



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KATHYA ASSMANN MODESTO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ARSÊNIO PARA PEIXES
UTILIZANDO-SE DIFERENTES BIOMARCADORES E
MODELOS EXPERIMENTAIS**

Londrina
2021

KATHYA ASSMANN MODESTO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ARSÊNIO PARA PEIXES
UTILIZANDO-SE DIFERENTES BIOMARCADORES E
MODELOS EXPERIMENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados).

Orientadora: Prof.^a Dr^a Claudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Assmann Modesto, Kathya.

Avaliação dos efeitos do arsênio para peixes utilizando-se diferentes biomarcadores e modelos experimentais. / Kathya Assmann Modesto. - Londrina, 2021. 113 f.

Orientador: Claudia Bueno dos Reis Martinez.
Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2021.
Inclui bibliografia.

1. capítulo 1 - Tese. 2. capítulo 2 - Tese. 3. capítulo 3 - Tese. 4. capítulo 4 - Tese. I. Bueno dos Reis Martinez, Claudia . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

KATHYA ASSMANN MODESTO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ARSÊNIO PARA PEIXES
UTILIZANDO-SE DIFERENTES BIOMARCADORES E
MODELOS EXPERIMENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados).

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Claudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Helena Cristina da Silva de Assis
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof^a Dr^a Marisa Narciso Fernandes
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Prof^a Dr^a Marta Marques de Souza
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Prof^a. Dr^a. Vânia Lúcia Loro
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Londrina, 26 de maio de 2021.

Agradecimentos

Antes de tudo agradeço a Deus, pelo dom da vida, pela fé que me guia, por nunca me abandonar.

Agradeço ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) e à Universidade Estadual de Londrina (UEL).

A CAPES, Fundação Araucária e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Claudia Bueno dos Reis Martinez por ter me recebido novamente em seu laboratório, por toda ajuda e orientação durante esses anos. Você é uma pessoa admirável, absolutamente justa e companheira e sem dúvida, um exemplo profissional a seguir. Obrigada por tudo, principalmente pela paciência neste último ano tão anormal em nossas vidas. Toda minha admiração, respeito e gratidão a você, muito obrigada.

Agradeço aos membros da banca examinadora, professoras Dra. Helena Cristina da Silva de Assis, Marisa Narciso Fernandes, Marta Marques de Souza e Vania Loro, pela disponibilidade em colaborar com o nosso trabalho.

Ao técnico de laboratório Dr. Wagner Ezequial Risso pela imensa colaboração com a quantificação dos metais, por toda ajuda nas amostragens e pela disponibilidade sempre que necessário.

Às profs. Dra. Mariana Machado Lauer, Luciana Fernandes de Oliveira e Lindalva Pereira pelas contribuições ao trabalho no exame de qualificação.

A todos os colegas do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA), que me receberam, me ensinaram e me ajudaram durante esta jornada: Carol, Angélica, Milena, Tiago, Jéssica, Helen, Vanessa, Jheimison, Duda, Mayra, Laís, Laura Fernanda e Carlos. Ninguém faz nada sozinho, então muito obrigada!

A Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), campus Cornélio Procópio e ao colegiado de Ciências Biológicas pelo afastamento concedido para minha capacitação, sem o qual a realização deste trabalho não teria sido possível.

Ao meu marido Junior, por sempre estar ao meu lado, fazendo seus os meus sonhos. A sua ajuda, compreensão e apoio foram indispensáveis nesse caminho. Obrigada por me fazer rir, por fazer eu me sentir especial e por ter me dados meus dois maiores

tesouros. Nossa família é linda, te amo!

Aos meus pequenos, Laura e Vitor, que literalmente enchem a minha vida, de amor, gritos, bagunça, alegria e felicidade. Vocês são o maior presente que eu já ganhei, por vocês eu quero ser melhor a cada dia. Contem sempre comigo meus amores!

Aos meus pais, por serem a base de tudo, por cuidar de mim, por me permitir ser o que sou hoje. Vocês são meus melhores exemplos, falta palavras para expressar meu amor e minha gratidão por toda uma vida.

A minha irmã e minha amiga e meu cunhado, que me deram duas pecinhas que completam tudo, Matheus e Bruno. A tia ama vocês!!

A todos que de alguma forma, estiveram presente ao meu lado e contribuíram para a realização deste trabalho. Novamente, meu muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, em associação com a Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico de Estado do Paraná.

“Não me entrego sem lutar, tenho ainda coração. Não aprendi a me render, que caia o inimigo então.”

(Renato Russo)

Modesto, Kathya Assmann. **Avaliação dos efeitos do arsênio para peixes utilizando-se diferentes biomarcadores e modelos experimentais**. 2021. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

O arsênio é um metaloide amplamente utilizado em diversos tipos de indústrias, na fabricação de agrotóxicos, na mineração e fundição, além de ser liberado na queima de combustíveis fósseis. A grande descarga deste composto no ambiente levou a contaminação de corpos de água por todo o globo, expondo diversas espécies à água contaminada. Os efeitos desse metaloide para organismos aquáticos têm sido avaliados, entretanto ainda são poucos os dados para espécies neotropicais. Além disso, a maioria dos estudos foi realizada com animais expostos ao As por períodos longos de tempo ou a altas concentrações. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos e mecanismos de toxicidade do As utilizando-se diversos biomarcadores e duas espécies de peixes como modelos experimentais, sendo eles juvenis do teleosteo Neotropical *Prochilodus lineatus* (exposições *in vivo*) e a linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* – ZFL (exposições *in vitro*). Para os experimentos *in vivo*, juvenis de *P. lineatus* foram expostos ao As nas concentrações (em $\mu\text{g L}^{-1}$) de 0,1 (As 0,1), 10 (As 10) e 1000 (As 1000) e um grupo foi mantido em água desclorada e constituiu o grupo controle (CTR). Decorrido os tempos experimentais (24 e 96 h), os animais foram anestesiados em benzocaína e o sangue foi retirado pela veia caudal. Em seguida, os peixes foram mortos por secção medular para retirada dos órgãos (fígado, músculo e cérebro). Após a realização de análises hematológicas, o sangue foi centrifugado e o plasma foi armazenado (-20°C) para análise de íons plasmáticos. Os órgãos foram armazenados (-70°C) e posteriormente o fígado foi processado para análises de parâmetros de estresse oxidativo: atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST), conteúdo de glutathione (GSH) e lipoperoxidação (LPO). Em cérebro e músculo foi determinada a atividade da acetilcolinesterase (AChE). Os resultados mais evidentes foram observados após 96 h, nos grupos As 10 e As 1000, nos quais houve redução na concentração plasmática de Na^{+} e aumento de K^{+} , além de aumento na atividade hepática da GPx, SOD e CAT. Também ocorreu inibição da AChE no cérebro, no mesmo tempo experimental. Para os experimentos *in vitro*, células ZFL foram expostas ao As nas concentrações (em $\mu\text{g.L}^{-1}$) de 0,1 (As 0,1), 10 (As 10) e 100 (As 100), ou somente ao PBS (CTR), por 1, 3 e 6 h. Foram avaliadas a viabilidade celular pela funcionalidade mitocondrial (MTT) e integridade da membrana (Azul de Trypan), a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), a capacidade antioxidante total (ACAP) e a genotoxicidade (teste do cometa). Os resultados mais relevantes foram nos grupos As 10 e As 100 após 6 h, nos quais houve diminuição da geração de ERO e aumento da ACAP. Com relação a genotoxicidade, o As promoveu aumento nos danos no DNA nas células ZFL em todos os tempos de exposição. Assim, tanto *P. lineatus* como a linhagem celular ZFL foram sensíveis ao As, demonstrando importantes alterações mesmo após exposição por curto período de tempo e a baixas concentrações do metaloide.

Palavras-chave: *prochilodus lineatus*; linhagem celular ZFL; defesas antioxidantes; genotoxicidade; neurotoxicidade.

Modesto, Kathya Assmann. **Evaluation of arsenic effects on fish using different biomarkers and experimental models**. 2021. 114 p. Thesis (PhD degree in Biological Sciences) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Arsenic is a metalloid widely used in different types of industries, in the production of pesticides, in mining and smelting; in addition, burning of fossil fuels can release As. The large discharge of this compound into the environment has led to a global contamination of water bodies, exposing several species to contaminated water. The effects of this metalloid on aquatic organisms have been evaluated, however there are few data for neotropical species. Furthermore, most studies were performed with animals exposed to As for long periods of time or to high concentrations. Thus, the aim of this work was to evaluate the effects of As and its mechanisms of toxicity using different biomarkers and two fish species as experimental models, juveniles of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* (*in vivo* exposures) and the hepatocyte cell lineage of *Danio rerio* – ZFL (*in vitro* exposures). For the *in vivo* experiments, juveniles of *P. lineatus* were exposed to As concentrations (in $\mu\text{g L}^{-1}$) of 0.1 (As 0.1), 10 (As 10) and 1000 (As 1000) and one group, kept in dechlorinated water, constituted the control group (CTR). After the exposure periods (24 and 96 h), the animals were anesthetized in benzocaine and blood was taken from the caudal vein. Then, the fish were killed by medullary section to remove the organs (liver, muscle, and brain). After performing hematological analyses, the blood was centrifuged, and the plasma was stored (-20°) for the analysis of ions. The organs were stored (-70°) and then the liver was processed for the analysis of oxidative stress parameters: activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST), glutathione content (GSH) and lipoperoxidation (LPO). In brain and muscle, acetylcholinesterase (AChE) activity was determined. The most evident results were observed after 96 h, in the As 10 and As 1000 groups, in which there was a reduction in the plasma concentration of Na^{+} and an increase in K^{+} , in addition to an increase in the hepatic activity of GPx, SOD and CAT. Inhibition of AChE in the brain also occurred at the same experimental time. For the *in vitro* experiments, ZFL cells were exposed to As at concentrations (in $\mu\text{g.L}^{-1}$) of 0.1 (As 0.1), 10 (As 10) and 100 (As 100) or only to PBS (CTR) for 1, 3 and 6 h. It was evaluated cell viability by mitochondrial functionality (MTT) and membrane integrity (Trypan Blue), generation of reactive oxygen species (ROS), total antioxidant capacity (ACAP) and genotoxicity (comet test). The most relevant results were in the As 10 and As 100 groups after 6 h, in which there was a decrease in ROS generation and an increase in ACAP. Regarding genotoxicity, As promoted an increase in DNA damage in ZFL cells at all times of exposure. Thus, both *P. lineatus* and the ZFL cell line were sensitive to As, showing important alterations even after exposure for a short period of time and to low concentrations of the metalloid.

Keywords: *prochilodus lineatus*; ZFL cell line antioxidant defenses; genotoxicity; neurotoxicity.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	
1	INTRODUÇÃO GERAL10
1.1	CONTAMINAÇÃO PELO ARSÊNIO.....10
1.2	METABOLISMO DO AS12
1.3	TOXICIDADE DO AS.....14
1.4	GERAÇÃO DE ERO E ESTRESE OXIDATIVO.....15
1.5	DEFESAS ANTIOXIDANTES.....17
1.6	MODELOS BIOLÓGICOS.....19
1.6.1	Prochilodus lineatus.....19
1.6.2	Linhagem Celular ZFL21
1.7	JUSTIFICATIVA.....22
1.8	HIPÓTESES.....23
2	OBJETIVOS24
2.2	OBJETIVO GERAL.....24
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....24
	REFERÊNCIAS.....25
CAPÍTULO 2	
EFEITOS AGUDOS DO ARSÊNIO PARA PROCHILODUS	
LINEATUS: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS40	
	Resumo40
1	INTRODUÇÃO42
2	MATERIAL E MÉTODOS45
2.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....45
2.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAL.....46
2.3	BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS46
2.4	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS46
2.4.1	Biomarcadores de Estresse Oxidativo.....47
2.4.2	Biomarcador de Neurotoxicidade.....48
2.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....48

3	RESULTADOS	50
3.1	BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS	50
3.2	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	51
3.3	DISCUSSÃO	55
3.4	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO	74

CAPÍTULO 3

	EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS DO ARSÊNIO PARA A LINHAGEM DE HEPATÓCITOS DE DANIO RERIO (ZFL)	76
	Resumo	76

1	INTRODUÇÃO	78
----------	-------------------------	----

2	MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1	EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS ZFL AO AS.....	81
2.2	TESTES DE CITOTOXICIDADE	82
2.3	ENSAIOS BIOQUÍMICOS	83
2.4	ENSAIOS GENOTÓXICOS	83
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	84

3	RESULTADOS	86
3.1	CITOTOXICIDADE	86
3.2	ERO E ACAP.....	87
3.3	GENOTOXICIDADE	89

4	DISCUSSÃO	90
----------	------------------------	----

5	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	96

CAPÍTULO 4

	CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
--	-----------------------------------	-----

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CONTAMINAÇÃO PELO ARSÊNIO

A presença de altas concentrações de metais e metaloides no ambiente constitui um problema global devido à dimensão dos lançamentos de origem antrópica e o seu contínuo aumento nos ecossistemas, atribuído em grande parte à industrialização e ao desenvolvimento urbano (Beveridge et al., 1997). A ação química dos metais tem despertado grande interesse ambiental, principalmente pelo fato de não possuírem caráter de biodegradabilidade. Isso faz com que permaneçam em ciclos biogeoquímicos, sendo o das águas naturais o seu principal meio de condução, podendo haver acumulação na biota aquática em níveis significativamente elevados.

O arsênio (As) é um elemento que possui diversas formas químicas com propriedades metálicas e não metálicas que o definem como metaloide, e o caracterizam como um elemento químico mais complexo, sendo o 20º elemento mais abundante da natureza, o 14º no ambiente marinho e o 12º no corpo humano (Mandal and Suzuki, 2002). O As pode estar presente no meio ambiente por fontes naturais ou antrópicas. A origem natural do As ocorre principalmente através da formação de minerais, como óxidos, arsenetos, arsenatos, sulfetos e sulfossais, sendo que a arsenopirita é o mineral mais comum das mineralizações. A liberação do As a partir de rochas minerais se dá pela oxidação da arsenopirita por O_2 e Fe^{3+} . Este semimetal fica retido nas rochas através da adsorção em óxidos de ferro e argilominerais, e são então disponibilizados pelo intemperismo (Gray et al., 1999; Figueiredo, 2000; Smedley e Kinniburgh, 2002). Regiões com formações geológicas com essas composições estão mais propensas a apresentarem maiores concentrações de As nos solos e sedimentos (Liao et al., 2011). Assim, o intemperismo das rochas e solos, a deposição atmosférica e fenômenos geotermiais e vulcânicos, são responsáveis pela entrada natural de As ao meio ambiente. Entretanto, a maior fonte de descarga deste metaloide é por ação antrópica, já que o mesmo é vastamente utilizado na indústria microeletrônica, curtumes e outros, além de ser utilizado na fabricação de agrotóxicos, também na mineração e fundição, além

de ser liberado na queima de combustíveis fósseis, na conservação da madeira, na fabricação de papel e na produção de ferro e aço (Ng et al., 2003; Gontijo e Bittencourt, 2005). A contaminação por As é um problema global, já que o mesmo está amplamente distribuído pelos solos e corpos de água em todo o mundo (Sun et al., 2019). Como exemplos, pode-se citar os lençóis freáticos em Bangladesh, Índia, aquíferos no Paquistão, Vietnã, China, Estados Unidos, Canadá, México, Nicaraguá e até mesmo na América do Sul, como nos lençóis freáticos na Argentina, Bolívia, além da costa brasileira (Matschullat, 2000; Anawar et al., 2002; Nordstrom, 2002; Smedley et al., 2002; 2005; Barragner-Bigot, 2004;; Bhattacharya et al., 2006b; Nriagu et al., 2007; Bundschuh et al., 2012; Avigliano et al., 2019). No Brasil, as regiões de Mariana, Ouro Preto, Nova Lima e Santa Bárbara, no estado de Minas Gerais, apresentam altas concentrações de As na água e no solo, devido à extensiva exploração mineral. Estima-se que entre 390 e 3.900 t de As já foram introduzidas no ambiente nessa região, onde foram detectadas concentrações de 2 a 2980 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de As em corpos de água e 150 a 390 mg.Kg^{-1} de As no solo (Bundschuh et al., 2012). Em novembro de 2015, o rompimento da barragem de Fundão de propriedade da Samarco S.A., em Mariana (MG), foi um dos maiores desastres de mineração do mundo (Cordeiro et al., 2019). Estima-se que 43-60 milhões de m^3 de resíduos da mineração atingiram a bacia do rio Doce, contaminando mais de 650 km de rios até o Oceano Atlântico (Andrade et al., 2018). Análises no sedimento de lagoas próximas ao rio Doce em 2020, mostraram concentrações de até 78 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de As, sendo que o limite estabelecido pela resolução CONAMA é de 15 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (RRDM, 2020).

No Brasil, além da atividade de mineração, outra importante fonte de descarga de As são os agrotóxicos, considerando que desde 2008 o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (Albuquerque et al., 2016). Assim, a liberação de substâncias contidas nas formulações destes produtos no solo e nos corpos de água é de grande preocupação. Neste sentido, sabe-se que o As é utilizado na fabricação dos chamados agrotóxicos arsenicais. Estes compostos possuem em sua formulação o metano arseniato ácido monossódico (MSMA), o qual é um tipo de arsênio orgânico pentavalente. Esta substância está presente

principalmente em herbicidas utilizados em culturas de algodão, cana de açúcar e citrus, além de inseticidas, formicidas e raticidas (Seródio, 2014).

Estudos demonstram que grandes quantidades de As já foi detectada em peixes, leite de vaca, grãos e vegetais, incluindo batata, cebola, beterraba, abóbora, rabanete, repolho e feijão na Bolívia, Brasil, Chile, Equador, El Salvador, Honduras, México, Nicarágua e Peru (Sigrist et al., 2010). Em pelo menos dois estudos do Chile e do Brasil foi encontrada grande quantidade de As em diferentes espécies de peixes que excedem as concentrações recomendadas pela OMS e pela diretriz atual definida pelo Brasil (Lavanchy Dougnac, 1999; Macedo, 2010). De acordo com a Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR, 2017), o As é classificado em primeiro lugar na lista de substâncias perigosas a saúde humana. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018) a contaminação por As nas águas subterrâneas é generalizada e estima-se que pelo menos 140 milhões de pessoas em 50 países bebam água com As em concentração superior a $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, a qual corresponde a concentração limite para água de consumo humano segundo o mesmo órgão, a mesma concentração permitida pela legislação brasileira para corpos de água doce na resolução CONAMA 357/2005.

1.2 METABOLISMO DO AS

Na água, o As encontra-se disponível nas formas inorgânicas e orgânicas. O As inorgânico é encontrado em quatro estados de oxidação como arsenito (+ III), arsenato (+ V), arsino (-III) e arsênio (0), sendo o arsenito e o arsenato os mais comuns. As espécies inorgânicas tendem a ser mais tóxicas para os organismos, incluindo humanos, outros animais e plantas (Goessler e Kuehnett, 2002; Meharg e Hartley-Whitaker, 2002), sendo que arsenito existente na água traz mais preocupações devido a sua maior toxicidade e dificuldade de remoção (Singh et al., 2015; Fan et al., 2016). A toxicidade do arsênio trivalente é relacionada com a alta afinidade com grupos sulfidrilas de biomoléculas como a glutathione (GSH) e também com grupamentos cisteína de muitas enzimas (Aposhian e Aposhian, 2006). A ligação do As III com esses grupamentos resulta em muitos efeitos prejudiciais, inibindo a atividade de enzimas como a glutathione

redutase e a glutathiona peroxidase, (Schuliga et al., 2002; Wang et al., 1997; Chang et al., 2003). Outro alvo é o ácido lipoico, cuja ligação com o arsênio provoca distúrbios metabólicos, já que várias enzimas oxidativas que necessitam desta coenzima são inibidas, tais como o complexo da piruvato desidrogenase e da alfa-cetoglutarato desidrogenase (Ramanathan et al., 2003). Já o arsenato, devido as suas propriedades bioquímicas serem semelhantes ao fosfato, pode substituí-lo nas reações de fosforilação de transferência de energia, resultando no comprometimento da síntese de ATP (Fattorini e Regoli, 2004). Uma das reações afetadas é catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase que, ao interagir com o arsênio, origina um arseniato lábil que bloqueia a síntese de ATP, fenômeno denominado de arsenólise. O arsenato atua também na respiração celular alterando o metabolismo de NAD e NADH. Com a redução dos níveis de NADH, ocorre um déficit na produção celular de ATP e um aumento na produção de peróxido de hidrogênio, que pode causar estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio (Klaassen, 2001).

Outra diferença entra as duas formas é que o arsenito pode entrar na célula por difusão e através do envolvimento de outros sistemas de transporte como as aquaporinas. Já a entrada do arsenato nas células está ligada a transportadores de fosfato (Thomas, 2007). As formas metiladas, como o monometilarsenato (MMA) e dimetilarsinato (DMA), são consideradas moderadamente tóxicas. Em comparação, o arsenito é sessenta vezes mais tóxico que o arsenato e setenta vezes mais tóxico que as formas metiladas (Akter et al., 2005).

Na água potável, As é normalmente encontrado como As V (arsenato), mas após consumo por humanos e outros organismos, o metaloide sofre rapidamente uma conversão metabólica conhecida como biotransformação (Sakurai et al., 2005). A biotransformação de As (Figura 1) é um processo no qual primeiro o arsenato é convertido em arsenito e depois transformado em mono-, di-, e produtos trimetilados (Thomas et al., 2004). A redução do As V para o As III envolve um processo de metilação, no qual alguns autores sugerem que o antioxidante glutathiona (GSH) desempenhe um papel importante na biotransformação do arsênio como um agente redutor (Kobayashi et al., 2005). Isso porque este processo de redução leva à formação de arsenotriglutathiona

(AsIII (GS)₃), um complexo ao qual As III está ligado às porções tiol dos resíduos cisteinil de três moléculas de GSH (Thomas et al., 2001).

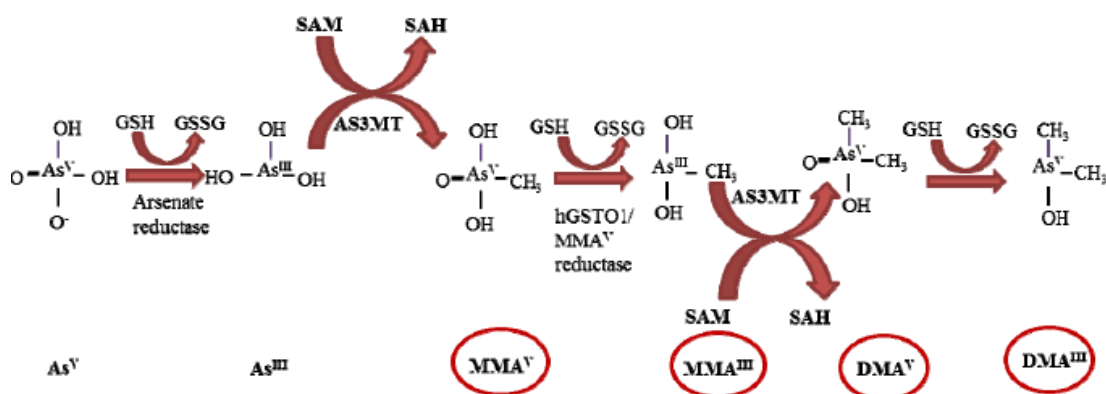


Figura 1. A via de metabolismo do arsênio inorgânico mostrando redução de arsenato (As^{V}) para arsenito (As^{III}) e metilação em formas pentavalentes e trivalentes (enzima metiltransferase (AS3MT), ácido metilarsônico (MMA^{V} e MMA^{III}), ácido dimetilarsínico (DMA^{V} e DMA^{III}). Fonte: Faita e colaboradores, 2013.

1.3 TOXICIDADE DO AS

O alto potencial de toxicidade do arsênio para os seres humanos é bem conhecido devido à facilidade com que estes compostos são absorvidos, seja por via oral ou por inalação. A dose letal média do arsênio para humanos é de $0,07 \text{ g.kg}^{-1}$ (Dani et al, 2008). Quando o As é introduzido no organismo, seja ele orgânico ou inorgânico, é rapidamente convertido a espécies altamente tóxicas que reagem com os grupos sulfidrilas das proteínas, inibindo e bloqueando os processos celulares. O As exerce ações inibitórias em enzimas contendo grupos SH, podendo inibir a síntese de ATP e afetar o metabolismo energético, glicídico e lipídico (Dani, 2008). A intoxicação por As pode resultar em efeitos agudos ou crônicos, resultando em diferentes patologias (Borba et al., 2000). O As é considerado um elemento reconhecidamente carcinogênico para humanos, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer — IARC, um órgão especializado da Organização Mundial da Saúde (Shibata et al., 1992; Aphosian, 1997). A exposição a longo prazo a este metaloide pode levar a várias doenças cardiovasculares e neurológicas, diabetes e doenças respiratórias não

malignas, além de risco aumentado de câncer de pele, bexiga, pulmão e rim (IARC, 2004). Nas últimas décadas, compostos arsenicais têm sido utilizados na medicina como medicamentos e o trióxido de arsênio, bem como outras drogas arsenicais, têm demonstrado eficácia no tratamento de leucemia promielocítica e outros tumores sólidos (Andrew et al., 2004; Dilda et al., 2007).

Em ratos, o As pode causar efeitos no desenvolvimento embrionário, incluindo a diminuição do peso e alterações no desenvolvimento do cérebro fetal e comportamento pós-natal (Hill et al., 2008; Holson et al., 2000; Nemeč et al., 1998; Rodriguez et al., 2002; Tabocova et al., 1996). O As também pode afetar a vasculogênese placentária, aumentar a taxa de abortos espontâneos (Andrew et al. 2006, HE et al. 2007), causar modificações epigenéticas (Xie et al. 2007) e induzir defeitos do tubo neural (Hill et al. 2008).

Para animais aquáticos, estudos demonstram que a exposição ao As aumenta a citotoxicidade em linhagens de células de peixes expostas a arsenito de sódio (Wang et al., 2004; Seok et al., 2007). Estresse oxidativo e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes foram observados no poliqueta *Laonereis acuta* e no peixe *Clarias batrachus*, após exposição ao As_2O_3 (Bhattacharya e Bhattacharya, 2007; Ventura-Lima et al., 2007) Em peixes, a literatura traz relatos diferentes. Ventura Lima e colaboradores (2009a) descrevem aumento nas respostas antioxidantes em brânquias de *Danio rerio* (Cyprinidae) expostos ao arsenato por dois dias. Por outro lado, redução das defesas antioxidantes e ocorrência de danos oxidativos foram observados em *Pangasianodon hypophthalmus* (Singh et al., 2019), *Danio rerio* (Hong et al., 2018) e *Channa punctatus* (Allen et al., 2004), *Carassius auratus* (Bagnyukova et al., 2007) expostos ao arsenito, além de alterações no sistema antioxidante em diferentes tecidos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) após exposição a arsenito e arsenato (Ventura-Lima et al., 2009b).

