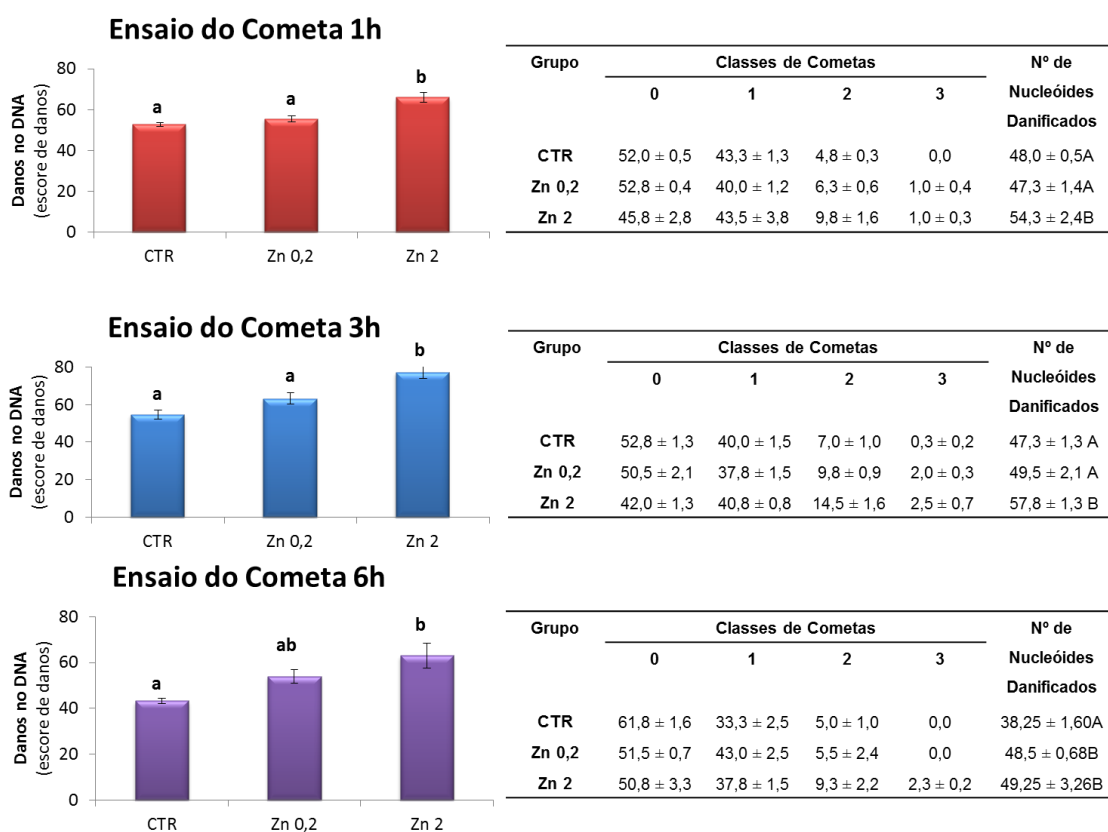


Figura 25: Escore de danos no DNA e número de nucleóides em cada de classe de cometa e número total de nucleóides danificados (média ± EP, n = 4, 8 réplicas) das células ZF-L expostas ao Zn nas concentrações 0,2 mg L⁻¹ (Zn 0,2) e 2 mg L⁻¹ (Zn 2) ou apenas a meio de cultura (CTR) durante 1, 3 e 6 h. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos e ($P < 0,05$).

5.5. Discussão

Com base nos valores apresentados para Zn total e dissolvido em meio de cultura, pode-se afirmar que a composição do meio não afetou as concentrações de Zn dissolvido, as quais foram muito próximas das concentrações totais de Zn que foram adicionadas à solução. Deste Zn dissolvido a forma

predominante é a do íon Zn^{2+} , responsável pela toxicidade deste metal, pois esta é a forma passível de absorção pelos canais presentes nas membranas celulares (Hogstrand, 2012). As concentrações utilizadas neste trabalho são relevantes ecológica e toxicologicamente, pois estão dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira para água doce (Resolução CONAMA 357/2005).