1.4 GERAÇÃO DE ERO E ESTRESSE OXIDATIVO

A base bioquímica da toxicidade do arsênio tem sido investigada em vários sistemas modelo. Acredita-se que a toxicidade do arsênio pode ser exercida através excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), ou seja, radicais superóxido, hidroxil e peróxil, e peróxido de hidrogênio (Hughes, 2002).

As ERO podem ser geradas em vários locais nas células (nas mitocôndrias, retículo endoplasmático, lisossomos, membranas celulares, peroxissomos e citosol), durante processos metabólicos normais, na sequência de processos de transporte de elétrons e da atividade catalítica de algumas enzimas, autooxidação de compostos solúveis no citosol, bem como por exposição a radiações e metabolização de xenobióticos. Em condições normais, as ERO desempenham um papel importante na regulação dos processos celulares, incluindo a manutenção do potencial redox e a transmissão de sinais celulares (Halliwell e Gutteridge, 2007). Elas também são usadas para combater invasões do corpo por microorganismos (Lushchak, 2011; Regoli e Giuliani, 2014). No entanto, o aumento de ERO pode levar a prejuízos nos seres vivos como a oxidação dos aminoácidos e de grupos sulfidrilas de proteínas, que levam a mudanças na sua conformação e função. Outro efeito das ERO é a oxidação de ácidos graxos, sendo as membranas particularmente susceptíveis a esta degradação (Storey, 1996; Valavanidis et al., 2006). As organelas, em especial as mitocôndrias, também sofrem danos e disfunções provocados pelos altos níveis de ERO, causando a depleção da energia metabólica e consequente diminuição do consumo de oxigênio pelos seres vivos (Lee et al., 2012). Isso porque o As é um potente inibidor da piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase. Tais efeitos inibem o ciclo do ácido cítrico, prejudicando a formação das coenzimas de redução NADH e NADPH, ocasionando redução de produção de ATP e redução no consumo de oxigênio (Ramanathan et al, 2003; Tseng, 2004). Outras formas de arsênio como as espécies inorgânicas podem atuar afetando a NADH desidrogenase e o citocromo C. A diminuição na atividade destas enzimas resultaria na inibição do fluxo de elétrons do NADH/NADPH ao oxigênio, com isso poderia aumentar a produção de ERO e diminuir o consumo de oxigênio. Tais efeitos a longo prazo resultariam na redução da capacidade de síntese de ATP que, dentre outras consequências, pode prejudicar a síntese de glutathione, favorecendo um cenário de estresse oxidativo (Ventura-Lima et al., 2011).

O potencial das ERO em danificar tecidos corresponde ao dano oxidativo e o termo estresse oxidativo se refere à situação em que a célula está exposta a níveis excessivos de ERO, superiores a capacidade antioxidante da célula (Valavanidis et al., 2006), seja pela depleção de antioxidantes celulares ou pela

superprodução de ERO, podendo levar ao estresse oxidativo. Dentre as consequências deste quadro, destaca-se o aumento da hidroxidação de lipídeos (Hong et al., 2018; Zhang et al., 2019). Este dano a estrutura lipídica da membrana plasmática pode gerar consequências severas, até mesmo a ruptura total da membrana. O estresse oxidativo também resulta no enfraquecimento dos mecanismos de reparo celular (Regoli e Giuliani, 2014), levando a danos oxidativos do DNA, proteínas e lipídios (Bau et al. 2002, Shi et al., 2004).

Com relação ao DNA, foi demonstrado que o As não reage diretamente com o DNA (Rossman, 2003) e que o mesmo é considerado um fraco agente mutagênico, pois de fato não causa mutações pontuais características de qualquer mutagênico clássico (Pierce et al., 2002). Uma série de observações experimentais sugere que a genotoxicidade do As está principalmente ligada à geração de ERO durante sua biotransformação (Kessel et al., 2002; Nesnow et al., 2002; Jomova et al., 2011). A produção de ERO é capaz de gerar adutos no DNA, quebras de fita de DNA, ligações cruzadas e aberrações cromossômicas. Assim, o mecanismo de dano genético induzido pelo As é oxidativo, sendo que um dos principais efeitos deste dano ao DNA é a modificação de bases do DNA (Faita et al., 2013).

Além disso, a geração de ERO induzida por As tem sido relacionada com a alteração das vias de sinalização dentro das células e regulação dos fatores de transcrição, que são dois mecanismos que desempenham um papel crucial na carcinogênese (Tapio e Grosche, 2006).

1.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Para combater as ERO e evitar seu acúmulo e efeitos as células contam com um sistema de defesa antioxidante que pode ser enzimático (Figura 2) ou não enzimático. Para peixes, o tripeptídeo glutathiona (GSH) é o principal antioxidante não enzimático utilizado para controlar os níveis de ERO, seja pela interação direta com elas ou servindo de cofator para as enzimas de metabolização das mesmas (Lushchak, 2016). Assim, a GSH e as enzimas dependentes dela formam um sistema que mantém um ambiente intracelular de redução atuando como a principal defesa contra a geração excessiva de ERO (Ventura Lima et al., 2011). Especificamente em relação ao As, a glutathiona tem mostrado servir

como um doador de elétrons para a redução do arsenato a arsenito no organismo, tornando possível a metilação, que ocorre preferencialmente pelo substrato reduzido (AsIII) (Sakurai et al., 2005), além de ser o substrato para monometilarsenato redutase (MMA^V), enzima que catalisa a primeira etapa na metilação do arsênio inorgânico (Aposhian et al., 2004). A glutathiona parece desempenhar um papel importante protegendo as células, hipótese apoiada por estudos que mostram que a resistência à toxicidade do arsênio em células de mamíferos está correlacionado com maiores níveis de GSH (Sakurai et al., 2005) e atividades aumentadas de enzimas relacionadas a GSH, incluindo glutathiona redutase (GR) e glutathiona S-transferase (GST) (Schuliga et al., 2002).

Além da capacidade do arsênio inorgânico de se ligar ao grupo tiol de proteínas e tióis celulares não proteicos, como a GSH (Chouchane e Snow, 2001), também foi atribuído ao mecanismo tóxico do metalóide a alteração na atividade de enzimas antioxidantes como glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Shi et al., 2004; Wang et al., 1996).

A glutathiona redutase (GR) é a enzima responsável pela regeneração da GSH a partir da forma oxidada (GSSG), utilizando NADPH. Estudos demonstram que metabólitos metilados oriundos do metabolismo do arsênio inorgânico podem ser um potente inibidor da GR (Styblo et al., 2001). Esta hipótese também é sustentada por Bhattacharya e Bhattacharya (2007), considerando peixes expostos a baixas concentrações de As. Já Schuliga e colaboradores (2002) mostraram que em estudos *in vitro*, as exposições agudas a concentrações subcitotóxicas de As levaram a um aumento da atividade da GR.

A SOD é uma metaloenzima pertencente a classe das oxirredutases, responsável por catalisar a reação entre o ânion superóxido (O₂⁻) e a água, formando peróxido de hidrogênio. A sensibilidade da SOD a metais é reconhecida, o que possibilita o seu uso como biomarcador em vários organismos que apresentam alterações em suas atividades enzimáticas (Vutukuru et al., 2006), sendo que essas alterações podem ser muito variadas frente a exposição a diferentes metais. A CAT também é uma oxirredutase responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio, principalmente nos peroxissomos. A GPx é uma outra importante peroxidase encontrada na via antioxidante, catalisando a decomposição de

vários hidroperóxidos orgânicos, inclusive o peróxido de hidrogênio, utilizando o tripeptídeo glutationa (GSH) como substrato. O aumento na atividade da SOD e na GPx tem sido associada a exposição ao As (Liu et al., 2001, Shi et al., 2004) e Bhattacharya e Bhattacharya (2007) afirmam que os efeitos oxidativos do As são mediados pelo H₂O₂, sendo que altas concentrações deste composto poderiam inibir a ação da CAT.

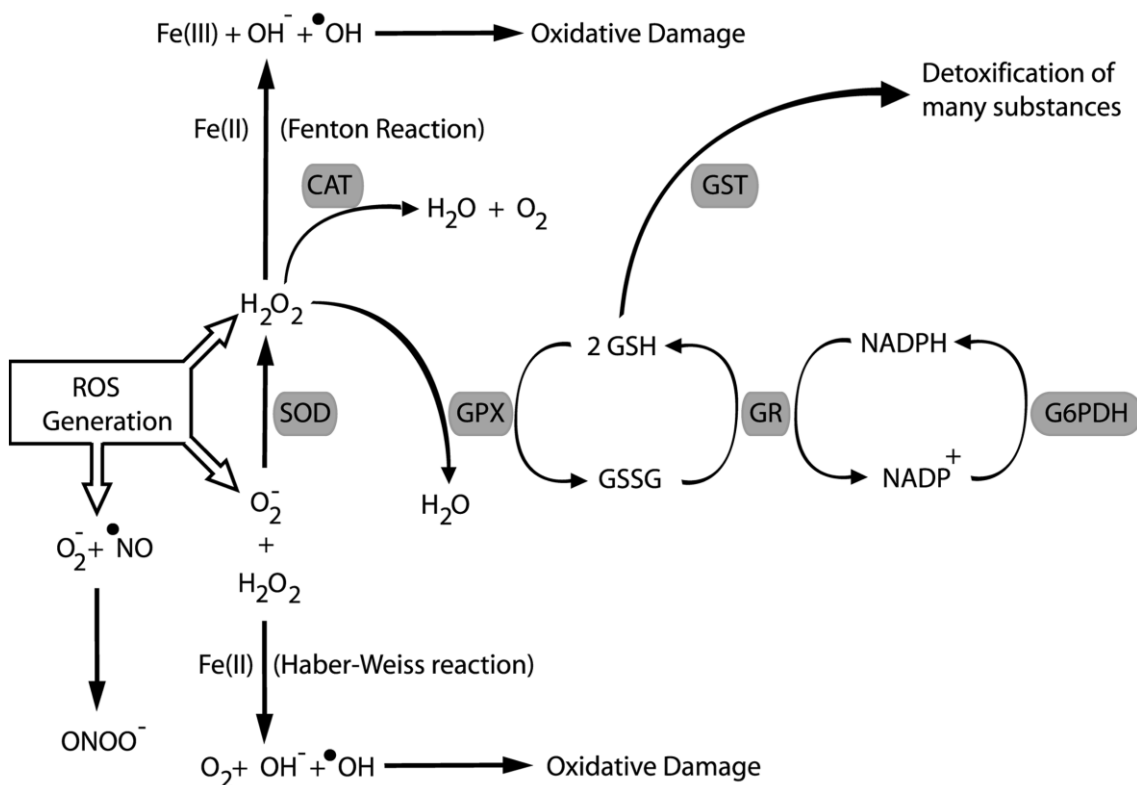


Figura 2. Defesas antioxidantes enzimáticas responsáveis pela proteção celular contra espécies reativas de oxigênio. As abreviações SOD, CAT, GST, GR, GPX e G6PDH representam as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutationa S-transferase, glutationa redutase, glutationa peroxidase e glicose -6- fosfato desidrogenase, respectivamente. Fonte: Hermes Lima, 2004.

1.6 MODELOS BIOLÓGICOS

1.6.1 *Prochilodus lineatus*

Os peixes têm sido utilizados em ensaios de avaliação do impacto ambiental de produtos químicos diversos, para avaliações de efluentes e monitoramento

da qualidade de águas superficiais (García-Camberso et al. 2012; Galus et al. 2013). O gênero *Prochilodus* possui 13 espécies descritas até o momento e destaca-se por sua ampla distribuição na região Neotropical (Reis et al., 2003).

A espécie *P. lineatus* (Valenciennes, 1836) (Figura 3), conhecida popularmente como curimatá, encontra-se amplamente distribuída em toda a bacia dos rios Paraná-Paraguai e no Rio Paraíba do Sul (na costa sudeste do Brasil) (Castro, 1990). Esta espécie é abundante na região do Alto rio Paraná e segundo Shibata et al. (2007) é a terceira espécie de maior ocorrência na bacia hidrográfica do rio Tibagi. Os indivíduos da família Prochilodontidae chegam a representar de 50 a 80% da biomassa de peixes em um rio (Taylor et al., 2006). Além disso, *P. lineatus* desempenha importante papel ecológico (Botta et al., 2010; Costa Filho e Gaya, 2012) e tem grande importância econômica, destacando-se como fonte de renda e proteína para a população humana (Agostinho e Gomes, 2005). Outra característica importante de *P. lineatus* é sua sensibilidade a xenobióticos avaliada em testes ecotoxicológicos com poluentes de naturezas diversas e as características alimentares desta espécie, já que se alimentam preferencialmente de sedimentos, o que o torna vulnerável a contaminantes presentes tanto na água quanto no sedimento. Diversos trabalhos realizados em nosso laboratório já demonstraram a sensibilidade desta espécie a diversos metais, como chumbo (Ribeiro et al., 2014), cobre (Simonato et al., 2016), alumínio (Camargo et al., 2009), níquel (Palermo et al., 2015) e cádmio (Silva e Martinez, 2014) e compostos orgânicos, como os herbicidas glifosato (Modesto e Martinez, 2010), atrazina (Santos e Martinez, 2012) e clomazone (Pereira et al., 2013) e o inseticida endossulfan (Bacchetta et al., 2011), além de derivados do petróleo, como a gasolina (Simonato et al., 2011) e diesel (Vanzela et al., 2007).



Figura 3. Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus* utilizado nesta tese. Fonte: C.E.D. Vieira.

1.6.2 Linhagem celular ZFL

Os contaminantes exercem seus efeitos por meio de diversos mecanismos moleculares, portanto, há uma necessidade de modelos de células para monitoramento e estudos funcionais como alternativas para estudos de exposição *in vivo* em toxicologia (Eide et al., 2014). O uso de modelos alternativos *in vitro* para testes de toxicidade e avaliação de mecanismos de ação de contaminantes tem crescido nos últimos anos e diversas culturas de células hepáticas foram estabelecidas para aplicações de testes de toxicidade de compostos, visto que o órgão alvo principal para a maioria das toxinas é o fígado (Huang e Huang, 2012). A linhagem celular *Zebrafish-Liver* (ZF-L) (Figura 4) é derivada de hepatócitos do peixe *Danio rerio*. São células aderentes que possuem morfologia típica de epitélio, apresentando as propriedades características das células parenquimatosas do fígado mesmo após 100 gerações em cultura, sendo um ótimo modelo *in vitro* para estudos de metabolismo hepático e formação de metabólitos de xenobióticos (Ghosh et al., 1994), além de possuir seu genoma sequenciado (Lele e Krone, 1996). É importante ressaltar que o alto número de genes semelhantes aos correspondentes para o genoma humano torna o peixe-zebra um modelo de vertebrado útil também na biomedicina humana (Aleström et al., 2006). Atualmente, muitos estudos toxicológicos envolvendo células ZFL têm sido realizados e o uso dessas células está em constante crescimento (Seok et al., 2007; Cheuk et al., 2008; Chen et al., 2014; Azevedo Costa et al., 2012; Kwok e Chan, 2020).

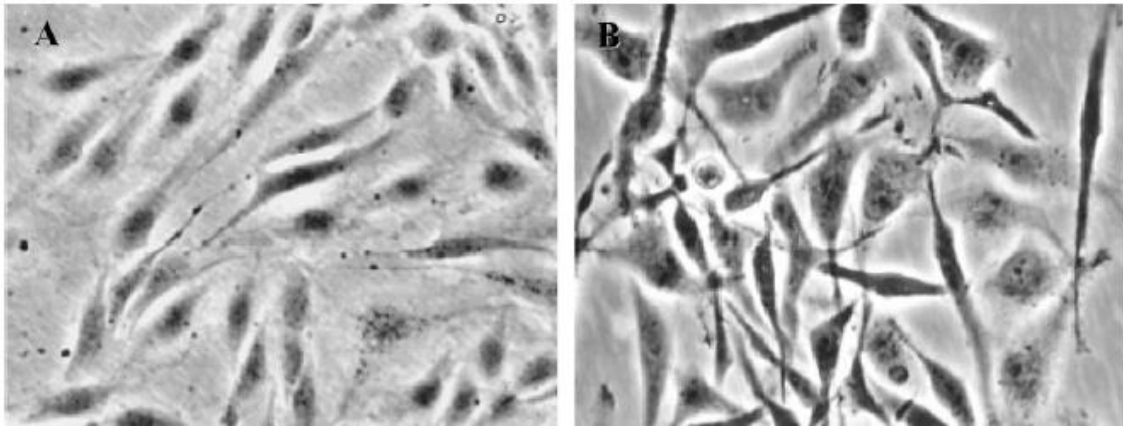


Figura 4. Cultura de células ZFL observadas com auxílio de microscópio invertido. Fonte: Wang e colaboradores, 2004.

1.7 JUSTIFICATIVA

A contaminação da água por arsênio em todo o mundo é generalizada e por isso seus efeitos em organismos aquáticos têm sido avaliados pela ecotoxicologia. No entanto, a toxicidade deste composto pode depender da espécie estudada e das características químicas da água. Contudo, a grande maioria dos estudos que avaliam os efeitos do arsênio em peixes está restrita a ambientes temperados. As características físicas, químicas e biológicas dos ecossistemas aquáticos da região Neotropical diferem dos ambientes temperados, assim como a ictiofauna. A região Neotropical é um *hotspot* de diversidade no que diz respeito aos peixes de água doce. Assim, avaliar os efeitos do As em *P. lineatus*, por meio de múltiplos biomarcadores, deve ajudar a elencar modelos biológicos mais sensíveis para o biomonitoramento dos ecossistemas aquáticos neotropicais.

Adicionalmente, visando avaliar respostas em um ambiente mais controlado, foram feitos também exposições com cultura de células ZFL. Os testes ecotoxicológicos com culturas de células tem se tornado cada vez mais frequentes por apresentarem diversas vantagens, já que limitam o número de variáveis experimentais, fornecem dados significativos mais facilmente, o período de teste é mais curto, são financeiramente mais acessíveis, produzem menos resíduos, além de evitar a morte de dezenas de animais.

Em ambos os testes, *in vivo* e *in vitro*, as concentrações escolhidas foram baseadas na legislação brasileira. Assim, para verificar a segurança das

concentrações previstas na legislação brasileira para essas espécies, esta tese busca compreender melhor os principais mecanismos de toxicidade do As para peixes e relações causa e efeito nestas espécies.

1.8 HIPÓTESES

1. A exposição ao As causará alterações nos biomarcadores apenas quando os peixes forem expostos a concentrações de As maiores do que os limites estabelecidos na Resolução CONAMA 357/2005.
2. Alguns biomarcadores serão mais representativos dos efeitos do As para uma espécie de peixe Neotropical.
3. O mecanismo de toxicidade do As está relacionado a um desequilíbrio redox que resulta em um aumento pró-oxidante (geração de ERO).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos e mecanismos de toxicidade do arsênio utilizando-se diversos biomarcadores e dois modelos experimentais: juvenis de *Prochilodus lineatus* (exposições *in vivo*) e a linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* – ZF-L (exposições *in vitro*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos agudos do As para *P. lineatus* utilizando:

- Biomarcadores bioquímicos, associados ao estresse oxidativo (antioxidantes e danos oxidativos) e neurotoxicidade (atividade da acetilcolinesterase)
- Biomarcadores fisiológicos (íons plasmáticos e hematologia)

Avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do arsênio para a linhagem celular de hepatócitos de *Danio rerio* (ZF-L) por meio da avaliação de:

- Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO)
- Capacidade antioxidante total destas células
- Ocorrência de danos no DNA (teste do cometa)

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. F., RIBEIRO, J. S., KUMMROW, F., NOGUEIRA, A. J. A., MONTAGNER, C. C., & UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, 18(7), 779-787, 2016.
- ALESTRÖM, P., HOLTER, J.L., NOURIZADEH-LILLABADI, R., Zebrafish in functionalgenomics and aquatic biomedicine. **Trends Biotechnology**. 24, p. 15–21, 2006.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. O manejo da pesca em reservatórios da bacia do alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. In: NOGUEIRA, Marcos Gomes; HENRY, Raoul; JORCIN, Adriana (Org.). Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata. São Carlos: **RiMa**, cap.2, p. [23]-55, 2005.
- AKTER, K.F., OWENS, G., DAVEY, D.E., NAIDU, R. Arsenic speciation and toxicity in biological systems. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 184, p. 97–149, 2005.
- ALLEN, T., SINGHAL, R.; RANA, S.V.S. Resistance to oxidative stress in a freshwater fish *Channa punctatus* after exposure to inorganic arsenic. **Biological Trace Element Research**. v. 98, p. 63–72, 2004.
- ANAWAR, H.M., AKAI, J., MOSTOFA, K.M., SAFIULLAH, S., TAREQ, S.M. Arsenic poisoning in groundwater: health risk and geochemical sources in Bangladesh. **Environment International**. V. 27, p. 597–604, 2002.
- ANDREW M, TALLMAN MS, GARTENHAUS RB. The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, and future. **Leukemia Research**, v. 28, p. 891-900, 2004.
- ANDREW AS, BURGESS JL, MEZA MM, DEMIDENKO E, WAUGH MG, HAMILTON JW, KARAGAS MR. Arsenic exposure is associated with decreased DNA repair in vitro and in individuals exposed to drinking water arsenic. **Environmental Health Perspect**, v. 114, p. 1193–1199, 2006.

Aposhian, HV. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. V. 37, p. 397-419, 1997.

APOSHIAN, H.V., ZAKHARYAN, R.A., AVRAN, M.D., SAMPAYO-REYES, A., WOLLENBERG, M.L. A review of the enzymology of arsenic metabolism and new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 198, p. 97–149, 2004.

APOSHIAN HV, APOSHIAN MM. Arsenic toxicology: five questions. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, p. 1–15, 2006.

ATSDR. Interaction Profiles for Toxic Substances. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, 2017.

AVIGLIANO, E., CLAVIJO, C., SCARABOTTI, P., SANCHEZ, S., LLAMAZARES VEGH, S., DEL ROSSO, F.R., CAFFETTI, J.D., FACETTI, J.F., DOMANICO, A., VOLPEDO, A.V. Exposure to 19 elements via water ingestion and dermal contact in several South American environments (La Plata Basin): from Andes and Atlantic Forest to sea front. **Microchemical Journal**, v.149, p.103986, 2019.

AZEVEDO COSTA, C.L., CHAVES, I.S., VENTURA-LIMA, J., FERREIRA, J.L., FERRAZ, L., DE CARVALHO, L.M., MONSERRAT, J.M. In vitro evaluation of co-exposure of arsenium and an organic nanomaterial (fullerene, C₆₀) in zebrafish hepatocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 155, p. 206-12, 2012.

BAGNYUKOVA, T.V., LUZHNA, L.I., POGRIBNY, I.P., LUSHCHAK, V.I. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, p. 658–665, 2007.

BARRAGNER-BIGOT, P. Contribución al estudio de cinco zonas contaminadas naturalmente por Arsénico en Nicaragua. In: Morega O, editor. UNICEF report. Managua, Nicaragua: UNICEF Publication; 2004.

BACCHETTA, C., CAZENAVE, J., PARMA, M. J. Responses of biochemical markers in 26 the fish *Prochilodus lineatus* exposed to a commercial formulation of endosulfan. **27 Water, Air, & Soil Pollution**, v. 216, p. 39-49, 2011.

BAU, D.T., WANG, T.S., CHUNG ,C.H., WANG, A.S., JAN, K.Y. Oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links are the major DNA lesions induced by arsenite. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p.753-756, 2002.

BEVERIDGE TJ, HUGHES MN, LEE H, LEUNG KT, POOLE RK, SAVVAIDIS I, SILVER S, TREVORS JT. Metal-microbe interactions: contemporary approaches. **Advances in Microbial Physiology**, v.38, p. 177-243, 1997.

BHATTACHARYA P, CLAEISSON M, BUNDSCHUH J, SRACEK O, FAGERBERG J, JACKS G, MARTIN RA, STORNILO ADEL R, THIR JM. Distribution and mobility of arsenic in the Rio Dulce alluvial aquifers in Santiago del Estero Province, Argentina. *Science of the Total Environment*, v. 358, p. 97–120, 2006.

BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYYA, A.; ROY, S. Arsenic-Induced Responses in Freshwater Teleosts, v. 33, p. 463-473, 2007.

BORBA, R.P., FIGUEIREDO, B.R., RAWLINS, B.G., MATSCHULLAT, J. Arsenic in water and sediment in the Iron Quadrangle, Minas Gerais state, Brazil. **Revista Brasileira de Geociencias**, v.20, p. 554–557, 2000.

BOTTA, P., SCIARA, A., ARRANZ, S., MURGAS, L. D. S., PEREIRA, G. J. M., & OBERLENDER, G. Estudio del desarrollo embrionario del sábalo (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de medicina veterinaria**, v.42, p. 109-114, 2010.

BUNDSCHUH, J.; LITTER, M. I.; PARVEZ, F.; ROMÁN-ROS, G.; NICOLLI, H. B.; JEAN, J. S.; LIU, C. W.; LÓPEZ, D.; ARMIENTA, M. A.; GUILHERME, L. R. G.; CUEVAS, A. G.; CORNEJO, L.; CUMBAL, L.; TOUJAGUEZ, R. One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. **Science of the Total Environment**. v.429, p. 2–35, 2012.

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.

CASTRO, R. M. C. Revisão taxonômica da família Prochilodontidae (Ostariophysi: 1 Characiformes). Unpublished Ph.D. dissertation. São Paulo: Universidade de São Paulo. 293pp, 1990.

CHANG, K.N., LEE, T.C., TAM, M.F., CHEN, Y.C., LEE, L.W., LEE, S.Y., LIN, P.J., HUANG, R.N. Identification of galectin I and thioredoxin peroxidase II as two arsenic-binding proteins in Chinese hamster ovary cells. **Biochemical Journal**, v.371, p. 495–503, 2003.

CHEN YY, ZHU JY, CHAN KM. Effects of cadmium on cell proliferation, apoptosis, and proto-oncogene expression in zebrafish liver cells. **Aquatic Toxicology**, v. 157, p. 196-206, 2014.

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.

CHOUCHANE, S., SNOW, E.T. In vitro effect of arsenical compounds on glutathione-related enzymes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, p. 517-522, 2001.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005.

CORDEIRO, M.C., GARCIA, G.D., ROCHA, A.M., TSCHOEKE, D.A., CAMPEÃO, M.E., APPOLINARIO, L.R., SOARES, A.C., LEOMIL, L., FROES, A., BAHIANSE, L., REZENDE, C.E., DE ALMEIDA, M.G., RANGEL, T.P., DE OLIVEIRA, B.C.V., DE ALMEIDA, D.Q.R., THOMPSON, M.C., THOMPSON, C.C., THOMPSON, F.L., Insights on the freshwater microbiomes metabolic changes associated with the world's largest mining disaster. *Sci. Total Environ.* 654, 1209–1217, 2019.

COSTA FILHO, J., DE GENOVA GAYA, L. Recent approaches of fish breeding. 17 Abordagens recentes do melhoramento genético de peixes. **Ambiência**, v. 8, p. 195, 2012.

DANI, S.U. Efeitos da exposição crônica ao arsênio sobre a saúde: revisão da literatura e perspectivas para o futuro. Em: alertaparacatu.blogspot.com.br/2008/01/efeitos-da-exposio-crnica-ao-arsnio.html, 2008.

DILDA, P.J., HOGG, P.J. Arsenical-based cancer drugs. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, p. 542-64, 2007.

EIDE M, RUSTEN M, MALE R, JENSEN KH, GOKSØYR A. A characterization of the ZFL cell line and primary hepatocytes as in vitro liver cell models for the zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 147, p. 7-17, 2014.

EMBRY, M. R., BELANGER, S. E., BRAUNBECK, T. A., GALAY-BURGOS, M., HALDER, M., HINTON, D. E., WHALE, G. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquatic Toxicology**, v. 97, p. 79-87, 2010.

FAITA F, CORI L, BIANCHI F, ANDREASSI MG. Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, p. 1527-1546, 2013.

FAN, C.-S., TSENG, S.-C., LI, K.-C., HOU, C.-H. Electro-removal of arsenic (III) and arsenic (V) from aqueous solutions by capacitive deionization. **Journal Hazard Mater**, v. 312, p.208-215, 2016.

FATTORINI, D., REGOLI, F. Arsenic speciation in tissues of the Mediterranean polychaete *Sabella spalanzanii*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 1881–1887, 2004.

FIGUEIREDO, B.R. Minérios e Ambiente. **Editores da Unicamp**, Campinas, São Paulo, 2000, 401p.

GALUS, M., JEYARANJAAN, J., SMITH, E., LI, H., METCALFE, C., & WILSON, J. Y. Chronic 23 effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in 24 zebrafish. **Aquatic toxicology**, v. 132, p. 212-222, 2013.

GARCÍA-CAMBERO, J. P., CATALÁ, M., & VALCÁRCEL, Y. River waters induced 26 neurotoxicity in an embryo–larval zebrafish model. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 84, p. 84-91, 2012.

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.

GOESSLER W, KUEHNETT D. Analytical methods for the determination of arsenic and arsenic compounds in the environment. In: Frankenberger Jr WTT, editor. Environmental chemistry of arsenic. New York, USA: Marcel Dekker;. p. 27–50, 2002.

GONTIJO, B.; BITTENCOURT, F. Arsênio: uma revisão história. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.80, p. 81-85. 2005.

GRAY, D. J.; WILDMAN, J.E.; LONGMAN, G.D. Selective and partial extraction analyses of transported overburden for gold exploration in the Yilgarn Craton, Western Australia. **Journal of Geochemical Exploration**, v.67, p.51–66, 1999.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. New York: **Oxford University Press**, 963 pp, 2007.

HE W, GREENWELL RJ, BROOKS DM, CALDERON-GARCIDUENAS L, BEALL HD, COFFIN JD. Arsenic exposure in pregnant mice disrupts placental vasculogenesis and causes spontaneous abortion. **Toxicological Sciences**, v. 99, p. 244– 253, 2007.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Storey, K.B., Ed., Functional Metabolism: Regulation and Adaptation, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 319-368, 2004.

HILL, B.J., WLODARCZYK, B.J., FINNELL, R.H. Reproductive consequences of oral arsenate exposure during pregnancy in a mouse model, **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 83, p. 40–47, 2008.

HOLSON ET AL., 2000 J.F. HOLSON, D.G. STUMP, K.J. CLEVIDENCE, J.F. KNAPP AND C.H. FARR, Evaluation of the prenatal developmental toxicity of orally administered arsenic trioxide in rats, **Food Chemical Toxicology**, v. 38, p. 459–466, 2000.

HONG, S., CHOI, S.D., KHIM, J.S. Arsenic speciation in environmental multimídia samples from the Youngsan River Estuary, Korea: a comparison

between freshwater and saltwater. **Environmental Pollution**. V. 237, p. 842–850, 2018.

HUANG, Q., HUANG H. Alterations of profile in zebrafish liver cells exposed to methyl parathion: A membrane proteomics approach. **Chemosphere**, v. 87, p. 68-76, 2012.

HUGHES, M. F. Arsenic toxicity and potencial mechanisms of action. **Toxicology Letters**. v.133, p. 1-16, 2002.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. **IARC Monographs On The Identification Of Carcinogenic Hazards To Humans**, v. 84, p. 1–477, 2004.

JOMOVA, K.; JENISOVA, Z.; FESZTEROVA, M.; BAROS, S.; LISKA, J.; HUDECOVA, D.; RHODES, C.J.; VALKO, M. Arsenic: Toxicity, oxidative stress and human disease. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, p. 95–107, 2011.

KESSEL, M.; LIU, S.X.; XU, A.; SANTELLA, R.; HEI, T.K. Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, p. 301–308, 2002.

KLAASSEN CD, Watkins JB. Handbook of Toxicology, Chapter 23: "Toxic Effects of Metals", Mc Graw-Hill Interamericana, 2001.

KOBAYASHI, Y.; CUI, X.; HIRANO, S. Stability of As metabolites As-triglutathione [As (GS) 3] and methylAs diglutathione [CH3As (GS) 2], in rat bile. **Toxicol**. v. 211, p. 115–123, 2005.

KWOK ML, CHAN KM. Oxidative stress and apoptotic effects of copper and cadmium in the zebrafish liver cell line ZFL. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 822-835, 2020.

LAVANCHY DOUGNAC, M. Efectos de la contaminación por arsénico del Río Loa en moluscos del litoral de la primera y segunda regiones. Proceedings XIII Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental AIDIS; 1999

LEE, J.; GIORDANO, S.; ZHANG, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. **Biochemical Journal**, v.441, p. 523–540, 2012.

LELE Z., KRONE P. H., 1996. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**, v. 4, p. 57-72, 1996.

LIAO, V. H-C.; CHU, Y-J.; SU, Y-C.; LIN, P-C.; HWANG, Y-H.; LIU, C-W.; LIAO, C-M.; CHANG, F-J.; YU, C-W. Assessing the mechanisms controlling the mobilization of arsenic in the arsenic contaminated shallow alluvial aquifer in the blackfoot disease endemic area. **Journal of Hazardous Materials**. v.197, p. 397– 403, 2011.

LIU, C.H., LIU, Y., POWELL, D.A., WAALKES, M.P., KLAASSEN, C.D. Multidrugresistance mdr-1a/1b double knockout mice are more sensitive than wild type mice to acute arsenic toxicity, with higher arsenic accumulation in tissues. **Toxicology**, v. 170, p. 55–62, 2001.

Lushchak, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 13–30, 2011.

Lushchak VI. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.42, p. 711-47, 2016.

MACEDO LFL. Remoção de mercúrio e arsênio em caçãozul, *Prionace glauca*. São Paulo, Brazil: MSc Thesis, Universidade de São Paulo. 2010.

MANDAL, B.K., SUZUKI, K.T. Arsenic round the world: A review. **Talanta**, v. 58, p. 201-235, 2002.

MATSCHULLAT, J. Arsenic in the geosphere—a review. **Science of the Total Environment**, v.249, p.297–312, 2000.

MEHARG AA, HARTLEY-WHITAKER J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and non-resistant plant species. **New Phytologist**, v.154, p. 29–43, 2002.

MODESTO, K. A., MARTINEZ, C. B. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, p. 81, p. 781-787, 2010.

NARANMANDURA, H., IBATA, K., SUZUKI, K.T. Toxicity of dimethylmonothioarsenic acid toward human epidermoid carcinoma A431 cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 1120–1125, 2007.

NEMEC M.D., HOLSON J.F., FARR C.H. AND HOOD R.D., Developmental toxicity assessment of arsenic acid in mice and rabbits. **Reproductive Toxicology**, p. 647–658, 1998.

NESNOW, S.; ROOP, B.C.; LAMBERT, G.; KADIISKA, M.; MASON, R.P.; CULLEN, W.R.; MASS, M.J. DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. **Chemical Research in Toxicology**, v.15, p. 1627–1634, 2002.

NG, J. C.; WANG, J.; SHRAIN, A. A global health problem caused by arsenic from natural sources. **Chemosphere**. v.52, p. 1353-1359, 2003.

NORDSTROM, D.K. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. **Science**, v. 296, p. 2143–2145, 2002.

NRIAGU JO, BHATTACHARYA P, MUKHERJEE AB, BUNDSCHUH J, ZEVENHOVEN R, LOEPPERT RH. Arsenic in soil and groundwater: an introduction. In: BHATTACHARYA, P, MUKHERJEE, AB, BUNDSCHUH, J, ZEVENHOVEN, R, LOEPPERT, RH, editors. Arsenic in soil and groundwater environment: biogeochemical interactions, health effects and remediation. **Trace Metals and other Contaminants in the Environment Environment** vol. 9 (Series Editor Nriagu, JO), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p. 1–58, 2007.

PALERMO, F. F., RISSO, W. E., SIMONATO, J. D., & MARTINEZ, C. B. 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, L., FERNANDES, M. N., & MARTINEZ, C. B. Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 36, p. 1-8, 2013.

PIERCE, B.L.; KIBRIYA, M.G.; TONG, L.; JASMINE, F.; ARGOS, M.; ROY, S.; PAUL-BRUTUS, R.; RAHAMAN, R.; RAKIBUZ-ZAMAN, M.; PARVEZ, F.; Genome-wide association study identifies chromosome 10q24.32 variants associated with arsenic metabolism and toxicity phenotypes in Bangladesh. **PLoS Genetics**, v. 8, e1002522, 2012.

RAMANATHAN K, SHILA S, KUMARAN S, PANNEERSELVAM C. (2003). Ascorbic acid and alphatocopherol as potent modulators on arsenic induced toxicity in mitochondria. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.14, p.416-420, 2003.

REGOLI F, GIULIANI ME. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 93, p.106-117, 2014.

REIS, R. E., KULLANDER, S. O., & FERRARIS, C. J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, 2003.

RIBEIRO, A. M., RISSO, W. E., FERNANDES, M. N., & MARTINEZ, C. B. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, p. 645-657, 2014.

RODRÍGUEZ VM, CARRIZALES L, MENDOZA MS, FAJARDO OR, GIORDANO M., Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 24, p. 743-50, 2002.ROSSMAN, T.G. Mechanism of arsenic carcinogenesis: An integrated approach. **Mutation Research**, v.533, p. 37–65, 2003.

RRDM, 2020. Relatório Anual 2020 do PMBA/Fest-RRDM - Evolução Espaço-Temporal na Qualidade Ambiental e na Biodiversidade no Ambiente Dulcícola - RT-36B RRDM/DEZ 20. Fundação Espírito-santense de Tecnologia (Fest)/Rede Rio Doce Mar (RRDM), Vitória, ES, Brazil, 494 pp. Available at: http://flacso.org.br/?page_id=24853

SAKURAI T.; OCHIAI, M.; KOJIMA, C.; OHTA, T.; SAKURAI, M.H.; TAKADA, N.O.; QU, W.; WAALKES, M.P.; HIMENO, S.; FUJIWARA, K. Preventive mechanism of cellular glutathione in monomethylarsonic acid-induced cytolethality. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, p.54-65, 2005.

SANTOS, E. C. O; JESUS, I. M; BRABO, E. S; FAYAL, K. F; FILHO, G. C. S; LIMA, M. O; MIRANDA, A. M. M; MASCARENHAS, A. S; SÁ, L. L. C; SILVA, A. P; CÂMARA, V. M; Exposição ao mercúrio e ao arsênio em estados da Amazônia: Síntese dos estudos do Instituto Evandro Chagas. FUNASA; 2003.

SANTOS, T. G., & MARTINEZ, C. B. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. **Chemosphere**, v. 89, p. 1118-1125, 2012.

SCHULIGA M, CHOUCANE S, SNOW ET. Upregulation of glutathione-related genes and enzyme activities in cultured human cells by sublethal concentration of inorganic arsenic. **Toxicological Sciences**, v.70, p. 183–92, 2002.

SEOK, S.H., BAEK, M.W., LEE, H.Y., KIM, D.J., NA, Y.R., NOH, K.J., PARK, S.H., LEE, H.K., LEE, B.H., RYU D.Y., PARK, J.H. Arsenite induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 870–877, 2007.

SHI H, HUDSON LG, DING W, WANG S, COOPER KL, LIU S, CHEN Y, SHI X, LIU KJ., Arsenite causes DNA damage in keratinocytes via generation of hydroxyl radicals. **Chemical Research in Toxicology**, v.17, p. 871-8, 2004.

SHIBATA Y, MORITA M, FUWA K. Selenium and arsenic in biology: their chemical forms and biological functions. **Advances in Biophysics**, v. 28, p. 31-80, 1992.

SHIBATTA, O.A., GEALH, A. M., BENNEMANN, S. T. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica* [en linea]. v. 7, p.125-134, 2007.

SIMONATO, J. D., FERNANDES, M. N., & MARTINEZ, C. B. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 1400-1410, 2011.

SIMONATO, J. D., MELA, M., DORIA, H. B., GUILOSKI, I. C., RANDI, M. A., CARVALHO, P. S., MARTINEZ, C. B. Biomarkers of waterborne copper exposure in the 18 Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 31-41, 2016.

SILVA, A. O., & MARTINEZ, C. B. Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. **Aquatic toxicology**, v. 156, p. 161-168, 2014.

SMEDLEY, P. L.; KINNIBURGH, D. G. **Applied Geochemistry**, v.17, p.517-568, 2002.

SMEDLEY PL, NICOLLI HB, MACDONALD DMJ, BARROS AJ, TULLIO JO. Hydrochemistry of arsenic and other inorganic constituents in groundwater from La Pampa, Argentina. **Applied Geochemistry**, v. 17p. 259–84, 2002.

SMEDLEY, P.L., KINNIBURGH, D.G., MACDONALD, D.M.J., NICOLL, H.B., BARROS, A.J., TULLIO, J.O. Arsenic associations in sediments from the loess aquifer of La Pampa, Argentina. **Applied Geochemistry**, v.20, p. 989–1016, 2005.

SINGH, R., SINGH, S., PARIHAR, P., SINGH, V.P., PRASAD, S.M. Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: a review. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 112, p. 247-270, 2015.

SINGH, M., KHAN, H., VERMA, Y., RANA, S.V.S., 2019. Distinctive fingerprints of genotoxicity induced by As, Cr, Cd, and Ni in a freshwater fish. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 19, p. 19445-19452, 2019.

SIGRIST M, BELDOMÉNCO H, REPETTI MR. Evaluation of the influence of arsenic levels in cow's raw milk from Argentinean dairy farms. **Food Chemistry**, v. 121, p. 487–91, 2010.

STYBLO, M., THOMAS, D.J. Selenium Modifies the Metabolism and Toxicity of Arsenic in Primary Rat Hepatocytes, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 172, p. 52-61,2001.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptation in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.1715-1733, 1996.

TABACOVA, S., HUNTER III, E.S., GLADEN, B.C. Developmental toxicity of inorganic arsenic in whole embryo culture: oxidation state, dose, time, and gestational age dependence. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 138, 298–307, 1996.

TAPIO, S.; GROSCHE, B. Arsenic in the aetiology of cancer. **Mutation Research**, v. 612, p.215–246, 2006.

TAYLOR, B. W., FLECKER, A. S., & HALL, R. O. (2006). Loss of a harvested fish species disrupts 21 carbon flow in a diverse tropical river. *Science*, 313(5788), 833-836, 2006.

THOMAS, D. J.; STYBLO, M.; LIN, S. The Cellular metabolism and systemictoxicity of arsenic. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.176, p.127-144, 2001.

THOMAS, D. J.; WATERS, S. B.; STYBLO, M. Elucidating the pathway for arsenic methylation. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.198, p.319-326, 2004.

THOMAS, D.J. Molecular process in cellular arsenic metabolism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 222, p. 365–373, 2007.

TSENG CH., The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.197, p.67-83. Review, 2004.

VALAVANIDIS A., VLAHOGIANNI T., DASSENAKIS M., SCOULLOS M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v.64, p. 178-189, 2006.

VANZELLA, T. P., MARTINEZ, C. B. R., & CÓLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 631, p. 36-43, 2007.

VENTURA-LIMA, J, SANDRINI, J.Z., FERREIRA-CRAVO, M., PIEDRAS, F.R., MORAES, T.B., FATTORINI, D., NOTTI, A., REGOLI, F., GERACITANO, L.A., MARINS, L.F., MONSERRAT, J.M.Toxicological responses in *Laeonereis acuta* (Annelida, Polychaeta) after arsenic exposure. **Environment International**, v. 33, p. 559–564, 2007.

VENTURA-LIMA, J., FATTORINI, D., REGOLI, F., MONSERRAT, J.M. Effects of diferente inorganic arsenic species in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) tissues after short-time exposure: bioaccumulation, biotransformation and biological responses. **Environmental Pollution**, v.157, p. 3479–3484, 2009a.

VENTURA-LIMA, J, CASTRO, M.R., ACOSTA, D., FATTORINI, D., REGOLI, F., CARVALHO, L.M., OHRER, D., GERACITANO, L.A., BARROS, D.M., SILVA, R.S., BONAN, C.D., BOGO, M.R., MONSERRAT, J.M. Effects of arsenic (As)

exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.149C, p. 538–543, 2009b.

VUTUKURU, S.S.; CHINTADA, K.R.M.; RAO, J.V.; ANJANEYULU, Y. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 32, p. 221-229, 2006.

XIE Y, LIU J, BENBRAHIM-TALLAA L, WARD JM, LOGSDON D, DIWAN BA, et al. Aberrant DNA methylation and gene expression in livers of newborn mice transplacentally exposed to a hepatocarcinogenic dose of inorganic arsenic. **Toxicology**, v.236, p.7–15, 2007.

WANG TS, SHU YF, LIU YC, JAN KY, HUANG H. Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenic. **Toxicology**, v.121, p. 229–37, 1997.

WANG, Y.C., CHAUNG, R.H., TUNG, L.C. Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines. **Aquatic Toxicology**, v.69, p.67–79, 2004.

WHO (2010), Exposure to Arsenic: a Major Public Health Concern Geneva, Available: WHO Press, <http://www.who.int/ipcs/assessment/publichealth/arsenic/en/>.

ZHANG, W.; HUANG, L.; WANG, W-X. Biotransformation and detoxification of inorganic arsenic in a marine juvenile fish *Terapon jarbua* after waterborne and dietborne exposure. **Journal of Hazardous Materials**. v.221–222, p. 162– 169, 2012.

CAPÍTULO 2

EFEITOS AGUDOS DO ARSÊNIO PARA *Prochilodus lineatus*: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS

Manuscrito a ser submetido a publicação na revista Environmental
Toxicology and Pharmacology.

Normas disponíveis em:

<https://www.elsevier.com/journals/environmental-toxicology-and-pharmacology/1382-6689/guide-for-authors>

EFEITOS AGUDOS DO ARSÊNIO PARA *Prochilodus lineatus*: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS

Kathya Assmann Modesto^{1,2} e Claudia Bueno dos Reis Martinez^{1*}

¹Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

² Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Cornélio Procópio, Paraná, Brasil.

* Autor correspondente: Claudia Bueno dos Reis Martinez – Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brasil, CEP 86057-970. Tel: +55 (43) 3371 5146. E-mail: claudiabrmartinez@gmail.com; cbueno@uel.br

RESUMO

O arsênio (As) é um metaloide que pode ser encontrado nos corpos de água do mundo todo, principalmente como resultado do despejo de efluentes industriais, agrícolas e ainda de resíduos de atividade de mineração. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de biomarcadores hematológicos, neurotóxicos e de estresse oxidativo no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* após exposição ao As. Peixes jovens foram expostos ao As nas concentrações (em $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de 0,1 (As 0,1), 10 (As 10) e 1000 (As 1000) ou somente à água (CTR) por 24 e 96 h. Após as exposições, os peixes foram mortos e sangue, fígado, cérebro e músculo foram retirados para as análises. Após 96 h, observou-se redução no número de eritrócitos nos peixes do grupo As 1000 e diminuição de Na^+ e aumento de K^+ nos grupos As 10 e As 1000. No fígado foi analisada a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) e glutathione peroxidase (GPx), além da concentração de glutathione (GSH) e lipoperoxidação (LPO). A atividade da SOD foi estimulada em todos os grupos experimentais, em ambos os períodos de exposição. Após 96 h, a atividade da CAT foi maior nos grupos As 10 e As 1000 e a da GPx mostrou-se aumentada em todos os grupos submetidos ao As. A

atividade da GST foi reduzida após 96 h em todos os grupos experimentais analisados, assim como a glutathione redutase (GR), em 24 e 96 h. O conteúdo de glutathione (GSH) não se alterou e também não foi observado lipoperoxidação. A atividade cerebral da acetilcolinesterase foi reduzida no grupo As 1000 após 96 h. Estes resultados mostram que a exposição aguda ao As causou hemólise, alterou a captação de Na⁺, interferiu nas defesas antioxidantes do animal e foi neurotóxica para *P. lineatus*.

Palavras-chave: acetilcolinesterase, antioxidantes, hematologia, íons plasmáticos, lipoperoxidação, metaloide.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, desastres ambientais relacionados às atividades de mineração tornaram-se assunto de importância nacional devido a ocorrências recentes. Em 2015, o rompimento da barragem de rejeitos de minério em Mariana (MG), pertencente a Samarco S.A., foi considerado um dos maiores desastres relacionados a atividade de mineração do mundo e o maior do Brasil (Cordeiro et al., 2019), causando enormes prejuízos ambientais e socioeconômicos (D'Agostino, 2015). As atividades de mineração podem produzir grandes quantidades de rejeitos ricos em metais, sendo que estes compostos não são degradados em processos naturais e, portanto, acumulam-se nos sedimentos e organismos, representando ameaças a todo ecossistema (Malvandi, 2017), resultando em efeitos subletais e até mesmo na morte dos organismos (Yi e Zhang, 2012). Nas últimas décadas, a contaminação por metais tem sido estudada em vários ambientes ao redor do mundo, e os ecossistemas aquáticos tornaram-se de grande interesse devido ao aumento de contaminantes oriundos de atividades antropogênicas, como agricultura e indústria (Avigliano et al., 2019; Avigliano e Schenone, 2015). O arsênio (As) é um metaloide que pode ser descarregado naturalmente no meio aquático por atividade vulcânica ou pelo intemperismo de rochas, além de atividades antropogênicas como mineração, agricultura e efluentes industriais (Oremland e Stolz, 2003; Ratnaike, 2003). O As está amplamente distribuído pelos solos e corpos de água em todo o mundo (Flora et al., 2005). Como exemplos, pode-se citar os lençóis freáticos em Bangladesh, Índia, aquíferos no Paquistão, Vietnã e China e até mesmo na América do Sul, como nos lençóis freáticos na Argentina, além da costa brasileira, sendo que a lista de países aumenta a cada ano (Anawar et al., 2002; Avigliano et al., 2019).

O As é considerado perigoso para a saúde humana de acordo com a Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR, 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018) a contaminação por As nas águas subterrâneas é generalizada e estima-se que pelo menos 140 milhões de pessoas em 50 países bebam água com As em concentração superior a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, a qual corresponde a concentração limite para água de consumo humano

segundo o mesmo órgão. No Brasil, a resolução CONAMA 357 (2005) também estabelece o valor de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de As total como limite em água doce e a concentração de $0,14 \mu\text{g.L}^{-1}$ para locais onde haja pesca ou cultivo de peixes (ambos classe I). Apesar disso, foi encontrada significativa contaminação ambiental por arsênio em Minas Gerais, na região de Nova Lima, Ouro Preto, Mariana e áreas circunvizinhas, resultante de extensiva exploração mineral. Nessa região, estima-se que entre 390 e 3.900 t de As foram introduzidas no ambiente. Concentrações de 260 a $1.710 \mu\text{g.L}^{-1}$ foram encontradas nas águas do Rio das Velhas, também em Minas Gerais, de até $7.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ em outros aquíferos (Bundschuh et al., 2012).

Na água, as formas inorgânicas do As como arsenito (As^{3+}) ou arsenato (As^{5+}) são mais tóxicas, sendo que geralmente o arsenato tende a ocorrer em regiões na coluna d'água mais próxima a superfície, enquanto que o arsenito normalmente se encontra em regiões mais profundas, próximas ao sedimento (Bhattacharya et al., 2007). Já as formas metiladas, como monometilarsenato (MMA) e dimetilarsinato (DMA) são consideradas moderadamente tóxicas para humanos e animais, incluindo peixes (Fattorini et al., 2004).

O As, no organismo humano, é rapidamente convertido a espécies altamente tóxicas que reagem com os grupos sulfidrilas das proteínas, inibindo e bloqueando os processos celulares. O As exerce ações inibitórias em enzimas contendo grupos SH, podendo inibir a síntese de ATP e afetar o metabolismo energético, glicídico e lipídico (Dani, 2008). Estudos demonstram que os efeitos da ingestão de As estão relacionados à neurotoxicidade (Schofield, 2017), imunotoxicidade (Dangleben et al., 2013), problemas cardiovasculares (Pace et al., 2017) e vários tipos de cânceres (Hong et al., 2014; Nachman et al., 2017). Ferreira e Leite (2015) afirmam que entre as substâncias carcinogênicas encontradas em água e solos próximos a antigas minas, o As é o segundo mais abundante.

A literatura sobre os efeitos do As para peixes ainda é escassa, especialmente quando se trata de espécies neotropicais, que são especialmente suscetíveis a este contaminante, já que a toxicidade do As é maior em águas com temperatura mais elevada (von Sperling, 2002). Alguns trabalhos já mostraram que a exposição ao As promove redução das defesas antioxidantes e ocorrência de danos oxidativos em diferentes espécies de peixes, como

Pangasianodon hypophthalmus (Singh et al., 2019), *Danio rerio* (Hong et al., 2018), *Clarias batrachus* (Bhattacharya e Bhattacharya, 2005) e *Channa punctatus* (Allen et al., 2004). Além desses, diversos estudos mostram que o As tende a se acumular nos tecidos, levando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem alterar o crescimento, a reprodução, a regulação iônica, a expressão gênica, o sistema imunológico, a atividade de enzimas e provocar alterações histológicas (Pedlar et al., 2002; Datta et al., 2009). Considerando ainda que peixes fazem parte da alimentação cotidiana de milhões de pessoas no mundo, a ingestão de peixes com As acumulado em seus tecidos podem provocar consequências ainda piores (Jayaprakash et al., 2015; Stassen et al., 2012).

O curimba, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), é uma espécie neotropical de água doce, pertencente à ordem Characiformes, família Prochilodontidae. Esta espécie é abundante e importante na região Sul e Sudeste do Brasil, sendo bastante utilizada na alimentação humana (Martinez e Souza, 2002). Estes peixes apresentam grande importância para estudos ecotoxicológicos, pois têm se mostrado sensíveis a diversas classes de contaminantes ambientais, dentre eles os metais (Silva et al., 2014; Palermo et al., 2015; Simonato et al., 2016; Lunardelli et al., 2018; Oliveira et al., 2018). Além disto, por se tratar de uma espécie de fundo e detritívora, estes peixes mostram-se especialmente adequados para estudos de toxicidade do As, pois este composto tem a tendência de se acumular no sedimento (Lai et al., 2001).