A determinação da citotoxicidade de determinados compostos tem sido amplamente empregada, utilizando-se de métodos colorimétricos e fluorimétricos que se baseiam na capacidade de incorporação, metabolização e exclusão de corantes (Bols et al., 2005). Os testes de citotoxicidade fornecem informações importantes sobre os danos que contaminantes podem causar em componentes e funções celulares específicos, ajudando a entender seu mecanismo de ação (Eisenbrand et al., 2002).

No presente trabalho foi verificada diminuição da viabilidade celular (VC), indicada pelo método de exclusão do azul de Tripán, nas ZF-L expostas ao Zn 2 durante 6 h. Estes resultados corroboram os achados de Sandrini e colaboradores (2009), que mostraram que células ZF-L apresentaram redução da VC tempo e dose dependentes, após exposição a diferentes concentrações de cobre. Assim, conclui-se que quanto maior o tempo de exposição das células a concentrações relativamente altas de metais traço, estes se mostram citotóxicos, causando danos na estrutura da membrana celular, permitindo assim que estes contaminantes entrem na célula, podendo causar até mesmo a morte celular. Porém, este é um tipo grave de dano, que geralmente se torna visível depois que diversos outros danos já possam ter ocorrido no interior das células, tanto de forma estrutural como funcional.

Para a análise da citotoxicidade de agentes químicos, o método de exclusão do MTT e de absorção do vermelho neutro (VN) são os mais comuns e indicados em linhagens celulares de peixes (Segner, 1998).

Assim como observado no presente trabalho, aumento na absorção do VN por linhagem celular de peixes expostas ao Zn também já foi descrito por Ní Shúilleabháin e colaboradores (2003). Estes autores expuseram diferentes linhagens celulares de peixes (CHSE-214 - de embrião de salmão, EPC - de epitélio de carpa e RTG-2 - de gônadas de truta arco-íris) a soluções contendo $ZnCl_2$, $ZnSO_4$ e $Zn(NO_3)_2$ em baixas concentrações. O aumento da atividade lisossômica é provavelmente uma resposta protetora da célula ao influxo de Zn através dos transportadores presentes em suas membranas apicais, como os da

família Zip (Ní Shúilleabháin et al., 2003; Hogstrand, 2012). Este aumento pode estar atrelado com sua função excretora dos lisossomos, que pode se ligar diretamente ao íon metálico presente em excesso no citosol, a fim de eliminá-lo por meio de uma exocitose (Di Giulio et al., 1995) e também devido à sua alta relação com as metalotioneínas. Estas são proteínas de baixo peso molecular (6 – 7 kDa), com cadeia de aminoácidos rica em cisteínas que conferem a esta proteína alta afinidade por íons metálicos livres, devido aos vários grupamentos tióis (-SH) presentes em sua estrutura (Nordberg, 1998; Viarengo et al, 2007). As MTs também podem ser encontradas nos lisossomos, apesar desta localização ser mais rara (Cajaraville et al., 2000) e no espaço intermembranar das mitocôndrias (Ye et al., 2001). Como já descrito por Klaassen e colaboradores (1994) os lisossomos são os responsáveis pela degradação das MTs, responsáveis por quelar íons metálicos a fim de evitar que estes pudessem danificar compartimentos celulares. Os íons são liberados e as MTs são degradadas por meio da ação das catepsinas (principais proteases presentes nos lisossomos). Considerando-se, portanto a importante relação dos lisossomos com a atuação das MTs e visto que a exposição ao Zn já demonstrou ser capaz de induzir o aumento nas concentrações de MTs em experimentos *in vivo* realizados com juvenis de *Prochilodus lineatus* expostos às mesmas concentrações testadas no presente trabalho (Salvestrin et al., 2015), pode-se afirmar que a maior viabilidade lisossomal encontrada deve estar relacionada com a atividade celular de eliminação do Zn em excesso presente no citosol.

A redução do MTT ocorre principalmente associada à enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias, mas também pode ocorrer por meio da ação de enzimas oxidoredutases que dependem de NADP e estão presentes fora da mitocôndria, no citoplasma celular, e membranas plasmática e do lisossomo (Berridge et al., 2005). Este método é amplamente utilizado em ensaios *in vitro* com linhagens celulares de peixes, incluindo a ZF-L, para verificação de citotoxicidade de diferentes compostos (Bopp e Lettieri, 2008).