Assim, considerando a falta de conhecimento a respeito da toxicidade do As e seus efeitos para espécies neotropicais, aliado ao fato de que os estudos já apresentados com outras espécies foram feitos com períodos longos de exposição, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações hematológicas e bioquímicas de *P. lineatus* após exposição aguda ao As, a concentrações estabelecidas na legislação brasileira e ambientalmente relevantes, com a finalidade de verificar se essas concentrações são seguras a manutenção da vida dessa espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Peixes juvenis da espécie *Prochilodus lineatus* (n= 64, peso: $37,83 \pm 15,54$ g; comprimento: $15,22 \pm 2,31$ cm), obtidos de piscicultura da região, foram aclimatados durante sete dias em tanques de 300 L contendo água limpa, desclorada e com aeração constante, sob fotoperíodo de 12:12 h claro/escuro. Durante esse período foi fornecida ração comercial (Guabi®, 36 % conteúdo proteico) a cada 48 h, interrompendo-se a alimentação 24 h antes dos testes, bem como durante os mesmos. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados durante todo o experimento (aclimação e exposição: temperatura = $23,08 \pm 0,071$ °C; pH = $8,01 \pm 0,023$; O.D. = $6,96 \pm 0,028$ mg O₂.L⁻¹; condutividade = $0,098 \pm 0,004$ mS.cm⁻¹).

Após a aclimação, os peixes foram randomicamente divididos em quatro grupos (n = 8 peixes/grupo) e mantidos em aquários de vidro individuais contendo 40 L de água desclorada. Um grupo foi exposto somente à água (CTR) e os outros três grupos foram expostos à água com diferentes concentrações nominais de As: 0,1 (As 0,1), 10 (As 10) e 1000 (As 1000) µg.L⁻¹ por 24 e 96 h. Para cada tempo experimental foram realizados experimentos independentes com os quatro grupos experimentais correndo simultaneamente. No tempo de 96 horas houve renovação parcial da água (80%) a cada 48 h. Os meios experimentais contendo As foram preparados a partir de uma solução mãe de arsenito de sódio (NaAsO₂ marca Neon) com concentração de 100 mg.L⁻¹. As concentrações testadas foram baseadas na legislação vigente (resolução CONAMA 357/2005), a qual estabelece como limite máximo de As para água doce onde haja pesca ou cultivo de peixes a concentração de 0,14 µg.L⁻¹ e para água doce a concentração de 10 µg.L⁻¹. A maior concentração foi estabelecida baseada em estudos que encontraram concentrações semelhantes em corpos de água no Brasil (Bundschuh et al., 2012, Rocha e Azevedo, 2015).

Após a exposição, os peixes foram anestesiados em benzocaína (0,1 g.L⁻¹) para a retirada de sangue pela veia caudal. Em seguida, os animais foram mortos por secção medular para a coleta do fígado, cérebro e músculo. Os

órgãos foram armazenados em ultrafreezer (-80°C) para as análises bioquímicas. Amostras de sangue total foram armazenadas em microtubos e imediatamente utilizadas para a determinação dos parâmetros hematológicos. Os procedimentos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Processo 18600.2018.25).

2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAL

Amostras de água foram coletadas em todos os aquários para determinação da concentração de As total e dissolvido. No experimento de 24h, a coleta foi realizada no início e no final do experimento. No teste de 96h, as coletas ocorreram no início, após 48h quando foi feita a renovação parcial da água e no final do experimento. Em todos os casos, as amostras de água foram fixadas com 2% ácido nítrico. A concentração de arsênio nas amostras de água foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer A700) com limite de detecção para o arsênio de 0,05 µg. L⁻¹.

2.3 BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS

Uma alíquota de sangue total (5 µL) foi diluída em tampão formol citrato (1:200) para a contagem do número de eritrócitos ($\times 10^6$) por mm³ de sangue (RBC), em câmara de Neubauer ao microscópio de luz. A concentração de hemoglobina (Hb em g.dL⁻¹) foi determinada por meio do método de cianeto de metahemoglobina, utilizando-se um kit comercial (Doles, Brasil), em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido) a 540 nm.

Após a determinação dos parâmetros hematológicos o sangue total foi centrifugado (1.870 g, 10 min – MCD2000, Hsiangtai, Taiwan), para obtenção do plasma, no qual foram analisadas as concentrações de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺). As concentrações de Na⁺ e K⁺ foram determinadas em plasma diluído em água deionizada (1:100), usando fotômetro de chama (DM-62, Digimed).

2.4 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Todos os parâmetros bioquímicos avaliados em fígado, cérebro e músculo foram expressos em relação a concentração de proteína, a qual foi determinada

pelo método de Bradford (1976), com base em uma curva padrão de albumina de soro bovino a 595 nm.

2.4.1 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

Para a avaliação dos biomarcadores associados ao estresse oxidativo as amostras de fígado mantidas no ultra freezer foram descongeladas, homogeneizadas (10x volume) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), centrifugadas (20 min, 13000 g, 4°C) e com o sobrenadante foram realizados os ensaios bioquímicos descritos a seguir. A concentração de proteínas totais das amostras, para a expressão dos resultados, foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976).

A atividade da Cu-Zn superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido em espectrofotômetro, a 550 nm, de acordo com McCord e Fridovich (1969). A atividade da enzima foi expressa em U de SOD.mg de proteína⁻¹, sendo que U representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada através da velocidade de decomposição de peróxido de hidrogênio (Beutler, 1975). As amostras (1:100) foram adicionadas a um meio de reação (H₂O₂ 0,03%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,25 mM), e o decréscimo de sua absorvância a 240 nm foi determinado durante 1 min. A atividade da enzima foi expressa em μmol de H₂O₂ degradado.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi estimada indiretamente através da oxidação do NADPH em presença de glutathione redutase (GR) e o substrato glutathione oxidada, de acordo com Hopkins e Tudhope (1973). A reação foi analisada por 1 minuto em espectrofotômetro a 340 nm. Os resultados foram expressos em μmol de NADPH.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi determinada pelo monitoramento da complexação da glutathione reduzida (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), de acordo com Keen et al. (1976). O aumento de CDNB conjugado foi monitorado durante 1 minuto, em espectrofotômetro a 340 nm e a atividade da enzima foi expressa em nmol de

CDNB conjugado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade da glutathione-redutase (GR) foi determinada indiretamente pela redução do NADPH mediante a presença da glutathione oxidada (Carlbert e Mannervik, 1975), em espectrofotômetro a 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\text{nmol NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

A concentração de glutathione (GSH) foi determinada de acordo com o método de Beutler et al. (1963), através da reação dos grupamentos -SH com o reagente de cor 5,5-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB), que foi quantificado em 412 nm em espectrofotômetro. A concentração de glutathione foi expressa em $\mu\text{g GSH} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

Para avaliação da lipoperoxidação foi utilizado o ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) para determinar a concentração de malondialdeído (MDA) das amostras, de acordo com o protocolo descrito por Camejo et al. (1998). A concentração de MDA foi determinada por fluorescência (ex/em: 535/590 nm) utilizando-se uma curva padrão de MDA e sua concentração foi expressa em $\text{nmol de MDA} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

2.4.2 Biomarcador de Neurotoxicidade

Os tecidos muscular e cerebral foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5; 1:10 p/v) e centrifugados (10.000 g, 20 min, 4° C) para a análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE), segundo método descrito por Ellman et al. (1961) e adaptado por Alves-Costa et al. (2007) para leitura em espectrofotômetro de microplacas a 415 nm. A atividade da AChE ($\text{nmol DTNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg ptn}^{-1}$) foi determinada pela reação do iodeto de acetilcolina (9 mM) com reagente de cor contendo ditionitrobenzoato (0,5 mM), formando nitrobenzoato, que foi mensurado a cada 3 min pelo tempo total de 6 min. Os resultados foram expressos em $\text{nmol min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram primeiro testados quanto à normalidade (Shapiro-wilk) e homogeneidade da variância (Levene). Em seguida, utilizou-se a análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguida de um teste de comparação múltipla (teste de Newman-Keuls

ou Dunns, respectivamente), quando indicado, sendo consideradas significativas diferenças cujo $p < 0,05$. As comparações foram feitas entre os grupos de cada tempo experimental, pois os experimentos foram realizados separadamente.

3 RESULTADOS

Durante os experimentos, não houve morte de peixe em nenhum grupo experimental.

As concentrações de As na água dos diferentes tratamentos estão expressas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de As total e dissolvido ($\mu\text{g.L}^{-1}$) na água dos diferentes tratamentos. As concentrações mensuradas correspondem às médias obtidas de todas as amostras coletadas em 0 e 24 h do experimento de 24 h, e 0, 48 e 96 h do experimento de 96 h.

Experimento	Grupo	As total	As dissolvido
24 h	CTR	Abaixo do LD	Abaixo do LD
	As 0,10	0,35 \pm 0,10	0,21 \pm 0,015
	As 10	12,51 \pm 0,29	11,80 \pm 0,23
	As 1000	1233,05 \pm 65,6	1023,8 \pm 61,5
96 h	CTR	Abaixo do LD	Abaixo do LD
	As 0,10	0,15 \pm 0,015	0,05 \pm 0,007
	As 10	13,04 \pm 0,54	12,35 \pm 0,59
	As 1000	1285,7 \pm 27,4	1021 \pm 169,8

Os resultados expressam média \pm EP ($n=8$). LD (Limite de detecção): 0,05 $\mu\text{g. L}^{-1}$.

3.1. BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS

Os resultados das análises hematológicas mensuradas em *P. lineatus* após a exposição ao As estão expressos na Tabela 2. Em relação ao grupo CTR, não foram observadas alterações significativas no conteúdo de hemoglobina em nenhum tempo experimental. Observou-se apenas uma diminuição do número de eritrócitos nos peixes do grupo As 1000 em relação ao CTR ($P<0,001$).

Tabela 2. Hemoglobina (Hb) e contagem de eritrócitos (RBC) de *P. lineatus* expostos ao As nas concentrações de 0,1 µg.L⁻¹ (As 0,1), 10 µg.L⁻¹ (As 10) e 1000 µg.L⁻¹ (As 1000) ou somente a água (CTR), por 24 h e 96 h.

	CTR	As 0,1	As 10	As 1000
24h				
Hb (g.dL⁻¹)	8,17 ± 0,46	7,33 ± 0,09	6,10 ± 0,43	6,86 ± 0,91
RBC (x10⁶cél mm⁻³)	2,30 ± 0,05	2,18 ± 0,02	2,24 ± 0,06	2,21 ± 0,03
96h				
Hb (g.dL⁻¹)	8,44 ± 0,93	6,99 ± 0,52	7,03 ± 0,59	6,46 ± 0,53
RBC (x10⁶cél mm⁻³)	3,05 ± 0,16 ^a	3,32 ± 0,05 ^a	3,15 ± 0,11 ^a	2,59 ± 0,08 ^b

Os resultados expressam média ± EP (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos em cada tempo experimental (p< 0,05).

Na Figura 1 estão apresentados os resultados referentes às concentrações plasmáticas de sódio e potássio. Após 96 h de exposição, observou-se uma diminuição (P<0,001) do Na⁺ no grupos As 1000 e um aumento do K⁺ plasmáticos (P<0,001) nos grupos As 10 e As 1000.

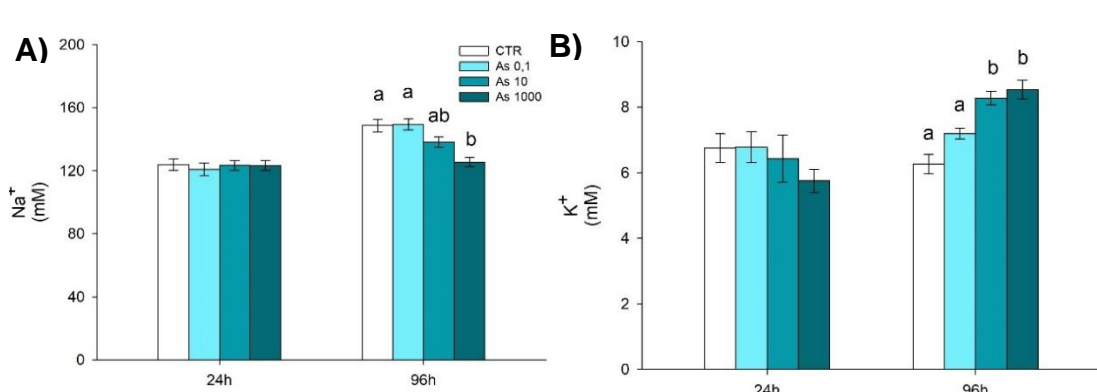


Figura 1. Concentração plasmática de sódio (A) e de potássio (B) de *P. lineatus* expostos ao As nas concentrações de 0,1 µg.L⁻¹ (As 0,1), 10 µg.L⁻¹ (As 10) e 1000 µg.L⁻¹ (As 1000) ou somente a água (CTR), por 24 h e 96 h. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão (n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo experimental (p< 0,05).

3.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

A atividade hepática da CAT (Fig. 2A) apresentou um aumento (P<0,001) nos peixes dos grupos As 10 e As 1000 após 96 h de exposição, em relação ao CTR. Com relação a atividade da SOD (Fig. 2B), observou-se um aumento em todos os grupos experimentais e em todos os períodos de exposição (P<0,001). Similarmente, com relação a GPx (Fig. 2C), após a exposição por 96 h, todos os grupos mostraram aumento (P<0,001) na atividade da enzima.

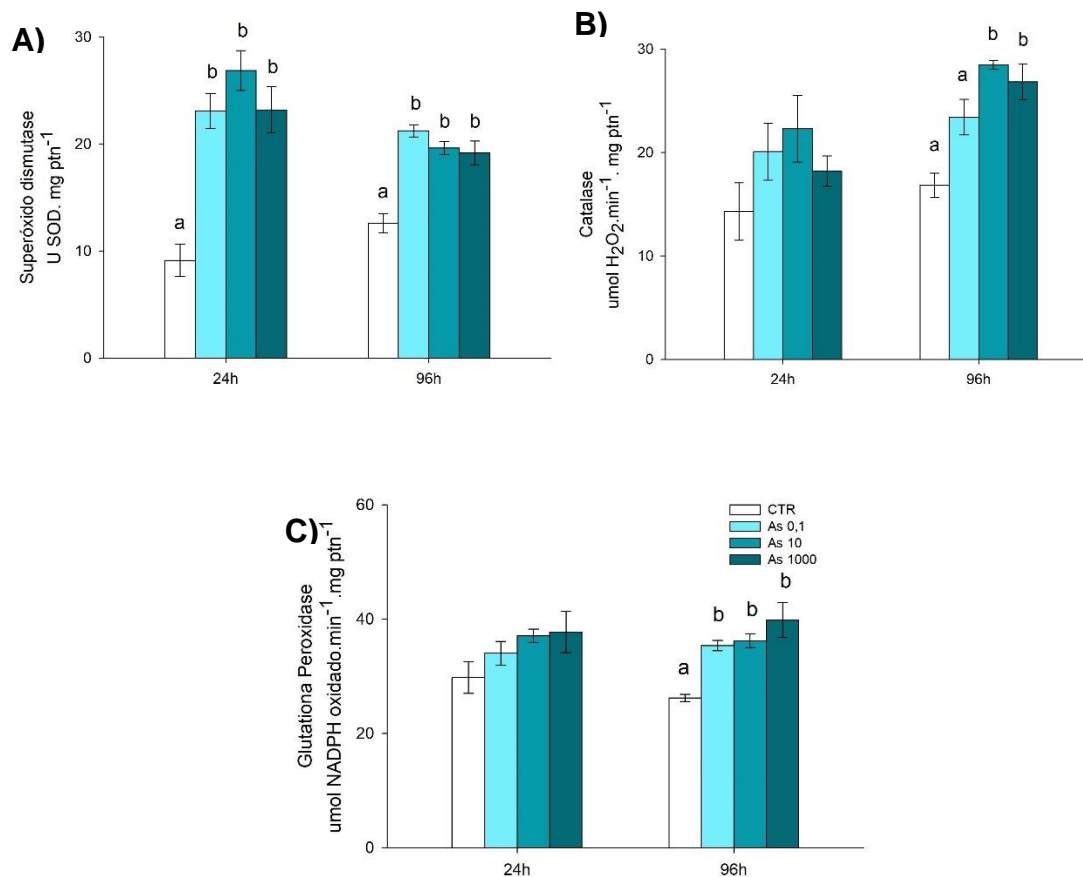


Figura 2. Atividade das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B) e glutathiona peroxidase (C) no fígado de *P. lineatus* expostos ao As nas concentrações de 0,1 µg.L⁻¹ (As 0,1), 10 µg.L⁻¹ (As 10) e 1000 µg.L⁻¹ (As 1000) ou somente a água (CTR), por 24h e 96h. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão ($n=8$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).

A concentração hepática de GSH não variou significativamente entre os diferentes grupos experimentais, em nenhum tempo de exposição (Fig. 3A). Já a atividade da GST (Fig. 3B) apresentou diminuição significativa em todos os grupos experimentais após 96h ($P < 0,001$). Da mesma forma, a atividade da GR (Fig. 3C), mostrou-se reduzida nos grupos As 0,1 e As 1000 após 24 h ($P = 0,004$) e em As10 e As 1000 ($P < 0,001$) após 96 h.

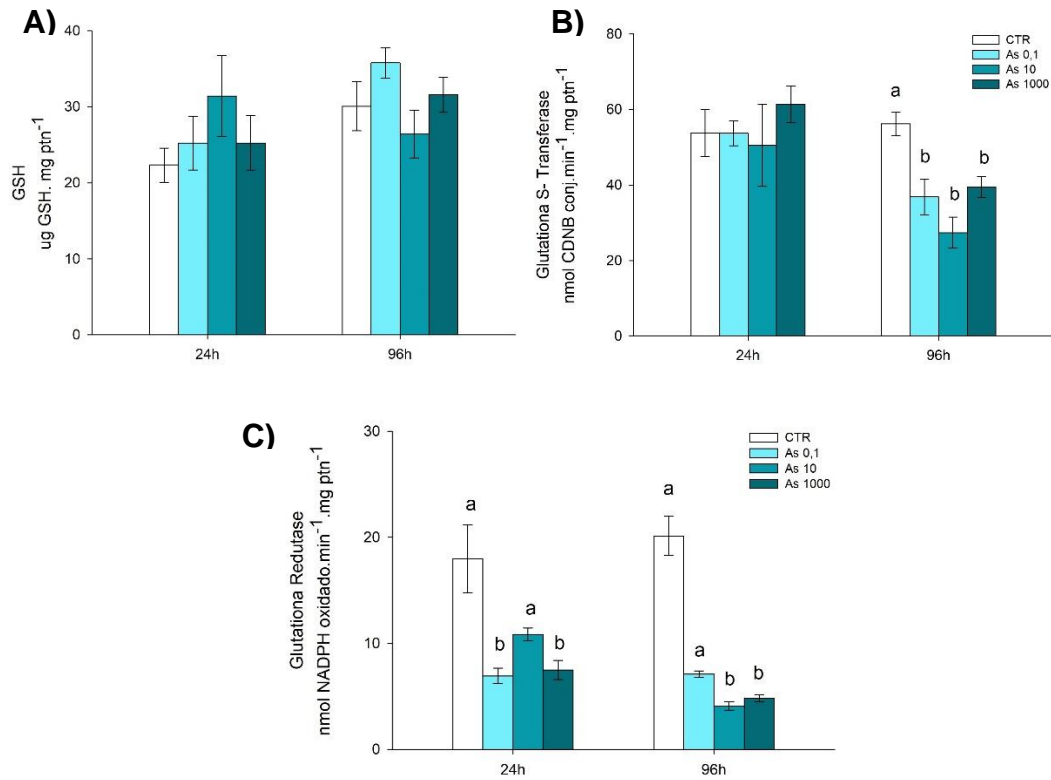


Figura 3. Concentração de glutatona (A) e atividade das enzimas glutatona S-transferase (B) e glutatona redutase (C) no fígado de *P. lineatus* expostos ao As nas concentrações de 0,1 µg.L⁻¹ (As 0,1), 10 µg.L⁻¹ (As 10) e 1000 µg.L⁻¹ (As 1000) ou somente a água (CTR), por 24h e 96h. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão ($n=8$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).

O ensaio TBARS (Fig. 4), realizado para verificar a ocorrência de peroxidação lipídica, não indicou alterações entre os diferentes grupos e períodos de exposição.

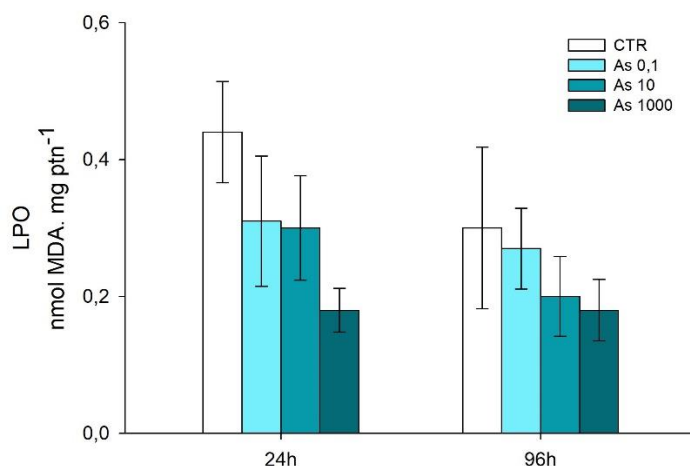


Figura 4. Lipoperoxidação (LPO) no fígado de *P. lineatus* expostos ao As nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 0,1), 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 10) e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 1000) ou somente a água (CTR), por 24h e 96h. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão ($n=8$).

A atividade da AChE no cérebro (Fig. 5A) foi afetada pela exposição ao As, pois uma diminuição ($P= 0,005$) na atividade da enzima foi observada nos peixes do grupo As 1000, após 96 h de exposição. Já no músculo não foram detectadas alterações significativas na atividade da AChE, nos diferentes grupos experimentais (Fig. 5B).

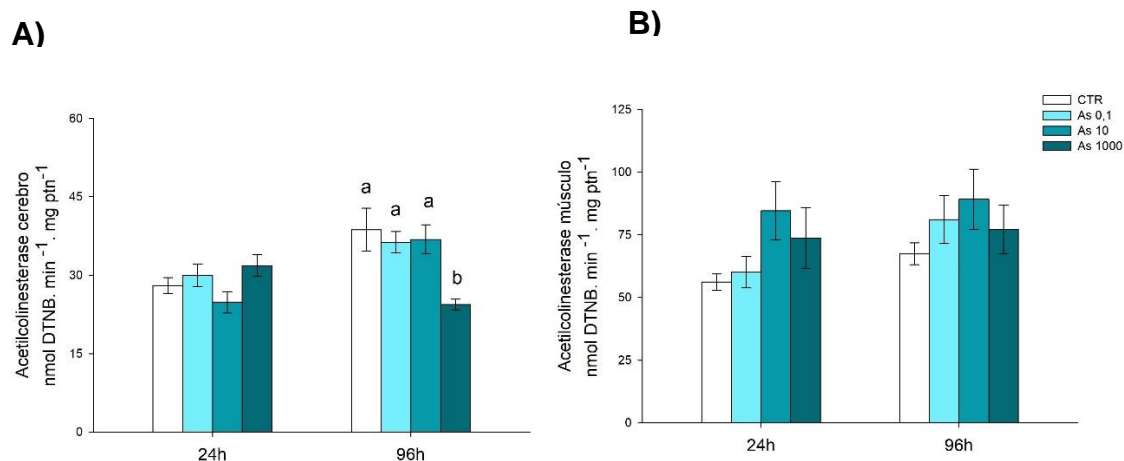


Figura 5. Atividade da acetilcolinesterase em cérebro (A) e músculo (B) de *P. lineatus* expostos ao As nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 0,1), 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 10) e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 1000) ou somente a água (CTR), por 24h e 96h. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão ($n=8$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo experimental ($p < 0,05$).

3.3 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi demonstrado a toxicidade do As para o peixe *P. lineatus*, causando alterações hematológicas, iônicas, bioquímicas e neurológicas, em diferentes concentrações, principalmente após 96 de exposição.

Em peixes, observa-se respostas sanguíneas precoces da toxicidade do As devido à grande área superficial na brânquia, onde a barreira entre o sangue e o metal dissolvido é muito delgada (Kumar e Banerjee, 2012). As análises dos parâmetros sanguíneos constituem uma importante ferramenta para detectar alterações fisiológicas e verificar o estado de saúde geral dos peixes expostos a contaminantes. Assim, índices hematológicos como hemoglobina (Hg), contagem de eritrócitos (RBC) e hemoglobina corpuscular média (HCM) têm sido usados para verificar a capacidade de carreamento do oxigênio como indicador de poluição em ambientes aquáticos (Shah, 2012). No presente estudo, verificou-se uma diminuição no número de eritrócitos nos peixes do grupo As 1000, após 96 h de exposição, indicando uma possível hemólise. O aumento da concentração de K^+ nestes peixes também corrobora essa possibilidade. Sabe-se que a redução no número de hemácias pode ser causada pela inibição da eritropoiese ou pela destruição das hemácias pelo arsenito, sendo que anemia moderada já foi relatada em *Oncorhynchus mykiss* alimentadas com 55–60 $\mu\text{g As g}^{-1}$ por 12 semanas (Cockell et al., 1992). Menos células vermelhas circulantes podem prejudicar a distribuição e o suprimento de oxigênio para os diferentes tecidos, podendo alterar o metabolismo geral do animal. A diminuição no número de células vermelhas também foi descrita por Lavanya e colaboradores (2011) para *Catla catla* expostos a 2,04 mg. L^{-1} de As por 7,14,21,28 e 35 dias de exposição. Além disso, os autores observaram aumento na hemoglobina, no hematócrito, na hemoglobina corpuscular média e no volume corpuscular médio dos animais. Cockell e colaboradores (1992) alimentaram *Oncorhynchus mykiss* com As por 8 semanas, nas quais houve diminuição da hemoglobina corpuscular média e não houve alteração no volume corpuscular médio. Ao contrário, Tripathi e colaboradores (2003) relatam diminuição na hemoglobina e no volume celular em *Clarias batrachus* expostos a 5, 10 e 15 mg.L^{-1} por 120 h, assim como Bears e colaboradores (2006)

observaram diminuição no hematócrito de *Fundulus heteroclitus* expostos a 787 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de As por duas semanas. Concentrações e tempos de exposição maiores do que os utilizados no presente trabalho podem ser a razão pelas diferentes respostas apresentadas nos trabalhos citados acima.

As brânquias desempenham um papel vital no transporte de íons (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+}) mantendo o equilíbrio hidroeletrolítico e ácido-básico no peixe. A quantificação de íons plasmáticos é considerada um biomarcador sensível à exposição a xenobióticos (Saravanan et al., 2011, 2015). Sabe-se que a exposição a contaminantes leva a prejuízos na absorção de íons, por exemplo por aumento na permeabilidade branquial (Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Cerqueira e Fernandes, 2002; Martinez et al., 2004; Camargo e Martinez, 2006), o que pode ser a causa da incapacidade de absorção de sais ou do ganho excessivo de água (Evans et al., 2005). Neste estudo, foi observado um aumento na concentração de K^+ e uma diminuição na concentração de Na^+ , ambos após 96 h de exposição nos grupos As10 e As1000, indicando que as alterações iônicas encontradas podem estar relacionadas com um aumento da permeabilidade iônica do epitélio branquial ou alterações na atividade dos transportadores branquiais resultante do efeito tóxico do As. Sabe-se que o As pode interferir nas enzimas branquiais envolvidas na absorção de íons, como por exemplo, a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, já que o metaloide pode se ligar a grupos cisteínas nas enzimas (Chen et al., 1988; Miller et al., 2002; McCafferty-Grad et al., 2003). Nesse contexto, *Catla catla* expostos a 2,041 mg.L^{-1} de As por 7, 14, 21, 28 e 35 dias, mostraram redução na atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, além de decréscimo na concentração plasmática de sódio, potássio, cloreto (Lavania et al., 2011).

Sabe-se que o As pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH) e o radical peróxil (ROO) (Pi et al., 2003). Como consequência, a peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana tem sido amplamente descrita como principal mecanismo de injúria celular e um dos efeitos mais tóxicos do arsênio (Halliwell e Gutteridge, 2006, Ramanathan et al., 2003). Para neutralizar as ERO e impedir consequências indesejáveis, as enzimas das vias antioxidantes são importantes mecanismos de defesa celular e dentre as enzimas, a SOD é a primeira, sendo responsável por catalisar a reação entre o ânion superóxido (O_2^-)

e a água, formando peróxido de hidrogênio. Neste trabalho, a atividade hepática da SOD mostrou-se aumentada já em 24 h, em todas as concentrações de As testadas e permaneceu assim em 96 h, sugerindo que a exposição ao As tenha aumentado a geração de ERO. O aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e a GPx tem sido associado com a exposição ao As (Liu et al., 2001; Shi et al., 2004). A GPx é uma importante peroxidase encontrada na via antioxidante, catalisando a decomposição de vários hidroperóxidos orgânicos, inclusive o peróxido de hidrogênio, utilizando o tripeptídeo glutationa (GSH) como substrato. No presente trabalho, a GPx mostrou-se aumentada após 96 h, em todos os grupos experimentais. Estudos recentes demonstraram o mesmo comportamento na atividade enzimática da SOD e da GPx em diferentes espécies e diferentes concentrações de As, como em embriões de *Danio rerio* (Sun et al., 2019), *Pangasianodon hypophthalmus* (Kumar et al., 2019), *Clarias batrachus* (Bhattacharya e Bhattacharya, 2005) e *Carassius auratus* (Cui et al., 2020). Também foi relatado que o H₂O₂ citosólico é produzido pela SOD a partir dos ânions superóxidos durante a exposição ao As (Jing et al., 1999; Pourahmad et al., 2003).

Também foi observado um aumento na CAT após 96 h, nos grupos As 10 e As 1000. As CAT são enzimas que catalisam a quebra do peróxido de hidrogênio. O aumento da atividade das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo pode ser devido ao excesso de produção de H₂O₂ pelas enzimas dos peroxissomos ou pela geração de H₂O₂ na mitocôndria pela superóxido dismutase. Wang e colaboradores (2004) relatam que as enzimas mais importantes na metabolização dos peróxidos relacionados a exposição ao As são GPx e catalases, sendo que a GPx deve ser mais efetiva contra a geração de ERO induzida pelo As, provavelmente pela sua localização citosólica (Jing et al., 1999; Wang et al., 2004). Bhattacharya e Bhattacharya (2005) concluíram que o estresse oxidativo causado pela exposição ao As é mediado pelo H₂O₂. Assim, fica demonstrado que neste trabalho a exposição ao As provavelmente aumentou a formação de ERO, hipótese essa justificada no aumento da atividade da SOD para neutralizar essas moléculas. Como resultado, a concentração de H₂O₂ aumentou no tecido, estimulando o aumento da atividade da CAT e da GPx, enzimas responsáveis pela degradação deste composto.

A glutationa (GSH) é conhecida como um importante elemento protetor

das células contra as ERO geradas por xenobióticos. Especificamente em relação aos peixes, diversos trabalhos abordam a glutathione como uma importante defesa antioxidante não enzimática que ocorre em altas concentrações. Com relação ao metabolismo do As, a GSH participa da redução do arsenato para arsenito (Csanaky and Grecus, 2005), além de atuar como substrato para a monometilarsenato redutase (MMAV), enzima responsável pela metilação do arsênio inorgânico (Aposhian et al., 2004), formando arsenitotriglutathione (AsIII (GS)₃) (Kobayashi et al., 2005). Portanto, a GSH parece ter dupla função porque age primariamente como defesa antioxidante e, ao mesmo tempo, participa da biotransformação do As (Ventura-Lima et al., 2011). O comportamento da GSH parece variar bastante entre as espécies e concentrações de As testadas. Roy e colaboradores (2006) identificaram uma oscilação nos níveis de GSH de *Channa punctatus* expostos ao arsênio, de acordo com o tempo de exposição, quando ao final de 7 e 14 dias houve uma diminuição de GSH comparado ao controle. Em outro estudo, Cui e colaboradores (2020) relatam que o *Carassius auratus* não mostrou alteração na GSH após ingestão de As na concentração de 50 µg.g⁻¹, enquanto que na concentração de 100 µg.g⁻¹, a concentração do tripeptídeo aumentou após 10 dias de exposição. No presente trabalho, não encontramos alteração na concentração da GSH em nenhum dos tempos de exposição. A resposta da ativação das enzimas antioxidantes primárias em um curto período de exposição, provavelmente tenha sido o estímulo maior para metabolizar as ERO decorrentes da presença do As, não necessitando da GSH nesse momento.

A enzima glutathione redutase (GR) tem um papel crucial na manutenção dos níveis de GSH e tanto os organo-arsênicos trivalentes gerados durante a biometilação do As como os arsenitóis formados na célula pela reação com a GSH, podem inibir a GR (Bhattacharya e Bhattacharya, 2005; Bhattacharya et al., 2007). Talvez seja essa a causa da redução da atividade da GR observada neste estudo em todas as concentrações de As testadas e em todos os períodos de exposição. Além disso, segundo Bandyopadhyay et al. (1999), o arsenito pode inibir enzimas que geram co-enzimas reduzidas como NADH e NADPH. A escassez de NADPH pode ter um efeito direto nos níveis de glutathione reduzida (GSH), já que prejudica a redução da glutathione oxidada (GSSG) pela glutathione redutase (GR).

As enzimas da família GST são moléculas multifuncionais, com um papel importante na detoxificação celular, protegendo as células contra xenobióticos pela conjugação com a glutatona e uma variedade de compostos eletrofílicos endógenos e exógenos (Townsend e Tew, 2003). A superfamília GST tem sido dividida em sete classes distintas conhecidas como alpha, mu, pi, theta, zeta, sigma e omega (SampayoReyes e Zakharyan, 2006). GST- π e GST- ω são duas isoformas predominantemente citosólicas envolvidas no metabolismo do As (Wang e Lee, 1993; Board e Menon, 2016). GST- ω catalisa a redução das formas metiladas do As V para as formas metiladas do AsIII e a conjugação do MMAIII com a GSH (Zakharyan et al., 2001), enquanto a GST- π catalisa a conjugação do As III com a GSH (Leslie, 2012). Neste estudo, observou-se uma diminuição da atividade da enzima após 96 h de exposição, em todas as concentrações testadas, resultado este que difere do encontrado em outras espécies, como em *Oncorhynchus mykiss* expostos a $7,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de As por 48 h, que apresentaram aumento da atividade da GST no intestino (Painefilú et al., 2019). Também em *Pangasianodon hypophthalmus* foi observado a atividade da GST aumentada em diferentes concentrações de As (Kumar et al., 2019). A redução da atividade observada neste estudo pode estar relacionada com a presença de oxidantes que levam a inativação da atividade enzimática (Bagnyukova et al., 2007). Neste caso, a exposição ao As estimulou outras vias de defesa, mostrando diferentes respostas quando comparadas as espécies apresentadas. Espécies diferentes podem apresentar respostas diferentes quando expostas ao mesmo contaminante, razão pela qual justifica-se a necessidade de estudos diversos, com o objetivo de compreender o mecanismo de ação do contaminante em diferentes espécies.

Outro importante parâmetro a ser analisado é peroxidação lipídica. Uma das mais importantes consequências da lipoperoxidação é o dano à estrutura lipídica da membrana celular, desestabilizando fisiologicamente as propriedades celulares. As consequências para as membranas biológicas podem ser de vários níveis de severidade, dependendo da natureza e concentração do oxidante, variando desde reduções localizadas na fluidez da membrana até a ruptura total da integridade da bicamada (Halliwell e Gutteridge, 2006). Esse dano é normalmente verificado em células do fígado, devido à sua maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo (Bhattacharya e Bhattacharya, 2007). Soundararajan et al.

(2009) identificaram dano lipídico em *Tilapia mossambica* expostas ao arsênio. De forma similar, Pedlar *et al.* (2002) relatam a ocorrência de peroxidação lipídica para em truta *Salvelinus namaycush* expostas a diferentes concentrações de As e ainda a indução da LPO com a exposição do teleósteo *Anadas testudineus* a 1.5 mg As.L⁻¹ durante 48 h. Bhattacharya e Bhattacharya (2007) também demonstram o estresse oxidativo pelo arsênio sobre a espécie de peixes *Clarias batrachus*. Cui e colaboradores (2020) também descreveram peroxidação lipídica no fígado de *Carassius auratus* expostos ao As via dieta por 10 dias. Por outro lado, Schlenk *et al.* (1997) não observaram alterações lipídicas no fígado do *Ictalurus punctatus* após a exposição ao As, resultados também obtidos por Ventura-Lima e colaboradores (2009) nas brânquias do *Danio rerio* e por Bagnyukova e colaboradores (2007), nos *Carassius auratus* expostos a 200 µg As.L⁻¹. Estes resultados são semelhantes ao encontrado neste estudo, no qual não constatamos LPO nos peixes após as exposições ao As. É sabido que o As induz a LPO em várias espécies de animais e também em cultura de células. Entretanto, estudos com peixes de diferentes espécies em exposições crônicas, com doses baixas de As indicaram que o mesmo pode ou não causar LPO, dependendo da espécie envolvida (Allen *et al.*, 2004; Pedlar *et al.*, 2002). Portanto, parece que a toxicidade do As depende não somente da concentração utilizada, mas também das espécies estudadas, sendo que alguns teleósteos mostram-se mais sensíveis ao As quando comparados a outros (Bhattacharya e Bhattacharya, 2007). Como discutido anteriormente, o As aumenta a formação de H₂O₂ nos tecidos afetados, requerendo CAT, GPx, GST and GR para proteção celular (Regoli and Giuliani, 2014). Como neste estudo houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes primárias, podemos admitir que essas respostas foram suficientes para neutralizar as moléculas oxidativas, conseguindo assim impedir o estresse oxidativo nesses animais nas concentrações testadas, considerando também que o tempo de exposição foi bastante curto. Outro importante aspecto a ser analisado é a concentração utilizada de As nos diferentes estudos. Em geral, as espécies que apresentaram LPO foram expostas ao As na ordem de mg.L⁻¹, ou seja, concentrações muito superiores a deste trabalho, na ordem de µg.L⁻¹.

A AChE catalisa a hidrólise da acetilcolina que resulta no fluxo do impulso nervoso que passa por um neurônio colinérgico a outro neurônio colinérgico nas

junções sinápticas e também na placa motora, local de junção neuromuscular. Estudos feitos por Kumari e colaboradores (2017) demonstraram que o cérebro é particularmente vulnerável ao As devido ao seu alto consumo de oxigênio e pela alta taxa de ácidos graxos poli-insaturados, ocorrendo a geração de grande quantidade de ERO. Ainda segundo os mesmos autores, a atividade da AChE também depende da taxa de penetração do agente tóxico e a taxa de formação de metabólitos através de certas membranas e outras atividades fisiológicas. O arsenito é tido como um potente inibidor da acetilcolinesterase (AChE), como é reportado por Roy e colaboradores (2006), levando esta enzima a níveis basais conforme o aumento do tempo de exposição. O As atua no sistema colinérgico, através de interações com os grupos sulfidrilas, envolvidos nos mecanismos de captação de alta afinidade da colina, e com os grupos dissulfeto da AChE (Rodriguez et al., 2003).

Assis et al. (2012) estudaram o efeito de pesticidas organofosforados, que contém As em sua composição, sobre a atividade colinesterásica cerebral de três diferentes espécies de peixes tropicais: pirarucu (*Arapaima gigas*), cobia (*Rachycentron canadum*) e a tilápia (*Oreochromis niloticus*), e mostraram que para todas as espécies houve uma inibição substancial da AChE. Com resultados semelhantes, Kumar e colaboradores (2019) observaram redução dose dependente e influenciada pela temperatura na atividade da AChE em *P. hypophthalmus* expostos ao As. Neste trabalho, a atividade da AChE foi diminuída nos peixes do grupo As1000 após 96 h de exposição, resultados que corroboram os dados citados na literatura. Já no músculo não foi encontrada nenhuma alteração para as concentrações e tempo de exposição testados. Sabe-se que o acúmulo de acetilcolina devido a redução da atividade da AChE pode afetar o comportamento de fuga e reprodução dos peixes, interferindo diretamente na sobrevivência da espécie.

3.4 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados indicam que a espécie *P. lineatus* mostrou-se sensível aos efeitos da exposição aguda ao As, sendo que as alterações mais evidentes foram vistas após 96 h de exposição e nas duas

maiores concentrações testadas (As 10 e As 1000). No presente trabalho, as concentrações de As na água foram semelhantes às estabelecidas para locais onde há pesca ou cultivo de peixes, determinadas como limites para proteção da vida aquática. Com base nos dados apresentados, os peixes expostos a concentração limite estabelecida pela legislação vigente ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) mostraram importantes alterações evidenciando que para a espécie analisada essa concentração não é segura para a vida do animal. Conforme já discutido, a exposição ao As levou a diminuição do número de eritrócitos, diminuição da hemoglobina corpuscular média, alterou as concentrações plasmáticas de Na^+ e K^+ , estimulou as enzimas antioxidantes primárias (CAT, SOD e GPx), reduziu a atividade da GST e mostrou ação anticolinesterásica no cérebro. Esses resultados são preocupantes, pois a exposição feita foi por um curto período de tempo e com concentrações ambientalmente relevantes.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho é parte da tese de doutorado de Kathya Assmann Modesto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Claudia Bueno dos Reis Martinez é pesquisadora do CNPq (processo 307146/2019-7).

REFERÊNCIAS

- Allen, T., Singhal, R.; Rana, S.V.S., 2004. Resistance to oxidative stress in a freshwater fish *Channa punctatus* after exposure to inorganic arsenic. *Biological Trace Element Research*. 98, 63–72. <https://doi.org/10.1385/BTER:98:1:63>.
- Alves-Costa, J. R. M., Mela, M., de Assis, H. C. D. S., Pelletier, É., 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.

- <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.03.013>.
- Anawar, H.M., Akai, J., Mostofa, K.M., Safiullah, S., Tareq, S.M., 2002. Arsenic poisoning in groundwater: health risk and geochemical sources in Bangladesh. *Environment International*. 27,597–604. [https://doi.org/10.1016/s0160-4120\(01\)00116-7](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(01)00116-7). PMID: 11871394.
- Aposhian, H.V., Zakharyan, R.A., Avran, M.D., Sampayo-Reyes, A., Wollenberg, M.L., 2004. A review of the enzymology of arsenic metabolism and new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 198, 97–149. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.027>. PMID: 15276412.
- Assis, C. R. D.; Linhares, A. G.; Oliveira, V. M.; França, R. C. P.; Carvalho, E. V. M. M. Bezerra, R. S.; Carvalho, L. B. C., 2012. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. *Science of the Total Environment*. 441, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.058>.
- ATSDR, 2020. Interaction Profiles for Toxic Substances. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA., <https://wwwn.cdc.gov/TSP/substances/ToxSubstance.aspx?toxid=3>, accessed 10 August 2020.
- Avigliano, E., Schenone, N.F., 2015. Human health risk assessment and environmental distribution of trace elements, glyphosate, fecal coliform and total coliform in Atlantic Rainforest mountain rivers (South America). *Microchemical Journal*. 122, 149-158. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.05.004>
- Avigliano, E., Clavijo, C., Scarabotti, P., Sanchez, S., LlamazaresVegh, S., del Rosso, F.R., Caffetti, J.D., Facetti, J.F., Domanico, A., Volpedo, A.V., 2019. Exposure to 19 elements via water ingestion and dermal contact in several South American environments (La Plata Basin): from Andes and Atlantic Forest to seafont. *Microchemical Journal*. 149, 103986. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103986>.
- Bagnyukova, T.V.; Luzhna, L.; Pogribny, I.; Lushchak, V., 2007. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 48,658–665. <https://doi.org/10.1002/em.20328>. PMID: 17685460.
- Bandyopadhyay, V.; Das, D.; Banerjee, R. K., 1999. Reactive oxygen species:

- Oxidative damage and pathogenesis. *Current Science*, 77, 658-666. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>.
- Bears, H., Richards, J.G., Schulte, P.M., 2006. Arsenic exposure alters hepatic arsenic species composition and stress mediated-gene expression in the common killifish *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology*. 77, 257–266.
- Beutler, E., 1963. Improved method for determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882-888.
- Beutler, E., 1975. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. Grune & Stratton. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.12.008>.
- Bhattacharya, A., Bhattacharya, S., 2005. Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.11.002>
- Bhattacharya, S.; Bhattacharyya, A.; Roy, S., 2007. Arsenic-Induced Responses in Freshwater Teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*. 33. 463-473. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9173-2>.
- 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*.; 72:248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- Bundschuh, J., Litter, M.I., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H.B., Jean, J.S., Liu, C. W. López, D., Armienta, M. A.; Guilherme, L.R.G.; Cuevas, A. G. Cornejo, L., Cumbal, L., Toujaguez, R., 2012. One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries. *Science of the Total Environment*.; 429:2-35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.024>.
- Camargo, M. M., & Martinez, C. B., 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental toxicology and pharmacology*, 21, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2005.07.016>
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M., 1998. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. *Free radical and antioxidant protocols*, 377-387. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:377>
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113, 484-490. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(85)13062-4)

- Cerqueira, C. C., & Fernandes, M. N., 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52, 83-91. <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2164>
- Chen, C.J., Kuo, T.L., Wu, M.M., 1988. Arsenic and cancer (Letter). *Lancet* 1, 414–415. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)91207-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)91207-x)
- Cockell, K.A., Hilton, J.W., Bettger, W.J., 1992. Hepatobiliary and hematological effects of dietary di sodium arsenate heptahydrate in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 103, 453–458. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(92\)90164-3](https://doi.org/10.1016/0742-8413(92)90164-3).
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>.
- Cordeiro, M.C., Garcia, G.D., Rocha, A.M., Tschoeke, D.A., Campeão, M.E., Appolinario, L.R., Soares, A.C., Leomil, L., Froes, A., Bahiense, L., Rezende, C.E., de Almeida, M.G., Rangel, T.P., De Oliveira, B.C.V., de Almeida, D.Q.R., Thompson, M.C., Thompson, C.C., Thompson, F.L., 2019. Insights on the freshwater microbiomes metabolic changes associated with the world's largest mining disaster. *Science of the Total Environment*. 654, 1209–1217. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.112>.
- Csanaky, I., Grecus, Z., 2005. Role of glutathione in reduction of arsenate and g-glutamyltranspeptidase in disposition of arsenite in rats. *Toxicology* 207, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.09.002>
- Cui, D., Zhang, P., Lia, H., Zhanga, Z., Luoa W., Yanga, Z., 2020. Biotransformation of dietary inorganic arsenic in a freshwater fish *Carassius auratus* and the unique association between arsenic dimethylation and oxidative damage. *Journal of Hazardous Materials* 391,122-153. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122153>.
- Dangleben, N. L., Skibola, C.F., Smith, M. T., 2013. Arsenic immunotoxicity: a review, *Environmental Health*, 12, 73. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-12-73>.
- Dani, S.U., 2008. Efeitos da exposição crônica ao arsênio sobre a saúde: revisão da literatura e perspectivas para o futuro. Em: alertaparacatu.blogspot.com.br/2008/01/efeitos-da-exposio-crnica-ao-

arsnio.html

- Datta, S., Mailloux, H.-B. Jung, M. A. Hoque, M. Stute, K. M. Ahmed, and Y. Zheng, 2009. Redox trapping of arsenic during groundwater discharge in sediments from the Meghna riverbank in Bangladesh. *PNAS* October 6, 106, 16930-16935. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908168106>.
- D'Agostino, R., 2015. Rompimento de barragem em Mariana: perguntas e respostas. <http://g1.globo.com/cienciasaude/noticia/2015/11/rompimento-de-barragens-em-mariana-perguntas-e-respostas.html>.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7, 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Evans, D. H., 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 71, 47. <https://doi.org/10.1289/ehp.877147>.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M.; Choe, K. P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85, 97-177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>.
- Fattorini, D.; Bocchetti, R.; Bompadre, S.; Regoli, F., 2004. Total content and chemical speciation of arsenic in the polychaeta *Sabella spallanzanii*. *Marine Environmental Research*, 58, 839-843. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.102>.
- Ferreira, H., Leite, M.G.P., 2015. A Life Cycle Assessment study of iron ore mining. *Journal of Cleaner Production*, 108, 1081–1091. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.05.140>.
- Finkel, T., 1998. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*.10, 248–253. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(98\)80147-6](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(98)80147-6).
- Flora, S.J.S., Bhadauria, S., Pant, S.C., Dhaked, R.K., 2005. Arsenic induced blood and brain oxidative stress and its responses to some thiol chelators in rats. *Life Sciences*. 77, 2324–2337. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.04.016>
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.

- Hong, Y.S., Song, K. H., Chung, J.Y., 2014. Health effects of chronic arsenic exposure. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 47, 245–252. <https://doi.org/10.3961/jpmp.14.035>.
- Hong, S., Choi, S.D., Khim, J.S., 2018. Arsenic speciation in environmental multimídia samples from the Youngsan River Estuary, Korea: a comparison between freshwater and saltwater. *Environmental Pollution*. 237, 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.020>.
- Hopkins, J., & Tudhope, G. R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *British Journal of Haematology*, 25, 563-575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1973.tb01768.x>.
- Jayaprakash, M., Senthil Kumar, R., Giridharan, L., Sujitha, S.B., Sarkar, S.K., Jonathan, M.P., 2015. Bioaccumulation of metals in fish species from water and sediments in macrotidal Ennore creek, Chennai, SE coast of India: a metropolitan city effect. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.042>.
- Keen, J. H., Habig, W. H., & Jakoby, W. B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251, 6183-6188.
- Kobayashi, Y.; Cui, X.; Hirano, S., 2005. Stability of As metabolites As-triglutathione [As (GS)₃] and methylAsdiglutathione [CH₃As(GS)₂], in rat bile. *Toxicology*. 211, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.03.001>.
- Kumar, R., Banerjee, T. K., 2012. Impact of sodium arsenite on certain biomolecules of nutritional importance of the edible components of the economically important catfish *C. batrachus* (Linn.), *Ecology of Food and Nutrition*. 51, 114–127. <https://doi.org/10.1080/03670244.2012.661330>.
- Kumar, N., Guptab, S. K., Bhushanc, S., Singha, N. P., 2019. Impacts of acute toxicity of arsenic (III) alone and with high temperature on stress biomarkers, immunological status and cellular metabolism in fish. *Aquatic Toxicology*, 214, 105233 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105233>.
- Kumari, B., Kumar, V., Sinha, A.K., Ghosh, A.K., Wang, H., DeBoeck, G., 2017. Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems. *Environmental Chemistry Letters*, 15, 43–64. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0588-9>.
- Lai, V.W.M., Cullen, W.R., Ray, S., 2001. Arsenic speciation in sea scallop gonads. *Applied Organometallic Chemistry*. 15, 490–498.

- <https://doi.org/10.1002/aoc.191>
- Lavanya, S., Ramesh, M., Kavitha, C., Malarvizhi, A., 2011. Hematological, biochemical and ionoregulatory responses of Indian major carp *Catla catla* during chronic sublethal exposure to inorganic arsenic. *Chemosphere*; 82:977-985. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.071>.
- Leslie, E.M., 2012. Arsenic-glutathione conjugate transport by the human multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 108, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.009>
- Liu, C.H., Liu, Y., Powell, D.A., Waalkes, M.P., Klaassen, C.D., 2001. Multidrug resistance mdr-1a/1b double knockout mice are more sensitive than wild type mice to acute arsenic toxicity, with higher arsenic accumulation in tissues. *Toxicology* 170, 55–62. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00532-7](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00532-7).
- Lunardelli, B., Cabral, M. T., Vieira, C. E. D., Oliveira, L. F., Risso, W. E., Meletti, P. C. & Martinez, C. B. R., 2018. Chromium accumulation and biomarker responses in the Neotropical fish 11 *Prochilodus lineatus* caged in a river under the influence of tannery activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 153, 188–194 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.023>.
- Lushchak, V., 2010. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands). 101. 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.
- Martinez, C.B.R., Souza, M.M., 2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comparative Biochemistry Physiology*. 133A, 151-160. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00144-7).
- Martinez, C. B. R., Nagae, M. Y., Zaia, C. T. B. V., & Zaia, D. A. M., 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Brazilian Journal of Biology*, 64, 797-807. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842004000500009>.
- McCafferty-Grad, J., Bahlis, N.J., Krett, N., Aguilar, T.M., Reis, I., Lee, K.P., Boise, L.H., 2003. Arsenic trioxide uses caspase-dependent and caspase independent death pathways in myeloma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1155–1164.
- McCord, J. M., & Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, 244, 6049-6055.