O Zn já foi descrito como um inibidor da respiração celular, prejudicando a funcionalidade da mitocôndria (Ye et al., 2001). Os resultados encontrados com as ZF-L, após 1 h de exposição ao Zn 0,2 reforçam esta capacidade deletéria do metal. Porém este decréscimo na redução do MTT não foi observado após as exposições de 3 e 6 h, indicando talvez uma situação de adaptação das células ao influxo de Zn. As células foram capazes de regular sua

atividade mitocondrial que permaneceu estável, sugerindo que nas concentrações testadas o Zn não é capaz de inibir a atividade mitocondrial de ZF-L. Linhagem de fígado de truta arco-íris (RTL-W1) e de gônadas da mesma espécie (RGT-2) expostas a nanopartículas de zinco, durante 6 h, também não apresentaram alteração em sua viabilidade mitocondrial (Fernández et al., 2013). Estes dados corroboram a hipótese de que as células de peixes têm a capacidade de manter a atividade da enzima succinato desidrogenase estável, mesmo frente a exposição ao Zn. Apesar dos resultados encontrados, informações sobre a atuação do Zn na atividade das mitocôndrias ainda são escassos (Ye et al., 2001).

As células possuem uma produção natural de ERO, porém xenobióticos como os metais podem causar aumento nesta produção (Lushchak, 2011), como já descrito em organismos aquáticos, nos quais a exposição a metais pode causar o aumento na formação de ERO e o estabelecimento de um quadro de estresse oxidativo (Roméo et al., 2000). Diferentes linhagens celulares de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, expostas a nanopartículas de ZnO e ao íon Zn^{2+} não apresentaram alteração na quantidade de ERO formadas (Fernández et al., 2013), confirmando os resultados apresentados no presente trabalho, em que o zinco não provocou alteração na quantidade de ERO em nenhum dos tempos experimentais testados. Esta ausência de efeitos do Zn na formação de ERO em organismos aquáticos foi também comprovada em experimento *in vivo* com a exposição de juvenis de *Prochilodus lineatus* às mesmas concentrações de zinco testadas no presente trabalho e sem alteração na formação de ERO no tecido hepático (Salvestrin et al., 2015). Sandrini e colaboradores (2009), durante a avaliação dos efeitos de cobre para as células ZF-L, também não observaram variação na produção de ERO em ZF-L expostas a concentração de 5 mg Cu L^{-1} nos tempos experimentais de 6, 12 e 24 h. Assim, pode-se sugerir que metais essenciais como o Zn, nas concentrações testadas, não aumentam a geração de ERO devido às diversas defesas antioxidantes presentes no organismo.

Porém, mesmo que não se verifique diferença na quantidade de ERO presentes nas células, estas podem estar com suas defesas antioxidantes induzidas para que danos oxidativos não ocorram. A ativação do aparato de defesa antioxidante já foi observada na linhagem ZF-L exposta ao cobre (Chen e Chan, 2011). Porém, no presente trabalho esta resposta só foi verificada na exposição de 1 h à concentração de 2 mg Zn L^{-1} , enquanto que em todas as outras situações a CAOT não se alterou, mostrando uma estabilização do sistema de

defesa das células. No trabalho conduzido por Salvestrin e colaboradores (2015) com exposição de *Prochilodus lineatus* às mesmas concentrações de Zn aqui testadas não foi observada alteração na CAOT. Resultado semelhante também foi encontrado por Sandrini e colaboradores (2009) em ZF-L expostas, durante 24 h, às concentrações de 5 e 20 mg L⁻¹ de cobre. Devido à capacidade conhecida de metais instaurarem estresse oxidativo em células, a explicação mais provável para que não tenha havido alteração na produção de ERO e aumento de CAOT é que o metal tem a capacidade de induzir a expressão de genes relacionados com a defesa antioxidante, como a produção de glutathiona (GSH) em ZF-L (Sandrini et al., 2009) e de outras defesas como as metalotioneínas (Kimura et al., 2009; Nikinmaa, 2014), glutathiona peroxidase (GPX), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e glutathiona-S-transferase (GST) (Chung et al., 2005; Chung et al., 2006). Aumento na concentração de GSH já foi observada no mesmo estudo de Salvestrin e colaboradores (2015), assim como o aumento já citado no conteúdo de MTs. Estas duas proteínas citosólicas são parte importante da defesa antioxidante das células, assim assume-se que estas e outras defesas foram suficientes para o combate contra as ERO formadas devido à exposição ao zinco.