- Miller Jr., W.H., Schipper, H.M., Lee, J.S., Singer, J., Waxman, S., 2002. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Research*. 62, 3893–3903.
- Nachman, K. E., Ginsberg, G. L., Miller, M.D., Murray, C.J., Nigra, A. E., 2017. Pendergrast, Mitigating dietary arsenic exposure: current status in the United States and recommendations for an improved path forward, *Science of the Total Environment*. 581–582, 221–236. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.112>
- Nandi, D., Patra, R.C., Swarup, D., 2005. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology* 211, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.02.013>.
- Oliveira, L. F., Santos, C., Risso, W. E., Martinez, C. B. R., 2018. Triple-Mixture of Zn, Mn, and Fe Increases Bioaccumulation and Causes Oxidative Stress in Freshwater Neotropical Fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 37(6):1749-1756. <https://doi.org/10.1002/etc.4133>.
- Oremland, R.S., Stolz, J.F., 2003. The ecology of arsenic. *Science* 300, 939-944. <https://doi.org/10.1126/science.1081903>.
- Pace, C., Dagda, R., Angermann, J., 2017. Antioxidants protect against arsenic induced mitochondrial cardio-toxicity, *Toxics* 5, 38. <https://doi.org/10.3390/toxics5040038>
- Painefilú, J. C., Pascuala, M. M., Bieczynskib, F., Laspoumaderesc, C., González, C., Villanueva, S. F. M., Luqueta, C. M., 2019. Ex vivo and in vivo effects of arsenite on GST and ABCC2 activity and expression in the middle intestine of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 225, 108566. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108566>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.032>.
- Pedlar, R. M.; Ptashynski, K. G.; Wautier, K. G.; Evans, R. E.; Baron, C. L.; Klaverkamp, J. F., 2002. The accumulation, distribution, and toxicological effects of dietary arsenic exposure in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*)

- and lake trout (*Salvelinus namaycush*). Comparative Biochemistry and Physiology. 131,73-91. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(01\)00281-2](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(01)00281-2).
- Pi, J., Qu, W., Reece, J.M., Kumagai, Y., Waalkes, M.P., 2003. Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. Experimental Cell Research. 290, 234–245. [https://doi.org/10.1016/s0014-4827\(03\)00341-0](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(03)00341-0).
- Ramanathan, K., Shila, S., Kumaran, S., Panneerselvam, C., 2003. Ascorbic acid and alphanatocopherol as potent modulators on arsenic induced toxicity in mitochondria. Journal of Nutritional Biochemistry 14:416-20. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(03\)00076-7](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(03)00076-7).
- Ratnaike, R.N., 2003. Acute and chronic arsenic toxicity. Postgraduate Medical Journal. 79, 391-396. <https://doi.org/10.1136/pmj.79.933.391>
- Regoli F, Giuliani ME., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. Marine Environmental Research,93:106-117. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>.
- Rocha, C.H.B., Azevedo, L.P., 2015. Avaliação da presença de metais pesados nas águas superficiais da Bacia do Córrego São Mateus, Juiz de Fora (MG). RevistaEspinhaço 4: 33-44.
- Rodríguez, V.M., Jiménez-Capdeville, M.E., Giordano, M., 2003. The effects of arsenic exposure on the nervous system. Toxicology Letters,145:1-18. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(03\)00262-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(03)00262-5)
- Roy, S.; Chattoraj, A.; Bhattacharya, S., 2006. Arsenic-induced changes in optic tectal histoarchitecture acetylcholinesterase – acetylcholine profile in *Channa punctatus*: amelioration by selenium. Comparative Biochemistry Physiology, 1,16–24. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.04.018>.
- Sampayo-Reyes, A., Zakharyan, R.A., 2006. Inhibition of human glutathione S-transferase omega by tocopherol succinate. Biomedicine and Pharmacotherapy. 60, 338-244. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.04.005>
- Saravanan, M., Vidhya, A.E., Ramesh, M., Malarvizhi, A., Kavitha, C., 2011. Impact of endosulfan on certain hematological and biochemical parameters of catfish *Labeo fimbriatus*: sublethal study. Toxicology and Industrial Health 27, 555–562. <https://doi.org/10.1177/0748233710393397>.
- Saravanan, M., Kim, J., Kim, H., Kim, S., Ko, D., Hur, J., 2015. Ecotoxicological impacts of isoprothiolane on freshwater fish *Cyprinus carpio* fingerlings: a

- multi-biomarker assessment. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 58, 491–499. <https://doi.org/10.1007/s13765-015-0066-2>.
- Schlenk, D.; Wolford, L.; Chelius, M.; Stevens, J.; Chan, K.M., 1997. Effect of arsenite, arsenate, and the herbicide monosodium methyl arsonate (MSMA) on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in channel catfish. *Comparative Biochemistry Physiology*. 118, 177–183. [https://doi.org/10.1016/s0742-8413\(97\)00083-2](https://doi.org/10.1016/s0742-8413(97)00083-2).
- Schofield, K., 2017. The metal neurotoxins: an important role in current human neural epidemics? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14, 1511. <https://doi.org/10.3390/ijerph14121511>.
- Shah, S. L., Altindag, A., 2004. Hematological parameters on tench (*Tinca tinca* L.) after acute and chronic exposure to lethal and sublethal mercury treatments, *Bull. Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 73, 911–918. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0513-y>.
- Shi, H., Hudson, L.G., Ding, W., Wang, S., Cooper, K.L., Liu, S., Chen, Y., Shi, X., Liu, K.J., 2004. Arsenite causes DNA damage in keratinocytes via generation of hydroxyl radicals. *Chemical Research in Toxicology*, 17:871-8. <https://doi.org/10.1021/tx049939e>.
- Silva, A. O., Martinez, C. B. R., 2014. Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. *Aquatic toxicology*, 156, 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.009>.
- Simonato, J.D.; Mela, M.; Doria, H.B.; Guiloski, I.C.; Randi, M.A.F.; Carvalho, P.S.M.; Melletti, P.C.; Assis, H.C.S; Bianchini, A.; Martinez, C.B.R., 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, 170, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.012>.
- Singh, M. Khan H., Verma Y., Vir Singh Rana S., 2019. Distinctive fingerprints of genotoxicity induced by As, Cr, Cd, and Ni in a freshwater fish. *Environmental Science and Pollution Research*, 26:19445–19452 <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05274-z>.
- Soundararajan, M.; Veeraiyan, G.; Samipillai, S., 2009. Arsenic induced oxidative stress in freshwater catfish *Tilapia mossambica*. *Journal of Phytology Section*:

- General Science. 1. 267-276. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0588-9>.
- Stassen, M.J.M., Preeker, N.L., Ragas, A.M.J., van de Ven, M.W.P.M., Smolders, A.J.P., Roeleveld, N., 2012. Metal exposure and reproductive disorders in indigenous communities living along the Pilcomayo River, Bolivia. *Science of the Total Environment*, 427-428, 26e34. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.072>.
- Sun, H-J, Zhang, J.Y., Wang Q., Zhu E., Chen W., Lin H., Chen J., Hong H., 2019. Environmentally relevant concentrations of arsenite induces developmental toxicity and oxidative responses in the early life stage of zebrafish. *Environmental Pollution* 254, 113022. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113022>.
- Tripathi, S., Sahu, D.B., Kumar, R., Kumar, A., 2003. Effect of acute exposure of sodium arsenite (Na₃ AsO₃) on some haematological parameters of *Clarias batrachus* (common Indian catfish) in vivo. *Indian Journal of Environmental Health*, 45, 183– 188.
- Townsend, D.M., Tew, K.D., 2003. The role of glutathione-S-transferase in anticâncer drug resistance. *Oncogenes* 22, 7369–7375. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>.
- Ventura-Lima, J.; Castro, M. R.; Acosta, D.; Fattorini, D.; Regoli, R.; Carvalho, L. M. C.; Bohrer, D.; Geracitano, L. A.; Barros, D. M.; Marins, L. F. F.; Silva, R. S.; Bonan, C. D.; Bogo, M. R.; Monserrat, J. M., 2009. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149, 538–543. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.12.003>
- Ventura-Lima, J.; Bogo, M.; Monserrat, J. M., 2011. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach. *Ecotoxicology and environmental safety*. 74. 211-8 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.11.002>.
- von Sperling, E., 2002. Considerações sobre o problema do arsênio em águas de abastecimento. In: VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.
- Wang, Y.C., Chaung, R-T., Tung, L-C., 2004. Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines. *Aquatic Toxicology*, 69, 67–69 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.007>.
- Wendelaar Bonga, S. E., 1997. The stress response in fish. *Physiological*

- reviews, 77, 591-625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>.
- WHO (2010), Exposure to Arsenic: a Major Public Health Concern. <http://www.who.int/ipcs/assessment/publichealth/arsenic/en/>.
- Yi, Y., Zhang, S., 2012. Heavy metal (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) concentrations in seven fish species in relation to fish size and location along the Yangtze River. *Environmental Science and Pollution Research*, 19: 3989-3996. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0840-1>.
- Zakharyan, R.A., Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.M., Aposhian, H.V., 1999. Enzymatic methylation of arsenic compounds. VII. Monomethylarsonous acid (MMAIII) is substrate for MMA methyltransferase of rabbit and human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 158, 9–15. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8687>.

ANEXO



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 185/2018

Londrina, 07 de novembro de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "Avaliação dos efeitos do arsênio para peixes utilizando-se diferentes biomarcadores" protocolo CEUA nº 18600.2018.25 sob a responsabilidade de **Claudia Bueno dos Reis Martinez**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel), em reunião realizada em **06/11/2018**.

Este projeto tem por objetivo avaliar a dinâmica de acúmulo do arsênio, seus possíveis efeitos e mecanismos de toxicidade utilizando-se diversos biomarcadores para juvenis de *Prochilodus lineatus* (curimba ou curimatá), expostos a diferentes concentrações por 24,96 e 168 horas. Grau de invasividade=2

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	08/11/2018 a 31/12/2019
Espécie/ linhagem/ raça	Peixe/ <i>Prochilodus lineatus</i> (curimba)
Nº de animais	192
Peso/ Idade	30g/ Juvenis
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Aquicultura Venites, Linha Nova Videira - Coopagro, 85900-010, Toledo, Paraná, Brasil
Amostras a serem coletadas	Sangue, Brânquias, Fígado, Músculo, Cérebro

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/Uel

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Claudia Bueno dos Reis Martinez
 Responsável pelo projeto
 Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para a Chefia do Depto de Ciências Fisiológicas/CCB
 C/C para a Direção de Centro do CCB

CAPÍTULO 3

EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS DO ARSÊNIO PARA A LINHAGEM DE HEPATÓCITOS DE *Danio rerio* (ZFL)

Manuscrito a ser submetido a publicação na revista *Toxicology in Vitro*.

Normas disponíveis em:

<https://www.elsevier.com/journals/toxicology-in-vitro/0887-2333/guide-for-authors>

EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS DO ARSÊNIO PARA A LINHAGEM DE HEPATÓCITOS DE *Danio rerio* (ZFL)

Kathya Assmann Modesto^{1,2} e Claudia Bueno dos Reis Martinez^{1*}

¹Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

²Universidade Estadual do Norte do Paraná, *campus* Cornélio Procópio, Paraná, Brasil.

* Autor correspondente: Claudia Bueno dos Reis Martinez – Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brasil, CEP 86057-970. Tel: +55 (43) 3371 5146. E-mail: claudiabrmartinez@gmail.com; cbueno@uel.br

RESUMO

O Arsênio (As) é um contaminante ambiental comumente encontrado em várias regiões do planeta. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do As para linhagem de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL). As células foram expostas ao As nas concentrações (em $\mu\text{g.L}^{-1}$) de 0,1 (As 0,1), 10 (As 10) e 100 (As 100) ou somente ao PBS (CTR) por 1, 3 e 6 h. A viabilidade celular foi avaliada pela funcionalidade mitocondrial (MTT) e integridade da membrana (Azul de Trypan). A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante total (ACAP) também foram mensuradas. Já a genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio do cometa. A viabilidade celular pelo Azul de Trypan mostrou que a concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi citotóxica em todos os tempos de exposição para ZFL, enquanto que no MTT essa alteração foi verificada apenas após 6 h. A

geração de ERO foi diminuída em todos os grupos em 1 h de exposição e o mesmo aconteceu no grupo As 0,1 em 3 h e nos grupos As 10 e As 100 em 6 h. Já a ACAP foi aumentada em todos os grupos experimentais em 6 h. Com relação aos danos ao DNA, o grupo As 100 mostrou aumento no escore de danos em 1 h. Em 3 h, os danos foram aumentados em todos os grupos e em 6 h, apenas nos grupos As 10 e As 100. Em conjunto, nossos resultados demonstram que o As, principalmente na maior concentração, foi citotóxico e genotóxico para ZFL, apesar de ter estimulado as defesas antioxidantes das células.

Palavras-chave: defesa antioxidante, cultura de células, danos ao DNA, ensaio in vitro, metaloide.

1. INTRODUÇÃO

O Arsênio (As) é um contaminante ambiental amplamente distribuído por todo o globo terrestre, classificado em primeiro lugar na lista de substâncias perigosas à saúde humana da ATSDR em 2017 (<https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>). Sua entrada no meio ambiente pode ocorrer de forma natural, devido ao intemperismo das rochas ou atividades vulcânicas, ou ainda por resíduos de atividade de mineração, efluentes industriais e agrotóxicos (Hong et al., 2018; Capillo et al., 2018). A ingestão de água contaminada é uma das mais importantes vias de exposição ao As (Liu e Zhang, 2020). Na América Latina estima-se que pelo menos 4,5 milhões de pessoas bebam água contaminada com As, com concentrações que variam de 50 a 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fariás et al., 2008), ou seja, até 200 vezes maior que o permitido pela Organização Mundial da Saúde, que estabelece o limite de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de As para água de consumo humano (WHO, 2018), a mesma concentração permitida pela legislação brasileira na resolução CONAMA 357/2005. No Brasil, os primeiros trabalhos mostrando água contaminada com As datam de 1998 (Bundschuh et al., 2009) e concentrações de 2 a 2980 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de As em corpos de água e 150 a 390 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de As no solo já foram detectadas (Bundschuh et al., 2012).

Na água, o As encontra-se disponível nas formas inorgânicas e orgânicas. O As inorgânico é encontrado em quatro estados de oxidação como arsenito (+ III), arsenato (+ V), arsino (-III) e arsênio (0), sendo o arsenito e o arsenato os mais comuns. As espécies inorgânicas tendem a ser mais tóxicas para os organismos, incluindo humanos, outros animais e plantas (Goessler e Kuehnelt, 2002; Meharg e Hartley-Whitaker, 2002; Ng, 2005), sendo que o arsenito existente na água traz mais preocupações devido a sua maior toxicidade e dificuldade de remoção (Singh et al., 2015; Fan et al., 2016). A toxicidade do arsênio trivalente é relacionada com a sua alta afinidade com grupos sulfidrilas de biomoléculas, como a glutatona (GSH), o ácido lipoico e também com grupamentos cisteína de muitas enzimas (Aposhian e Aposhian, 2006). A ligação do As III com esses grupamentos resulta em muitos efeitos prejudiciais, como a inibição da atividade de enzimas como a glutatona redutase e a glutatona

peroxidase (Schuliga et al., 2002; Wang et al., 1997; Lin et al., 2001; Chang et al., 2003). Já o arsenato, devido as suas propriedades bioquímicas serem semelhantes ao fosfato, pode substituí-lo nas reações de fosforilação de transferência de energia, resultando no comprometimento da síntese de ATP (Fattorini e Regoli, 2004). Outra diferença entra as duas formas é que o arsenito pode entrar na célula por difusão e através do envolvimento de outros sistemas de transporte como as aquaporinas, enquanto a entrada do arsenato nas células está ligada a transportadores de fosfato (Thomas, 2007). Já as formas metiladas, como o monometilarsenato (MMA) e dimetilarsinato (DMA), são consideradas moderadamente tóxicas. Em comparação, o arsenito é sessenta vezes mais tóxico que o arsenato e setenta vezes mais tóxico que as formas metiladas (Akter et al., 2005).

Em ecossistemas aquáticos, os peixes são importantes bioindicadores da toxicidade do As por estarem continuamente expostos ao metaloide devido a respiração branquial e a alimentação contaminada pelo mesmo (Gernhöfer et al., 2001; Bears et al., 2006; Ghosh et al., 2007). Alguns estudos já demonstraram diversos efeitos da contaminação de As em diferentes espécies, como alterações hematológicas, estresse oxidativo, aumento de respostas antioxidantes entre outros (Bhattacharya e Bhattacharya, 2007; Bagnyukova et al., 2007; Ventura-Lima et al., 2009a, 2009b; Lavanya et al., 2011; Kumar et al., 2019; Painefflu et al., 2019; Sun et al., 2019; Cui et al., 2020).

Os ensaios *in vivo* são amplamente utilizados na avaliação da toxicidade de compostos químicos, entretanto, o grande número de animais usado na avaliação de risco ambiental destacou a necessidade de novas abordagens. O desenvolvimento de ensaios *in vitro* baseados em cultura de células de peixes tem sido proposto como uma alternativa promissora para reduzir e/ou substituir o uso de peixes em testes de toxicidade aquática (Ankley et al., 2010; Worth et al., 2014). Testes com células e embriões representam sistemas experimentais padronizados que são realizados em um ambiente controlado, proporcionando respostas rápidas e acessíveis, com resultados eticamente elegíveis (Garcia et al., 2016). As culturas celulares permitem a comparação entre as espécies por sua sensibilidade relativa ao ambiente e contaminantes, auxiliando a compreensão dos mecanismos de ação dos contaminantes em nível celular

(Zeng et al., 2016). Dessa forma, as linhagens celulares de peixes vêm sendo aplicadas em toxicologia para avaliação dos efeitos de produtos químicos, incluindo agrotóxicos, metais, drogas, nanopartículas, bem como amostras ambientais, como extratos de sedimentos, águas superficiais e águas residuais (Zegura e Filipic, 2019).

No presente estudo, foi utilizado a linhagem de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL), considerada relevante para a identificação de alterações toxicológicas em organismos aquáticos (Gajski et al., 2016). Muitos estudos têm mostrado que esta linhagem é sensível a diversas classes de contaminantes, como metais (Chen e Chan, 2018; Sandrini et al., 2009; Tang et al., 2013), nanomateriais (Azevedo Costa et al., 2012; Morozesk et al., 2018; Thit et al., 2017), produtos farmacêuticos (Gajski et al., 2016; Novak et al., 2017), biodiesel (Cavalcante et al., 2014), gasolina (Lachner et al., 2015) e herbicidas (Goulart et al., 2015; Lopes et al., 2018; Silva et al., 2020). Além disso, culturas de células de peixes são frequentemente usadas como sistemas modelo para estudar os mecanismos de respostas celulares em ensaios toxicológicos, já que elas exibem muitas das mesmas defesas gerais de mamíferos (Wan et al., 2009). Com relação ao As, Seok e colaboradores (2007) demonstraram que o metaloide alterou a morfologia celular e causou apoptose em ZFL expostas a diferentes concentrações de As (0 a 140 $\mu\text{g.L}^{-1}$) por 24 horas. Outros estudos também mostraram o aumento de apoptose causado pela exposição ao As em hepatócitos humanos (Xu et al., 2010; Liu e Zhang, 2020). Assim, visando esclarecer os efeitos do As em diferentes culturas de células, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do metaloide para a linhagem de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) expostos às concentrações estabelecidas na legislação brasileira por 1,3 e 6 horas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS ZFL AO AS

A linhagem de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL) foi mantida em meio de cultura contendo 50% Leibovitz's L-15 medium (GIBCO®), 40% RPMI médium 1640 (GIBCO®) e 10% de soro bovino fetal (GIBCO®), em frascos de 25 cm², em estufa sem CO₂ a 28°C.

As células foram transferidas para diferentes placas dependendo do teste a ser realizado. Para os ensaios bioquímicos, utilizou-se placas pretas de 96 poços. Para o ensaio do cometa, utilizou-se placas transparentes de 6 poços. Independente do teste, as células foram semeadas sempre 24 horas antes dos experimentos. Nas placas de 96 poços, foram semeadas 1×10^6 células. mL⁻¹. Para as placas de 6 poços, foram semeadas 2×10^6 células. mL⁻¹. Em todos os testes foram feitos 4 placas (réplicas) para cada tempo de exposição. No dia do experimento, as placas foram incubadas a 28°C por 1, 3 e 6 horas, tempo de exposição selecionado para que as células possam manter suas características fisiológicas sem prejuízo, considerando que as mesmas ficam imersas em PBS, ou seja, sem meio de cultura durante os testes. Além disso, estes períodos são suficientes para averiguar a ocorrência de danos no DNA, se há reparo do DNA, geração de ERO entre outros. O grupo controle (CTR) recebeu apenas salina fosfatada livre de cálcio e magnésio (PBS- KCl, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄) enquanto que os tratamentos receberam uma solução de arsênio a 0,1 µg.L⁻¹ (As 0,1), 10 µg.L⁻¹ (As 10) e 100 µg.L⁻¹ (As 100). Para o controle positivo, foi adicionado uma solução de metil metanosulfonato (MMS) a uma concentração de 4mM. Todas as soluções foram preparadas em PBS estéril e os meios experimentais contendo As foram preparados a partir de uma solução mãe de arsenito de sódio (NaAsO₂ marca Neon) com concentração de 100 mg.L⁻¹, preparada sempre 24 horas dos experimentos. As concentrações testadas foram baseadas na legislação vigente (resolução CONAMA 357/2005), a qual estabelece como limite máximo de As para água doce onde haja pesca ou cultivo de peixes a concentração de 0,14 µg.L⁻¹ e para corpos de água doce em geral a concentração de 10 µg.L⁻¹. A maior concentração foi estabelecida baseada em

estudos que encontraram concentrações semelhantes em corpos de água no Brasil (Bundschuh et al., 2012, Rocha e Azevedo, 2015).

2.2 TESTES DE CITOTOXICIDADE

Para avaliar a citotoxicidade foram utilizados dois testes, analisando a atividade mitocondrial (MTT) e a análise da integridade da membrana plasmática (Azul de Trypan). Os dois testes foram realizados em cinco concentrações de As (0,1, 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$), sendo selecionadas três concentrações para a realização das análises seguintes, conforme descrito anteriormente. A concentração de 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi descartada pois causou a morte da maioria das células. Já a concentração de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ mostrou citotoxicidade semelhante a concentração de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Como a concentração de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ é um valor presente na legislação, optou-se por excluir a concentração de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

A redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5- difeniltetrazole bromido (MTT) é um ensaio que verifica atividade mitocondrial, baseado em Mosmann (1983), com modificações. Após as exposições, as soluções testes foram retiradas e adicionou-se MTT (0,5 mg.mL^{-1}) às placas, que foram incubadas novamente por duas horas a 28°C. Após esse período, a solução de MTT foi removida e adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) para diluir os cristais de formazan. A leitura foi feita em espectrofluorímetro (VICTOR 3, PerkinElmer) a 540nm. As amostras expostas apenas ao PBS (grupo controle) foram consideradas 100% de viabilidade celular. A viabilidade dos tratamentos foi calculada em proporção ao grupo controle.

Para verificar a integridade da membrana plasmática foi utilizado o teste de exclusão por azul de Trypan. Após a exposição, as células foram retiradas da placa e coradas com azul de Trypan 0,4%. Em seguida, 100 células foram contadas na câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi expressada pela porcentagem de células viáveis. Foram selecionados para a realização dos outros testes, tratamentos que mostraram viabilidade celular igual ou superior a 80% (Tice et al., 2000).

2.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) foram determinadas de acordo com Amado et al. (2009), com modificações de acordo com da Silva e colaboradores (2020). Após as exposições, as soluções de arsênio foram retiradas e adicionado o meio de reação (30 mM HEPES, 200 mM KCl, 1 mM MgCl₂, pH 7,2). As amostras foram analisadas em quadruplicatas, sendo que duas amostras receberam apenas o tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,4) e as outras duas receberam 2-amidinopropano dihidrocloro (ABAP 10mM). Imediatamente foi feita a leitura da autofluorescência em leitor de microplaca a temperatura de 35°C (Victor 3, Perkin Elmer®). Em seguida, foi adicionado 2-7-Dicloro-Dihidro- fluoresceína (H₂DCF 1mM) em todos os poços e a leitura (ex:485 nm; em: 520 nm) foi feita a cada 5 minutos por 60 minutos, a 35°C (Azevedo Costa et al., 2012). A H₂DCF reage com espécies reativas de oxigênio, liberando diclorofluoresceína, um composto fluorescente. Assim, uma maior concentração de espécies reativas de oxigênio produz uma intensidade mais alta de fluorescência (Amado et al., 2009). Para quantificar a ROS e a ACAP, os dados de fluorescência foram ajustados a função polinomial de segunda ordem e o valor da integral foi calculada. Os valores da integral das amostras tratadas apenas com o tampão fosfato de potássio foram usados para calcular a quantidade de ROS e os resultados foram expressos como unidade de área de fluorescência por tempo (FU x min). A diferença entre as áreas das amostras tratadas e não tratadas com ABAP foram utilizadas para calcular a ACAP. Quanto maior a diferença entre as áreas menor será a capacidade antioxidante da amostra. Os dados de ACAP foram invertidos (1/área relativa) para facilitar a visualização dos dados.

2.4 ENSAIOS GENOTÓXICOS

Para avaliar possíveis danos ao DNA, foi realizado o ensaio alcalino do cometa, de acordo com Singh et al. (1988), com modificações descritas por da

Silva e colaboradores (2020). Neste ensaio, utilizou-se um controle positivo com MMS (metil metanosulfonato) 0,5 mM. Após a exposição, alíquotas de 20 µL de cada amostra foram homogeneizadas em agarose de baixo ponto de fusão a 0,8% e transferida para lâminas já impregnadas com agarose de ponto de fusão normal 1%, cobertas com lamínulas e alocadas em refrigerados por 40 minutos. Após a secagem, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2.5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) e mantidas em refrigerador até o dia seguinte. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese com tampão alcalino (1 mM EDTA and 300 mM NaOH, pH > 13) onde permaneceram por 30 minutos. Em seguida, a eletroforese foi conduzida a 25V e 300mA por 20 minutos. Então, as lâminas foram neutralizadas (0.4 M Tris, pH 7.5) por 15 minutos e fixadas em etanol 100% por 10 minutos. As lâminas foram coradas com GelRed (Biotium®) e 100 nucleoides por lâmina foram analisados, em teste cego, em microscópio de fluorescência (Leica®, DM 2500) na objetiva de 40X. Os danos ao DNA foram classificados visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA em 4 classes: classe 0 (nucleoide sem calda e com poucos fragmentos ao redor), classe 1 (nucleoide com calda menor que seu diâmetro), classe 2 (cauda com comprimento de até duas vezes o diâmetro do nucleoide), classe 3 (cauda com comprimento maior que duas vezes o diâmetro do nucleoide) (Collins et al., 2008). O escore de danos foi obtido multiplicando o número de nucleoides observados em cada classe de dano pelo valor da classe.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada parâmetro analisado, os resultados foram comparados entre os diferentes tratamentos (CTR x As 0,1 x As 10 x As 100) separadamente para cada tempo experimental (1,3 e 6 h). Os resultados obtidos foram primeiro testados quanto à normalidade (Shapiro-wilk) e homogeneidade da variância (Levene). Em seguida, utilizou-se a análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguida de um teste de comparação múltipla (teste de Newman-Keuls ou Dunns, respectivamente) quando

necessário. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (SE)

3. RESULTADOS

As concentrações de As nas soluções utilizadas nos diferentes experimentos estão expressas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de As total e dissolvido ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) nas soluções teste dos diferentes tratamentos. As concentrações correspondem às médias (\pm EP, $n= 9$) obtidas de todas as amostras coletadas em todos os experimentos realizados por 1, 3 e 6 h. Limite de detecção (LD): $0,05\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Grupo	As total	As dissolvido
CTR	Abaixo do LD	Abaixo do LD
As 0,1	$0,123 \pm 0,0144$	$0,106 \pm 0,0217$
As 10	$10,442 \pm 0,7077$	$9,293 \pm 0,1787$
As 100	$101,71 \pm 5,4021$	$92,856 \pm 7,4950$

3.1 CITOTOXICIDADE

Os resultados das análises de citotoxicidade realizadas em células ZFL após a exposição ao As estão apresentados na Figura 1. Com relação ao ensaio do MTT (Fig. 1A), os resultados mostraram um aumento na viabilidade celular nos grupos As 0,1 e As 10 ($P < 0,001$) após 3 h de exposição. Já após 6h, os resultados indicam que o As foi citotóxico na maior concentração testada (As 100) ($P < 0,001$), resultando em redução significativa da atividade mitocondrial nas células em relação aos outros grupos. No grupo C+ houve significativa redução na viabilidade em todos os tempos experimentais ($P < 0,001$).

A integridade da membrana plasmática, verificada pelo ensaio Azul de Trypan (Fig. 1B), foi acima de 80% em todos os tratamentos e tempos de exposição. No grupo As 100, houve diminuição da viabilidade após 1 h ($P= 0,003$), 3 h ($P= 0,004$) e 6 h ($P= 0,003$). Após 3 h de exposição a viabilidade no grupo As 10 também diminuiu ($P= 0,004$), assim como após 6 h o grupo C+ respondeu da mesma forma (Fig. 1B).

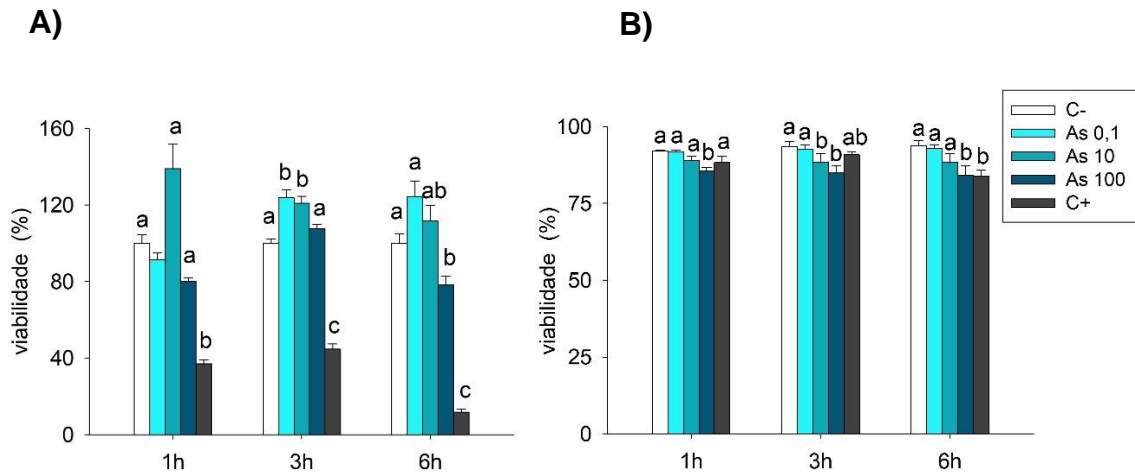


Figura 1- Viabilidade celular (%) baseada na atividade mitocondrial (A) e na integridade da membrana plasmática (B) de células ZFL expostas ao As nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 0,1), 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 10) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 100), ao MMS 0,5mM (C+) ou somente ao PBS (C-), por 1, 3 e 6h. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão ($n=44$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo experimental ($P < 0,05$).

3.2 ERO E ACAP

Considerando a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Fig. 2), ocorreu diminuição na produção em todas as concentrações testadas após 1 h de exposição ($P < 0,001$). Após 3 h, houve diminuição apenas no grupo As 0,1 e C+ ($P < 0,001$) e após 6 h nos grupos As 10, As 100 e C+ ($P < 0,001$).

Em relação a capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) (Fig. 3), após 6 h de exposição houve aumento nos grupos As 0,1, As 10 e As 100 ($P = 0,021$). Já após 1 h, apenas no grupo C+ mostrou aumento ($P = 0,002$).

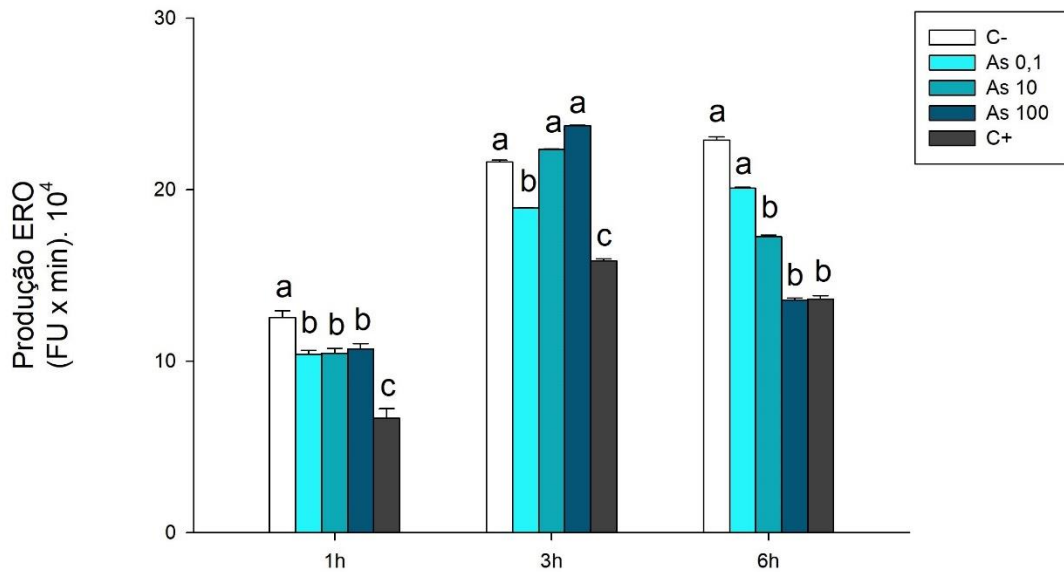


Figura 2 - Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) de células ZFL expostas ao As nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 0,1), 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 10) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 100), MMS 0,5mM (C+) ou somente ao PBS (C-), por 1, 3 e 6h. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão ($n=18$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo experimental ($P < 0,05$).

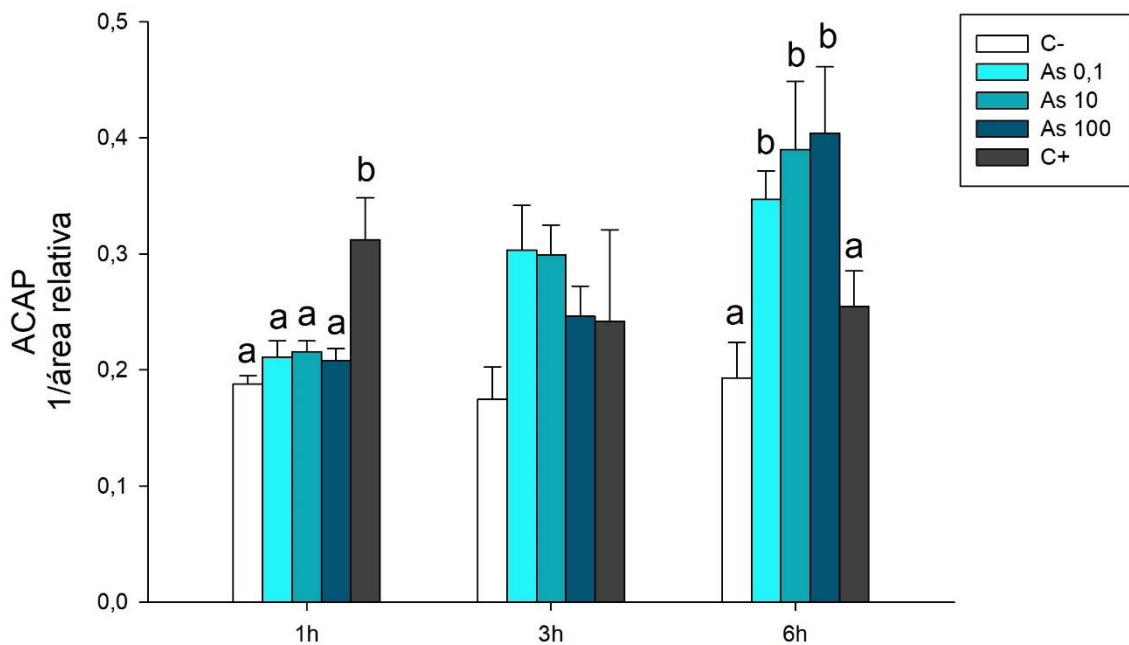


Figura 3 - Capacidade antioxidante contra radicais peroxil (ACAP) de células ZFL expostas ao As nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 0,1), 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 10) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 100), MMS a 0,5mM (C+) ou somente ao PBS (C-), por 1, 3 e 6h. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão ($n=18$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo experimental ($P < 0,05$).

3.3 GENOTOXICIDADE

A análise dos danos ao DNA (Fig. 4) mostrou que após 1 h de exposição, houve aumento no escore de danos apenas no grupo As 100 e C+ ($P < 0,001$). Já após 3 h, todos os grupos mostraram aumento no escore de danos ($P < 0,001$), enquanto após 6 h, a mesma resposta foi observada nos grupos As 10, As 100 e C+ ($P < 0,001$).

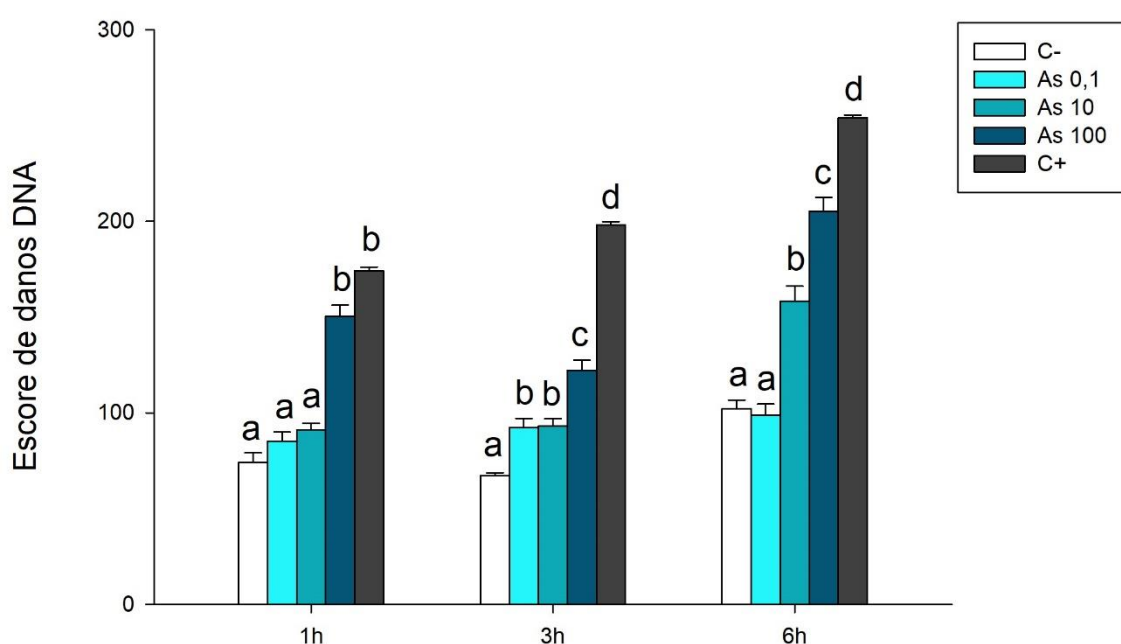


Figura 4 - Escore de danos de DNA de células ZFL expostas ao As nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 0,1), 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 10) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (As 100), MMS a 0,5mM (C+) ou somente ao PBS (C-), por 1, 3 e 6h. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão ($n=6$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para um mesmo tempo experimental ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Os peixes são particularmente suscetíveis a contaminação ambiental por metais e metaloides, porque eles os absorvem através do epitélio branquial e tendem a bioconcentrá-los na cadeia alimentar. Apesar de grande parte dos estudos realizados se concentrarem na toxicidade do As *in vivo*, pesquisas com cultura de células tem mostrado a toxicidade deste metaloide em doses mais baixas e menor tempo de exposição (Seok et al., 2007). Por exemplo, a concentração tóxica de As para a *Tilapia mossambica* após 10 dias de exposição é de 10 mg.L^{-1} (Suhendrayatna et al., 2002), enquanto células do ovário de tilápia (células TO-2) mostraram alteração no ciclo celular quando expostas a concentrações de $9,36 - 75 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ por 24 h (Wang et al., 2004). Com relação ao fígado, sabe-se que este é o principal órgão de detoxificação nos peixes, além de ser o responsável pela biotransformação do As (Wood, 2011). As culturas de hepatócitos são importantes modelos biológicos pois possuem a expressão de genes semelhante ao *in vivo* e podem sobreviver em cultura por tempo suficiente para estudos de exposições agudas (Eide et al., 2014).

Analisando a atividade mitocondrial, o As 100 foi citotóxico para ZFL interferindo na atividade mitocondrial em 6 h de exposição. Considerando a integridade da membrana plasmática, é possível observar que a diminuição da viabilidade foi influenciada pelas diferentes concentrações de As e também pelo tempo de exposição crescente, sendo que a maior concentração testada foi responsável por diminuir a viabilidade celular em todos os tempos experimentais. Resultados semelhantes foram apresentados por Seok e colaboradores (2007), que mostraram diminuição dose dependente na viabilidade de ZFL expostas a concentrações de 0 a 10 mg.L^{-1} de As por 24 h. Os tempos de exposição utilizados no presente trabalho são menores quando comparados ao estudo supracitado, o que talvez seja a razão para os resultados mais discretos apresentados. Muitos estudos têm demonstrado o efeito citotóxico do As em células hepáticas humanas (Xu et al., 2010, Liu e Zhang, 2020), linhagens celulares cancerígenas como Hela, A549 e HepG2 (Zhao et al., 2018) e células mieloides (Kian et al., 2019).

A contaminação por qualquer forma de As inorgânico, mesmo em baixas concentrações e curto período de exposição, pode aumentar a geração de ERO

(Schuliga et al., 2002; Ventura-Lima et al., 2011), o que ocorre durante o metabolismo do As e seus processos de detoxificação, sendo que o estresse oxidativo e seus danos têm sido considerados como os mecanismos responsáveis pela toxicidade do As (Jomova et al., 2011; Sun et al., 2016). Bhattacharya e Bhattacharya (2005) concluíram que a toxicidade da exposição ao As é mediada pelo H_2O_2 , que pode ser produzido pelas enzimas dos peroxissomos ou pela superóxido dismutase na mitocôndria. Além disso, a oxidação do As^{3+} em As^{5+} em condições fisiológicas resulta na formação de H_2O_2 , sendo que sua eliminação ocorre pela ação da catalase e glutathione peroxidase (Lushchak, 2011).

Sabendo que os sistemas antioxidantes podem atuar de forma cooperativa, a determinação mais holística da capacidade antioxidante pode fornecer uma melhor compreensão da resistência dos organismos a toxicidade causada por ERO, quando comparadas as medições de um número limitado de antioxidantes (Amado et al., 2009). Em muitos casos, as análises individuais trazem resultados conflitantes, assim a análise da capacidade antioxidante total demonstra mais claramente a resposta do animal ou cultura celular, ao invés de tentar identificar o que aconteceu com cada componente da complexa rede de defesa antioxidante (Winston et al., 1998; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Neste trabalho houve diminuição na geração das ERO já após 1 h de exposição em todos os tratamentos. Em 3 h, a diminuição ocorreu apenas no grupo As 0,1 e em 6 h, nos grupos As 10 e As 100. Além disso, o aumento da atividade mitocondrial observada nos grupos As 0,1 e As 10 em 3 h pode refletir a ativação do metabolismo celular em resposta a exposição ao As, podendo levar ao provável aumento na geração de ERO. Já a análise da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) foi aumentada em todos os grupos experimentais em 6 h de exposição. O aumento da ACAP demonstra que houve resposta antioxidante da ZFL, sendo que essa resposta provavelmente tenha sido suficiente para neutralizar as ERO, o que justifica a sua diminuição.

Esse resultado corrobora outro estudo realizado em nosso laboratório, no qual *Prochilodus lineatus* demonstraram aumento na atividade das enzimas antioxidantes primárias quando foram expostos ao As nas concentrações de 0,1, 10 e 1000 $\mu g.L^{-1}$ por 96 h. Resultado semelhante também foi apresentado por

Azevedo Costa e colaboradores (2012) com ZFL que apresentaram diminuição na geração de ERO e aumento na ACAP quando expostas a 7,5 mg.L⁻¹ de As por 4 h, assim como Zhu e Chan (2012), os quais também identificaram diminuição na produção de ERO em ZFL expostas a 1,6 e 3,4 mg.L⁻¹ de cádmio por 24 h. Com base nesses dados, pode-se admitir que para as concentrações testadas e os tempos de exposição utilizados no presente trabalho, as defesas antioxidantes da célula foram suficientes para protegê-la das ERO, não ocorrendo estresse oxidativo. Com relação ao C+, apesar do aumento encontrado em 1 h na ACAP, os resultados demonstram que o composto utilizado (MMS) não induziu a geração de ERO, pelo contrário, promoveu redução significativa de ERO em todos os tempos experimentais. O MMS é um agente conhecidamente genotóxico que foi testado neste protocolo e não se mostrou adequado como controle positivo, pois não induziu estresse oxidativo.

Outro importante aspecto ser avaliado em um contaminante é a sua genotoxicidade. A avaliação da genotoxicidade é fundamental em estudos toxicológicos, uma vez que contaminantes presentes no ambiente podem danificar o DNA, que, se não for reparado, pode comprometer a saúde dos organismos e populações. Para analisar o dano ao DNA, várias abordagens *in vivo* e *in vitro* são usados, com particular ênfase para o desenvolvimento de estudos *in vitro* (Costa et al., 2019). No presente estudo, para avaliar a genotoxicidade do As foi utilizado o ensaio do cometa, por ser um ensaio sensível, confiável, rápido e de baixo custo para detecção de quebras de fita simples e dupla de DNA, sítios alcalinos lábeis, e eventos de reparo de excisão incompleta no nível de células individuais (Zegura e Filipic, 2019). Os resultados mostraram um aumento no escore de danos ao DNA desde a mais curta exposição, já em 1 h no grupo As 100. O mesmo resultado se repetiu em 3 h em todas as concentrações testadas, e também nos grupos As 10 e As 100 em 6 h, evidenciando a genotoxicidade do As para ZFL. Conforme esperado, o grupo C+ mostrou aumento do escore de danos em todos os períodos de exposição, evidenciando o potencial genotóxico do MMS. O MMS é um agente alquilante que forma monoadutos com os centros nucleofílicos do DNA (Jenkins et al., 2005). Essa alquilação induzida é capaz de bloquear a maioria das DNA polimerases, impedindo assim a ocorrência do processo de replicação do DNA

(Fu et al., 2012) ou ainda, induz a uma mutação de transcrição (Lips e Kaina, 2001). Segundo Tice e colaboradores (2000), agentes reconhecidamente genotóxicos devem ser incluídos nos protocolos experimentais a fim de se avaliar uma resposta positiva condizente com a indução de danos de DNA provocada por esses agentes.

Uma série de estudos indica que a exposição crônica a baixos níveis de arsênio pode induzir danos ao DNA, causando aumento taxa de apoptose (Martinez et al. 2011; Pei et al. 2013). Recentemente, estudos com resultados semelhantes foram apresentados por Singh e colaboradores (2019) no qual eritrócitos de *Channa punctatus* mostraram aumento de danos ao DNA quando expostos a 0,5 mg.L⁻¹As por 30 dias. Em outro estudo com a mesma espécie, Jha e colaboradores (2019) encontraram aumento na fragmentação do DNA de peixes expostos ao As em concentrações de 10, 50 e 500 µg.L⁻¹ por 14 dias. O efeito genotóxico do As observado nos estudos realizados com altas concentrações de As parece estar relacionado ao estresse oxidativo (Liu et al. 2001; Nesnow et al. 2002; Hei e Filipic 2004; Lantz e Hays 2006; Ruiz-Ramos et al. 2009; Kitchin e Conolly 2010; Jomova et al. 2011; Alarific et al. 2013; Dash et al. 2018), hipótese também admitida por Kumar (2016) em uma revisão sobre a genotoxicidade do As. Nesta situação, os peixes expostos a essas concentrações exibem na sua maioria aumento da frequência de aberrações cromossômicas, aumento no número de micronúcleos e quebra no DNA (Datta et al. 2007; Yadav e Trivedi 2009; Ramirez e Garcia 2005; Ahmed et al. 2011; Das et al. 2012).

Entretanto, no presente trabalho as defesas antioxidantes parecem ter sido suficientes para evitar um aumento de ERO, portanto os danos ao DNA muito provavelmente não têm origem oxidativa e devem ter sido causados pela ação direta do metalóide. Embora muitos estudos têm sido feitos para determinar a genotoxicidade do As para peixes (Ali et al. 2008), as cascatas de sinalização envolvidas neste processo ainda permanecem desconhecidas (Singh et al., 2019). Para células humanas, sabe-se que o As não se liga ao DNA e não forma adutos de DNA e tampouco causa mutações diretamente, mas é capaz de induzir genotoxicidade interferindo no reparo do DNA e induzindo instabilidade cromossômica na célula (Klein et al., 2007; Mandal, 2017). A inibição do reparo

do DNA, por ligação direta ou afetando a expressão de genes de reparo do DNA, é um mecanismo importante para a genotoxicidade induzida por arsênio (Andrew et al., 2003), resultando na mutação de genes supressores de tumor, como o p53 (Kelsey et al., 2005). O As pode inibir diretamente diferentes vias de reparo, incluindo reparo de excisão de nucleotídeos, reparo de excisão de base e reparo de incompatibilidade (Hossaim et al., 2012). O As também induz quebras na fita dupla, o que leva a aberrações cromossômicas (Klein et al., 2007; Xie et al., 2014). Vários estudos demonstraram que a exposição crônica ao arsênio na água potável aumentou a incidência de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e formação de micronúcleos em células humanas (Dulout et al., 1996; Gonsebatt et al., 1997; Mäki-Paakkanen et al., 1998; Mahata et al., 2003). A instabilidade cromossômica causada pelo arsênio é frequentemente observada nos centrômeros, resultando na formação de cromossomos acêntricos ou na fusão dos centrômeros, resultando em aneuploidia e formação de micronúcleos (Xie et al., 2014; Kesari et al., 2012).

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que apesar do As ter estimulado as defesas antioxidantes das células, diminuindo a geração de ERO, o mesmo foi citotóxico e genotóxico para ZFL, sendo as alterações mais evidentes observadas nos grupos As 10 e As 100 em 6 h de exposição. Possivelmente o aumento encontrado na capacidade antioxidante total foi suficiente para neutralizar as ERO, o que evitou o estresse oxidativo. Essa resposta provavelmente é devida as baixas concentrações testadas e também pelo curto período de exposição, pois conforme já discutido é sabido que o estresse oxidativo é a principal consequência da exposição a grandes concentrações de As ou por longos períodos. Mesmo assim, considerando a menor concentração testada, o grupo As 0,1 demonstrou aumento nos danos ao DNA com apenas 3 h de exposição. Já a maior concentração foi capaz de induzir danos em todos os períodos de exposição, evidenciando o potencial genotóxico do metaloide. Ressaltando que as concentrações testadas foram baseadas na legislação, este trabalho demonstra importantes alterações com baixas concentrações e em curtos períodos, pouco demonstradas em estudos anteriores. O uso da cultura de células ZFL mostrou-se satisfatório sendo considerado um bom modelo biológico para estudos de efeitos toxicológicos do As, incluindo sensibilidade e capacidade de resposta, bem como redução de custo e produção de resíduos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho é parte da tese de doutorado de Kathya Assmann Modesto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Claudia Bueno dos Reis Martinez é pesquisadora do CNPq (processo 307146/2019-7).

REFERÊNCIAS

Ahmed M. K., Habibullah-Al-Mamun M., Hossain, M. A., Arif, M., Parvin, E., Akter, M.S., Khan, M.S., Islam, M.M., 2011. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*), using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*. 84,143–149 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.025>.

Akter, K.F., Owens, G., Davey, D.E., Naidu, R., 2005. Arsenic speciation and toxicity in biological systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 184, 97–149. https://doi.org/10.1007/0-387-27565-7_3.

Alarific, S., Ali, D., Alkahtani, S., Siddiqui, M.A., Ali, B. A., 2013. Arsenic trioxide-mediated oxidative stress and genotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. *Onco Targets The*, 6, 75–84. <https://doi.org/10.2147/OTT.S38227>.

Ali, D., Nagpure, N. S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B., 2008. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Chemosphere*. 71,1823–1831. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.007>.

Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalorf, B., Ferreira, L.R., Yunes, J.S., Monserrat, 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>.

Andrew, A. S., Karagas, M. R., Hamilton, J. W., 2003. Decreased DNA repair gene expression among individuals exposed to arsenic in United States drinking water. *International Journal of Cancer*. 104, 263-268. <https://doi.org/10.1002/ijc.10968>.

Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C. L., Schmieder, P. K., Serrano, J.A., Tietge, J.E., Villeneuve, D. L., 2010. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment.

Environmental Toxicology and Chemistry. 29, 730-741.
<https://doi.org/10.1002/etc.34>.

Aposhian, H.V., Aposhian, M. M., 2006. Arsenic toxicology: five questions. *Chemical Research in Toxicology*. 19, 1–15. <https://doi.org/10.1021/tx050106d>.

ATSDR, 2020. Interaction Profiles for Toxic Substances. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA., <https://wwwn.cdc.gov/TSP/substances/ToxSubstance.aspx?toxid=3>, accessed 10 August 2020.

Azevedo Costa, C.L., Chaves, I.S., Ventura-Lima, J., Ferreira, J.L.R., Ferraz, L., Carvalho, L.M., Monserrat, J.M., 2012. In vitro evaluation of co-exposure of arsenium and na organic nanomaterial (fullerene, C60) in Zebrafish hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* .155, 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.08.005>.

Bagnyukova, T.V., Luzhna, L.I., Pogribny, I.P., Lushchak, V.I., 2007. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 48, 658–665. <https://doi.org/10.1002/em.20328>.

Bashir, S., Sharma, Y., Irshad, M., Dutta Gupta, S., Dogra, T. D., 2006. Arsenic induced cell death in liver and brain of experimental rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 98,38–43. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_170.x.

Bhattacharya, A., Bhattacharya, S., 2005. Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.11.002>

Bhattacharya, S.; Bhattacharyya, A.; Roy, S., 2007. Arsenic-Induced Responses in Freshwater Teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*. 33, 463-473. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9173-2>.

Bears, H., Richards, J.G., Schulte, P.M., 2006. Arsenic exposure alters hepatic arsenic species composition and stress mediated-gene expression in the

common killifish *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology*. 77, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.12.008>.