Danos na molécula de DNA têm se mostrado um indicador sensível da genotoxicidade de xenobióticos presentes nos ambientes aquáticos podendo ser utilizados para estudar a genotoxicidade destes compostos e avaliar o risco ecológico e ambiental que eles podem causar (Zhu et al., 2005). De acordo com Bols e colaboradores (2005), o ensaio do cometa é um marcador considerado sensível e tem sido utilizado com sucesso em linhagens celulares de peixes. Os danos que o ensaio do cometa na versão alcalina detecta são quebras de fita dupla ou simples e locais de excisão incompleta, sítios álcali-lábeis e *crosslinks* (Tice et al., 2000; Jha, 2008). Danos no DNA detectados por este ensaio já foram encontrados no peixe *Prochilodus lineatus* exposto às mesmas concentrações de zinco do presente trabalho, apresentando danos a partir da menor concentração testada (Salvestrin et al., 2015). Parte desses danos podem ter sido causados pelas ERO, visto que no trabalho citado foi verificada a ocorrência carbonilação de proteínas (PCO), resultante de danos oxidativos, causados devido à instauração do estresse oxidativo nas células, consolidando o descrito por Riley (1994) que afirma que normalmente, 90% dos danos no DNA são ocasionados pelo aumento na formação de ERO no organismo. O aumento na produção de ERO também já foi descrito por Dineley e colaboradores (2003) quando existe um excesso de Zn

nas células através principalmente do aumento na formação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), contribuindo para a hipótese de que os danos no DNA tenham sido causados pelas ERO. Entretanto danos no DNA também poderiam ter sido causados, por exemplo, pela presença destas proteínas carboniladas citadas, que, devido à mudança em sua conformação, podem perder função, podendo estar associadas ao DNA. A presença principalmente de danos de classe 1 indicam que são danos leves, passíveis de reparo, e que provavelmente não causarão mutação nem passariam para a prole, contudo, diante de um maior tempo de exposição estes danos podem ser agravados, indicando assim uma maior preocupação quanto a exposição de organismos aquáticos ao zinco, visto que este se mostrou genotóxico para a linhagem ZF-L.

Assim, com este trabalho podemos afirmar que o Zn provoca efeitos na linhagem ZF-L a partir de baixas concentrações como a de $0,2 \text{ mg Zn L}^{-1}$, através da estimulação do metabolismo lisossomal, e estes efeitos se agravam com o aumento da concentração para 2 mg Zn L^{-1} , onde foram verificados danos no DNA, e aumento na capacidade de defesa antioxidante indicando a capacidade do Zn de instauração de estresse oxidativo nas células. Assim, este trabalho mostra os efeitos que a exposição ao Zn pode ter sobre uma linhagem celular de peixe, mesmo dentro do limite de concentração máxima permitida pela legislação brasileira, sugerindo uma revisão na legislação brasileira, visto que os limites não são seguros para a biota.

5.6. Referências Bibliográficas

- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monsserat, J.M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the total environment**. 407, 2115-2123.
- Anadón, A., Martínez, M.A., Castellano, V., Martínez-Larrañaga, M.R. 2014. The role of *in vitro* methods as alternatives to animals in toxicity testing. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**. 10 (1), 67-79.
- Ashraf, W. 2006. Levels of selected heavy metals in Tuna fish. **The Arabian Journal for Science and Engineering**. 31, 89-92.
- Berridge, M.V., Herst, P. M. Tan, A.S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual: Review**. 11, 127-152.
- Bols, N.C., Dayeh, V.R., Lee, L.E.J., Schirmer, K. 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. In: Mommsen, T.P., Moon, T.W. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Ed. Elsevier B.V., Amsterdam, Holanda, pp. 43-84.
- Bopp, S.K., Minuzzo, M., Lettieri, T. 2006. **The zebrafish (*Danio rerio*): an emerging model organism in the environmental field**. Joint Research

- Centre: Scientific and Technical Reports, Institute for Environment and Sustainability. Itália, pp.19.
- Bopp, S.K., Lettieri, T. 2008. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. **BMC Pharmacology**. 8, 8.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Ported, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**. 247, 295-311.
- Chan, K.M., Ku, L.L., Chan, P.C.Y., Cheuk, W.K. 2006. Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. **Marine Environmental Research**. 62, 83-87.
- Chen, D.S., Chan, K.M. 2011. Differentially expressed proteins in zebrafish liver cells exposed to copper. **Aquatic Toxicology**. 104, 270-277.
- Cheuk, W.K., Chan, P.C.Y., Chan, K.M. 2008. Cytotoxicities and induction of metallothionein (MT) and metal regulatory element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1) messenger RNA levels in the zebrafish (*Danio rerio*) ZFL and SJD cell lines after exposure to various metal ions. **Aquatic Toxicology**. 89, 103-112.
- Chung, M. J., Hogstrand, C., Lee, S. J. 2006. Cytotoxicity of nitric oxide is alleviated by zinc-mediated expression of antioxidant genes. **Experimental Biology and Medicine**. 231, 1555-1563.
- Chung, M.J., Walker, P.A., Brown, R.W., Hogstrand, C. 2005. Zinc mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 205, 225-236.
- CONAMA. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. **Resolução Nº 357** de 17 de março de 2005.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A. 1995. Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity. In: Rand, G.M. (Editor) **Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. CRC Press, c. 17, p. 523-561.
- Dineley, K.E., Votyakova, T.V., Reynolds, I.J. 2003. Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**. 85, 563-570.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J. 2002. Methods on *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**. 40, 193-236.
- Farag, A. M., Skaar, D., Nimick, D. A., Macconnell, E., And Hogstrand, C. 2003. Characterizing aquatic health using salmonid mortality, physiology, and biomass estimates in streams with elevated concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, and zinc in the Boulder River watershed. Montana. **Transactions of the American Fisheries Society**. 132, 450-467.
- Fernández, D., García-Gómez, C., Babín, M. 2013. *In vitro* evaluation of cellular responses induced by ZnO nanoparticles, zinc ions and bulk ZnO in fish cells. **Science of The Total Environment**. 452-453. 262-274.
- Freshney, R.I. 2010. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. **Wiley-Blackwell**, sixth ed. Nova Jérsei–EUA.
- Ghosh, C., Zhou, Y.L., Collodi, P. 1994. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. **Cell Biology and Toxicology**. 10, 167-176.
- Gioda, C.R., Lissner, L.A., Preto, A., Da Rocha, J.B.T., Schetinger, M.R.C., Neto, J.R., Morsch, V.M., Loro, V.L. 2007. Exposure to sublethal concentrations of

- Zn(II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. **Chemosphere**. 69, 170-175.
- Hogstrand, C. 2012. Zinc. In: Wood, C., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds). **Fish Physiology**. Academic Press, pp. 135-200.
- Jha, A.N. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**. 23 (3), 207-221.
- Kimura, T., Itoh, N., Andrews, G. K. 2009. Mechanisms of heavy metal sensing by metal response element-binding transcription factor-1. **Journal of Health Science**. 55 (4), 484-494.
- Klaassen, C.D., Choudhuri, S., Mckim Jr, J.M., Lehman-Mckeeman, L.D., Kershaw, W.C. 1994. *In vitro* and *in vivo* studies on the degradation of metallothionein. **Environmental Health Perspectives**. 102, 141-146.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T.A. 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Comum**, 3, 103-115.
- Landner, L., Lindstrom, L. 1998. Zinc in society and in the environment. **Swedish Environmental Research Group (MFG)**, pp.160.
- Luoma, S. N., Rainbow, P. S. 2008. **Metal Contamination in Aquatic Environments: Science and Lateral Management**. Cambridge University Press, New York, pp. 588.
- Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**. 101,13-30.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. 65, 55-63.
- Ní Shúilleabháin, S., Mothersill, C., Sheehan, D., O'brien, N.M., O'halloran, J., Van Pelt, F.N.A.M., Davoren, M. 2004. *In vitro* cytotoxicity testing of three zinc metal salts using established fish cell lines. **Toxicology in Vitro**. 18, 365-376.
- Nikinmaa, M. 2014. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Academic Press. Elsevier. 252p.
- Nordberg, M. 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. **Talanta**. 46, 243-254.
- Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J.L. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nature Protocols**. 3, (7), 1125-1131.
- Riley, P. A. 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**. 65, 27-33.
- Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**. 48, 185–194.
- Salvestrin, N.T., Risso, W.E., Martinez, C.B.R. 2015. Manuscrito 1: Biomarcadores para avaliação dos efeitos da exposição do teleósteo *Prochilodus lineatus* a diferentes concentrações de Zinco na água. In: **Avaliação dos Efeitos do Zinco no teleósteo de água doce *Prochilodus lineatus* e na Linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZF-L) por meio de biomarcadores**. Dissertação em Ciências Biológicas. Universidade estadual de Londrina. Londrina.
- Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F.F. 2009. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. **Aquatic Toxicology**. 95, 285-291.

- Segner, H. 1998. Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. **Fish Ecotoxicology**. 86, 1-38.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice R. R., Schneider E. L. 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. 175, 184-191.
- Strober, W. 2001. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**. 21, A.3B.1–A.3B.2.
- Teng, Q., Ekman, D.R., Huang, W., Collete, T.W. 2013. Impacts of 17 α -ethynylestradiol exposure on metabolite profiles of zebrafish (*Danio rerio*) liver cells. **Aquatic Toxicology**. 130, 184-191.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 35, 206-221.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. 2007. Review: The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology & Pharmacology**. 146, 281-300.
- Ye, B., Maret, W., Vallee, B.L. 2001. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 98 (5), 2317-2322.
- Zhu, L., Huang, Y., Liu, G. 2005. Using DNA damage to monitor water environment. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**. 23. 340-348.

6. Considerações Gerais

Os resultados apresentados no presente trabalho possibilitaram uma avaliação dos efeitos que a exposição ao zinco pode causar em organismos aquáticos, através de testes de toxicidade *in vivo* com a espécie de peixe dulcícola *Prochilodus lineatus*, representante da biota local, e em experimentos *in vitro* com linhagem celular de peixes também de água doce, ZF-L, originária de hepatócitos de *Danio rerio*. Observou-se maior concentração de Zn em tecidos dos peixes expostos à maior concentração de Zn testada, a instauração de estresse oxidativo, devido à produção de ERO e o conseqüente aumento de defesas antioxidantes como a GSH e as PSMT. Também foram observados oxidação de proteínas e maior escore de danos no DNA de eritrócitos dos peixes expostos às duas concentrações testadas indicando danos de origem oxidativa além de alterações fisiológicas. Nos ensaios *in vitro* observou-se alteração na viabilidade celular, estimulação do metabolismo lisossomal, maior escore de danos no DNA que podem ter origem em razão do aumento da presença de ERO, acompanhado pela maior CAOT. Assim, a partir dos resultados e danos apresentados, pode-se afirmar que o uso da linhagem celular ZF-L é satisfatório para avaliação da exposição ao zinco, visto que após 1 h ela já apresentou resultados semelhantes aos encontrados nos experimentos com *Prochilodus lineatus*, sendo assim indicada para análise de integridade do DNA e de estresse oxidativo. É necessário também que outros parâmetros que foram analisados nos teste *in vivo* sejam determinados em experimentos com linhagem celular, para que se confirme esta equivalência de sensibilidade, facilitando assim diversos tipos de análises de efeitos tóxicos deste metal. Com base em todos os parâmetros citados, em exposições *in vivo* e *in vitro*, pode-se afirmar que, apesar das concentrações testadas estarem dentro do limite de concentração permitida pela legislação brasileira (Resolução CONAMA 357/2005), estas não são seguras para a biota aquática, sendo necessária a revisão desta legislação para a adequação às condições e aos organismos existentes no ambiente aquático.