Bundschuh, J., Armienta, M. A., Birkle, P., Bhattacharya, P., Matschullat, J., Mukherjee, A. B., 2009. Natural arsenic in groundwater of Latin America. Leiden, The Netherlands: CRC Press/Balkema Publisher. 3–15.

Bundschuh, J., Litter, M.I., Parvez, F.; Román-Ross, G.; Nicolli, H.B., Jean, J.S.; Liu, C. W., López, D., Armienta, M. A., Guilherme, L.R.G., Cuevas, A. G., Cornejo, L., Cumbal, L., Toujaguez, R., 2012. One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries. *Science of the Total Environment*. 429, 2-35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.024>.

Capillo, G., Silvestro, S., Sanfilippo, M., Fiorino, E., Giangrosso, G., Ferrantelli, V, Vazzana, I., Faggio, C., 2018. Assessment of Electrolytes and Metals Profile of the Faro Lake (Capo Peloro Lagoon, Sicily, Italy) and Its Impact on *Mytilus galloprovincialis*. *Chemistry & Biodiversity*. 15, e1800044. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800044>.

Cavalcante, D.G.S.M., da Silva, N.D.G., Marcarini, J.C., Mantovani, M.S., Marin-Morales, M.A., Martinez, C.B.R. ,2014. Cytotoxic, biochemical and genotoxic effects of biodiesel produced by different routes on ZFL cell line. *Toxicology in Vitro*. 28, 1117–1125. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.05.008>.

Chang, K.N., Lee, T.C., Tam, M.F., Chen, Y.C., Lee, L.W, Lee, S.Y., Lin, P.J., Huang, R.N., 2003. Identification of galectin I and thioredoxin peroxidase II as two arsenic-binding proteins in Chinese hamster ovary cells. *Biochemical Journal*. 15, 371(Pt 2):495-503. <https://doi.org/10.1042/BJ20021354>.

Chen, Y.Y., Chan, K.M., 2018. Transcriptional inhibition of TCDD-mediated induction of cytochrome P450 1A1 and alteration of protein expression in a zebrafish hepatic cell line following the administration of TCDD and Cd²⁺. *Toxicology Letters*. 282, 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.10.017>.

Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Štětina, R., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 23, 143–151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>.

Costa, S. R., Velasques, R. R., Hoff, M. L. M, Souza, M. M., Sandrini, J. Z., 2019. Characterization of different DNA repair pathways in hepatic cells of Zebrafish (*Danio rerio*). *DNA Repair*. 83, 102695. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102695>.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução N° 357 de 17 de março de 2005. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>.

Cui, D., Zhang, P., Lia, H., Zhanga, Z., Luo W., Yanga, Z., 2020. Biotransformation of dietary inorganic arsenic in a freshwater fish *Carassius auratus* and the unique association between arsenic dimethylation and oxidative damage. *Journal of Hazardous Materials*. 391, 122-153. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122153>.

da Silva, N. D.G., Carneiro, C. E. A. , Campos, E. V. R., de Oliveira, J. L., Risso, W. E., Fraceto, L. F., Zaia, D. A. M. , Martinez, C. B. R., 2020. Interference of goethite in the effects of glyphosate and Roundup® on ZFL cell line. *Toxicology In Vitro*. Jun;65,104755. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104755>.

Das, S., Unni, B., Bhattacharjee, M., Wann, S.B., Rao, P.G., 2012. Toxicological effects of arsenic exposure in a freshwater teleost fish *Channa punctatus*. *African Journal of Biotechnology*. 11, 4447–4454. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2808>.

Dash, M., Maity, M, Dey, A., Perveen, H., Khatun, S., Jana, L., Chattopadhyay, S., 2018. The consequences of NAC on sodium arsenite induced uterine oxidative stress. *Toxicology Reports*. 5, 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.02.003>.

Datta, S., Saha, D. R., Ghosh, D., Majumdar, T., Bhattacharya, S., Mazumder, S., 2007. Sublethal concentration of arsenic interferes with the proliferation of hepatocytes and induces invivo apoptosis in *Clarius batrachus*. *Comparative*

Biochemistry and Physiology. 145, 339–349.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.01.005>.

Dulout, F. N., Grillo, C.A., Seoane, A.I., Madern, C.R., Nilsson, R., Vahter, M., Darroudi, F., Natarajan, A.T., 1996. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. *Mutation Research*. 370, 151-158. [https://doi.org/10.1016/s0165-1218\(96\)00060-2](https://doi.org/10.1016/s0165-1218(96)00060-2).

Eide, M., Rusten, M., Male, R., Jensen, K.H., Goksøyr, A., 2014. A characterization of the ZFL cell line and primary hepatocytes as in vitro liver cell models for the zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. 147, 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.023>.

Fan, C.S., Tseng, S.-C., Li, K.-C., Hou, C.-H., 2016. Electro-removal of arsenic (III) and arsenic (V) from aqueous solutions by capacitive deionization. *Journal Hazard Mater*. 312, 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.055>.

Fariás, S., Bianco de Salas, G., Servant, R. E., Mitre, B. G., Escalante, J., Ponce, R. I. Survey of arsenic in drinking water and assessment of the intake of arsenic from water in Argentine Pune. In: Bundschuh, J., Bhattacharya, P., editors. *Natural arsenic in ground water, 1. Arsenic in the environment*; 2008. Chaper 41.

Fattorini, D., Regoli, F., 2004. Arsenic speciation in tissues of the Mediterranean polychaete *Sabella spalanzanii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23, 1881–1887. <https://doi.org/10.1897/03-562>.

Fu, D., Calvo, J.A., Samson, L.D., 2012. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Reviews Cancer*. 12(2), 104-120. <https://doi.org/10.1038/nrc3185>.

Gajski, G., Gerić, M., Žegura, B., Novak, M., Nunić, J., Bajrektarević, D., Garaj-Vrhovac, V., Filipič, M., 2016. Genotoxic potential of selected cytostatic drugs in human and zebrafish cells. *Environmental Science and Pollution Research*. 23, 14739–14750. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4592-6>.

Gernhofer, M., Pawert, M., Schramm, M., Muller, E., Tribskorn, R., 2001. Ultra structural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in

contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 8, 241–260. <https://doi.org/10.1023/A:1012958804442>.

Ghosh, D., Datta, S., Bhattacharya, S., Mazumder, S., 2007. Long-term exposure to arsenic affects head kidney and impairs humoral immune responses of *Clarias batrachus*. *Aquatic Toxicology*. 81, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.004>.

Goessler W, Kuehnelt D., 2002. Analytical methods for the determination of arsenic and arsenic compounds in the environment. In: Frankenberger Jr WTT, editor. *Environmental chemistry of arsenic*. New York, USA: Marcel Dekker; p. 27–50.

Gonsebatt, M. E., Vega, L., Salazar, A.M., Montero, R., Guzmán, P., Blas, J., Del Razo, L.M., García-Vargas, G., Albores, A., Cebrián, M.E., Kelsh, M., Ostrosky-Wegman, P., 1997. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutation Research*. 386, 219–228. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(97\)00009-4](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(97)00009-4).

Goulart, T.L.S., Boyle, R.T., Souza, M.M., 2015. Cytotoxicity of the association of pesticides roundup Transorb® and Furadan 350SC® on the zebrafish cell line, ZF-L. *Toxicology in Vitro*. 29, 1377–1384. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.007>.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press, 963 pp. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.

Hei, T.K., Filipic, M., 2004. Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radical Biology and Medicine*. 37, 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.003>.

Hong, S., Choi, S.D., Khim, J.S., 2018. Arsenic speciation in environmental multimedia samples from the Youngsan River Estuary, Korea: a comparison between freshwater and saltwater. *Environmental Pollution*. 237, 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.020>.

Hossain, M.B., Vahter, M., Concha, G., Broberg, K., 2012. Environmental arsenic exposure and DNA methylation of the tumor suppressor gene p16 and the DNA

repair gene MLH1: effect of arsenic metabolism and genotype. *Metallomics*. 4, 1167-1175. <https://doi.org/10.1039/c2mt20120h>.

Janicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R., Porter, A.G., 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 273, 9357–9360. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9357>.

Jenkins, G.J., Doak, S.H., Johnson, G.E., Quick, E., Waters, E.M, Parry, J.M., 2005. Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? *Mutagenesis*. 20(6), 389-398. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei054>.

Jha, D.,K, Sayrav, K., Mishra, G.P, Mishra, B.B., Kumari, A., Kumar, A., Khan, P.K., 2019. Risk assessment of low arsenic exposure using biomarkers of oxidative and genotoxic stress in a piscine model. *Ecotoxicology*. 6, 669-679. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02060-y>.

Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., Rhodes, C.J., Valko, M., 2011. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology*. 31, 95-107. <https://doi.org/10.1002/jat.1649>.

Kelsey, K.T., Hirao, T., Hirao, S., Devi-Ashok, T., Nelson, H.H., Andrew, A., Colt, J., Baris, D., Morris, J.S., Schned, A., Karagas, M., 2005. TP53 alterations and patterns of carcinogen exposure in a U.S. population-based study of bladder cancer. *International Journal of Cancer*. 117, 370–375. <https://doi.org/10.1002/ijc.21195>.

Kesari, V.P., Kumar, A., Khan, P.K., 2012. Genotoxic potential of arsenic at its reference dose. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 80, 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.018>.

Kian, M. M., Haghi, A., Salami, M., Chahardouli, B., Rostami, S., Malekzadeh, K., Kamranzadeh, H. Foumani, M.D., Mohammadi, S., Nikbakht, M., 2020. Arsenic Trioxide and Thalidomide Combination Induces Autophagy Along with Apoptosis in Acute Myeloid Cell Lines. *Cell Journal*. Vol 22, No 2, July-September. <https://doi.org/10.22074/cellj.2020.6469>.

Kitchin, K.T., Conolly, R., 2010. Arsenic-induced carcinogenesis-oxidative stress as a possible mode of action and future research needs for more biologically based risk assessment. *Chemical Research in Toxicology*. 23, 327–335. <https://doi.org/10.1021/tx900343d>.

Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 44, 239-67. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851>.

Klein, C.B., Leszczynska, J., Hickey, C., Rossman, T.G., 2007. Further evidence against a direct genotoxic mode of action for arsenic-induced cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 222, 289-297. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.12.033>.

Kumar, M., Lalit, M., Thakur, R., 2016. Natural antioxidants against arsenic induced genotoxicity. *Biological Trace Element Research*. 170, 84–93. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0448-7>.

Kumar, N., Guptab, S. K., Bhushanc, S., Singha, N. P., 2019. Impacts of acute toxicity of arsenic (III) alone and with high temperature on stress biomarkers, immunological status and cellular metabolism in fish. *Aquatic Toxicology*. 214, 105233. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105233>.

Lachner, D., Oliveira, L.F., Martinez, C.B.R., 2015. Effects of the water soluble fraction of gasoline on ZFL cell line: cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress. *Toxicology In Vitro*. 30, 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.008>.

Lantz, R.C., Hays, A.M., 2006. Role of oxidative stress in arsenic-induced toxicity. *Drug Metabolism Reviews*. 38, 791–804. <https://doi.org/10.1080/03602530600980108>.

Lavanya, S., Ramesh, M., Kavitha, C., Malarvizhi, A., 2011. Hematological, biochemical and ionoregulatory responses of Indian major carp *Catla catla* during chronic sublethal exposure to inorganic arsenic. *Chemosphere*. 82, 977-985. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.071>.

Lin, S., Del Razo, L.M., Styblo, M., Wang, C., Cullen, W.R., Thomas, D.J., 2001. Arsenicals inhibit thioredoxin reductase in cultured rat hepatocytes. *Chemical Research in Toxicology*. 14, 305–311. <https://doi.org/10.1021/tx0001878>.

Lips, J., Kaina, B., 2001. Repair of O (6)-methylguanine is not affected by thymine base pairing and the presence of MMR proteins. *Mutation Research*. 487(1-2), 59-66. [https://doi.org/10.1016/s0921-8777\(01\)00105-7](https://doi.org/10.1016/s0921-8777(01)00105-7).

Liu, S.X., Athar, M., Lippai, I., Waldren, C., Hei, T.K., 2001. Induction of oxyradicals by arsenic; implication for mechanism of genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 98, 1643–1648. <https://doi.org/10.1073/pnas.031482998>.

Liu, C.; Zhang, A., 2020. ROS-mediated PERK-eIF2 α -ATF4 pathway plays an important role in arsenite-induced L-02 cells apoptosis via regulating CHOP DR5 signaling. *Environmental Toxicology*. 35, 1100–1113. <https://doi.org/10.1002/tox.22946>.

Lopes, F.M., Sandrini, J.Z., Souza, M.M., 2018. Toxicity induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in the zebrafish hepatocyte cell line (ZF-L). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 162, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.005>.

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 101, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.

Mandal, P., 2017. Molecular insight of arsenic-induced carcinogenesis and its prevention. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 390, 443–455. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1351-x>.

Mäki-Paakkanen, J., Kurttio, P., Paldy, A., Pekkanen, J., 1998. Association between the clastogenic effect in peripheral lymphocytes and human exposure to arsenic through drinking water. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32, 301–313. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(1998\)32:4<301:aidem3>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(1998)32:4<301:aidem3>3.0.co;2-i).

Mahata, J., Basu, A., Ghoshal, S., Sarka, J.N., Roy, A.K., Poddar, G., Nandy, A.K., Banerjee, A., Ray, K., Natarajan, A.T., Nilsson, R., Giri, A.K., 2003. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutation Research*, 534, 133-143. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00255-3](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00255-3).

Martinez, V.D, Vucic, E.A., Adonis, M., Gil, L., Lam, W.L., 2011. Arsenic biotransformation as a cancer promoting factor by inducing DNA damage and disruption of repair mechanisms. *Molecular Biology International*. <https://doi.org/10.4061/2011/718974>.

Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J., 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and non-resistant plant species. *New Phytologist*. 154, 29–43. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00363.x>.

Morozesk, M., Franqui, L.S., Mansano, A.S., Martinez, D.S.T., Fernandes, M.N., 2018. Interactions of oxidized multiwalled carbon nanotube with cadmium on zebrafish cell line: the influence of two co-exposure protocols on in vitro toxicity tests. *Aquatic Toxicology*. 200, 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.05.002>.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Journal of Immunological Methods*. 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Nesnow, S., Roop, B.C., Lambert, G., Kadiiska, M., Mason, R.P., Cullen, W.R., Mass, M.J., 2002. DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chemical Research in Toxicology*. 15, 1627–1634. <https://doi.org/10.1021/tx025598y>

Novak, M., Žegura, B., Modic, B., Heath, E., Filipič, M., 2017. Cytotoxicity and genotoxicity of anticancer drug residues and their mixtures in experimental model with zebrafish liver cells. *Science of the Total Environment*. 601-602, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.115>.

Painefilú, J. C., Pascuala, M. M., Bieczynskib, F., Laspoumaderesc, C., González, C., Villanueva, S. F. M., Luqueta, C. M., 2019. Ex vivo and in vivo

effects of arsenite on GST and ABCC2 activity and expression in the middle intestine of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 225, 108566. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108566>.

Pei, Q., Ma, N., Zhang, J., Xu, W., Li, Y., Ma, Z., Li, Y., Tian, F., Zhang, W., Mu, J., Li, Y., Wang, D., Liu, H., Yang, M., Ma, C., Yun, F., 2013. Oxidative DNA damage of peripheral blood polymorphonuclear leukocytes, selectively induced by chronic arsenic exposure is associated with extent of arsenic-related skin lesions. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 266, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.10.031>.

Pi, J., Qu, W., Reece, J.M., Kumagai, Y., Waalkes, M.P., 2003. Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. *Experimental Cell Research*. 290, 234–245. [https://doi.org/10.1016/s0014-4827\(03\)00341-0](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(03)00341-0).

Ramirez, O. A. B.; Garcia, F.P., 2005. Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo. Mexico *Mutagenesis*. 20, 291–295. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei039>.

Rocha, C.H.B., Azevedo, L.P., 2015. Avaliação da presença de metais pesados nas águas superficiais da Bacia do Córrego São Mateus, Juiz de Fora (MG). *Revista Espinhaço*, 4, 33-44.

Ruiz-Ramos, R., Lopez-Carrillo, L., Rios-Perez, A.D, Vizcaya-Ruiz, A.D., Cebrian, M.E., 2009. Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF-Kb activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. *Mutation Research*. 674, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.021>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.02.016>.

Schuliga, M., Chouchane, S., Snow, E.T., 2002. Upregulation of glutathione-related genes and enzyme activities in cultured human cells by sublethal concentration of inorganic arsenic. *Toxicological Sciences*. 70,183–192. [https://doi.org/ 10.1093/toxsci/70.2.183](https://doi.org/10.1093/toxsci/70.2.183).

Seok, S-H., Baek, M-W., Lee, H-Y., Kim, D-J., Na, Y-R., Noh, K-J., Park, S-H., Lee, H-K., Lee, B-H., Ryu, D-Y., Park, J-H., 2007. Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. *Toxicology In Vitro*. 21, 870–877. [https://doi.org/ 10.1016/j.tiv.2007.02.011](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.02.011).

Shila, S., Kathirvel, R., Jayavelu, T., Chinnakkannu, P., 2005. Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL-lipoic acid. *Toxicology Letters*, 155, 27–34. [https://doi.org/ 10.1016/j.toxlet.2004.08.001](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.08.001).

Silva, N.D.G, Carneiro, C.E.A., Campos, E.V.R., Oliveira, J.L., Risso, W.E., Fraceto, L.F., Zaia, D.A.M., Martinez, C.B.R., 2020. Interference of goethite in the effects of glyphosate and Roundup® on ZFL cell line. *Toxicology In Vitro*. 65, 104755. [https://doi.org/ 10.1016/j.tiv.2019.104755](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104755).

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. [https://doi.org/ 10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).

Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2015. Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 112, 247-270. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.009>.

Singh, M., Khan, H., Verma, Y., Rana, S.V.S., 2019. Distinctive fingerprints of genotoxicity induced by As, Cr, Cd, and Ni in a freshwater fish. *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 19445-19452. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05274-z>.

Suhendrayatna, A., Ohki, A., Nakajima, T., Maeda, S., 2002. Studies on the accumulation and transformation of arsenic in freshwater organisms II. Accumulation and transformation of arsenic compounds by *Tilapia Mossambica*. *Chemosphere*. 46, 325–331. [https://doi.org/ 10.1016/s0045-6535\(01\)00085-6](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(01)00085-6)

Sun, H.-J., Ping, X., Ming-Hu, T., Li, S., Ma, L.Q., 2016. Arsenic impacted the development, thyroid hormone and gene transcription of thyroid hormone receptors in bighead carp larvae (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Journal of Hazardous Materials*. 303, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.032>.

Sun, H-J, Zhang, J.Y., Wang Q., Zhu E., Chen W., Lin H., Chen J., Hong H., 2019. Environmentally relevant concentrations of arsenite induces developmental toxicity and oxidative responses in the early life stage of zebrafish. *Environmental Pollution*. 254, 113022. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113022>.

Tang, S., Allagadda, V., Chibli, H., Nadeau, J.L., Mayer, G.D., 2013. Comparison of cytotoxicity and expression of metal regulatory genes in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells exposed to cadmium sulfate, zinc sulfate and quantum dots. *Metallomics*. 5, 1411–1422. <https://doi.org/10.1039/c3mt20234h>.

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(3), 206-221. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j).

Thit, A., Skjolding, L.M., Selck, H., Sturve, J., 2017. Effects of copper oxide nanoparticles and copper ions to zebrafish (*Danio rerio*) cells, embryos and fry. *Toxicology In Vitro*. 45, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.08.010>.

Thomas, D.J., 2007. Molecular process in cellular arsenic metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 222, 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.02.007>.

Ventura-Lima, J., Fattorini, D., Regoli, F., Monserrat, J.M., 2009a. Effects of diferente inorganic arsenic species in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) tissues after short-time exposure: bioaccumulation, biotransformation and biological responses. *Environmental Pollution*. 157, 3479–3484. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.06.023>

Ventura-Lima, J, Castro, M.R., Acosta, D., Fattorini, D., Regoli, F., Carvalho, L.M., ohrer, D., Geracitano, L.A., Barros, D.M., Silva, R.S., Bonan, C.D., Bogo,

M.R., Monserrat, J.M., 2009b. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 149C, 538–543. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.12.003>.

Wan, G., Cheuk, W.K., Chan, K.M., 2009. Differential regulation of zebrafish metallothionein-II (zMT-II) gene transcription in ZFL and SJD cell lines by metal ions. *Aquatic Toxicology*. 91, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.10.004>.

Wang TS, Shu YF, Liu YC, Jan KY, Huang H., 1997. Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenic. *Toxicology*. 121, 229–237. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(97\)00071-1](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(97)00071-1).

Wang, Y.C., Chaung, R.H., Tung, L.C., 2004. Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines. *Aquatic Toxicology*. 69, 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.007>.

WHO (2018), Exposure to Arsenic: a Major Public Health Concern Geneva, Available: WHO Press, <http://www.who.int/ipcs/assessment/publichealth/arsenic/en/>.

Winston, G.W., Regoli, F., Dugas Jr, A.J., Fong, J.H., Blanchard, K.A., 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*. 24, 480–493. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(97\)00277-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00277-3).

Wood, C.M., 2011. 1 - an introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Fish Physiology* 31. Academic Press, pp. 1–51.

Worth, A., Viegas Barroso, J. F., Bremer, S., Burton, J., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Desprez, B., Dumont, C., Gouliarmou, V., Goumenou, M. P., Graepel, R., Griesinger, C., Halder, M. E., Janusch, A., Kienzler, A., Madia, F., Munn, S., Nepelska, M., Paini, A., Price, A., Prieto Peraita, M. P., Rolaki, A., Schaeffer, M. W., Triebe, J., Whelan, M., Wittwehr, C., Zuang V., 2014. Alternative methods for regulatory toxicology – a state-of-the-art review. Science and Policy Report by the Joint Research Centre. <https://doi.org/10.2788/11111>

Xie, H., Huang, S., Martin, S., Wise, J. P., 2014. Arsenic is cytotoxic and genotoxic to primary human lung cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 760, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.11.001>.

Xu, Y., Wang, H., Wang, Y., Zheng, Y., Sun, G., 2010. Effects of folate on arsenic toxicity in Chang human hepatocytes: Involvement of folate antioxidant properties. *Toxicology Letters*. 195, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.02.015>.

Yadav, K. K., Trivedi, S. P., 2009. Sub-lethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. *Chemosphere*. 77:1495–1500. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.022>.

Žegura B, Filipič M., 2019. The application of the Comet assay in fish cell lines. *Mutation Research*. 842, 72-84. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.01.011>.

Zhao, X., Yang, S., Zhang, D., Li, Z., Huang, C., 2018. Arsenic Trioxide and Artemisinin Act Synergistically to Kill Tumor Cells In Vitro. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 18, 2178-2186. <https://doi.org/10.2174/1871520618666180903102630>.

Zhu, J. Y., Chan, K. M., 2012. Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity on the ZFL zebrafish liver cell line. *Metallomics*. 4, 1064–1076. <https://doi.org/10.1039/c2mt20134h>.

Zeng, F., Sherry, J. P., Bols, N. C., 2016. Use of the rainbow trout cell lines, RTgill-W1 and RTL-W1 to evaluate the toxic potential of benzotriazoles, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 124, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.003>.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação de corpos de água pelo arsênio (As) é um problema global. Diferentes regiões no globo descrevem altas concentrações deste composto oriundo de diversas atividades, já que o As é amplamente utilizado pela indústria, sendo liberado ao meio ambiente pelos efluentes industriais, atividades de mineração, entre outros. Milhões de pessoas no mundo todo ingerem água com altas concentrações deste metaloide diariamente, além de uma grande quantidade de animais vivendo nessas águas contaminadas pelo mesmo. Assim, é de grande importância o conhecimento dos efeitos deste composto nas diferentes espécies com o objetivo de aprimorar a legislação e adequar políticas públicas, visando a preservação da vida dos diferentes organismos. Nesta perspectiva, neste trabalho foram avaliados os efeitos do As para peixe, com experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando-se as concentrações previstas na legislação brasileira (Resolução CONAMA/ 357). Nela, os limites estabelecidos para o As são de 0,14 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para águas onde há cultivo de peixes ou pesca e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para água classe II, ou seja, água destinada ao consumo humano. Outras concentrações foram escolhidas baseadas em estudos sobre a ocorrência de As em corpos de água, realizados no Brasil.

Baseado neste objetivo, o presente trabalho utilizou dois modelos biológicos diferentes para verificar as respostas a exposição ao As. Quando a exposição é feita em cultura de células, é possível identificar uma resposta mais direta do contaminante, o que facilita o entendimento dos mecanismos de toxicidade. Já nas exposições feitas com animais, as respostas podem ser diferentes das encontradas *in vitro*, já que ocorre a interação dos diferentes sistemas do indivíduo, demonstrando o que é observado nas populações. Este trabalho gerou dois manuscritos (Capítulo II e III) a serem submetidos à avaliação e possível publicação em revistas científicas. As discussões referentes a cada um dos manuscritos já foram abordadas individualmente, porém este capítulo versará sobre a comparação entre as vias de exposição e a sensibilidade dos modelos biológicos, além de conclusões gerais da tese referentes aos objetivos e hipóteses levantadas no início do trabalho.

Um dos objetivos era verificar a validade protetiva da legislação brasileira em relação ao As para os organismos. Neste contexto, a menor concentração testada (0,10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) produziu aumento de danos no DNA na linhagem celular ZFL já em 3 h, demonstrando que essa concentração foi genotóxica para ZFL.

Considerando a concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, a qual é estabelecida como limite mundial para o As na água, os efeitos foram mais evidentes. Para *P. lineatus*, a exposição ao As em 96 h levou à diminuição do número de eritrócitos, diminuição da hemoglobina corpuscular média, alterou as concentrações plasmáticas de Na^+ e K^+ , estimulou as enzimas antioxidantes primárias (CAT, SOD e GPx), reduziu a atividade da GST e mostrou ação anticolinesterásica no cérebro. Já para a linhagem celular ZFL, essa concentração estimulou o aumento da capacidade antioxidante total em 6 h, embora também tenha aumentado os danos ao DNA. As maiores concentrações testadas nos dois modelos ($1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ para *P. lineatus* e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ para linhagem celular ZFL) produziram respostas semelhantes às observadas na concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ no mesmo período de exposição para cada modelo.

Considerando os resultados apresentados nos dois manuscritos, percebe-se que a exposição ao As estimulou as defesas antioxidantes nos dois modelos, comprovando uma das hipóteses anteriormente levantada, de que o mecanismo de toxicidade do As está relacionado à geração de ERO. Nestes experimentos, aparentemente o estímulo das vias antioxidantes foi suficiente para neutralizar as ERO, impedindo o estresse oxidativo. Vale ressaltar que as concentrações testadas são baixas e os períodos de exposição foram bem curtos, em ambos os testes, características pouco vistas nos trabalhos anteriores, em que geralmente os animais são expostos a concentrações bem maiores e também por períodos de tempo maiores. Mesmo assim, importantes respostas foram demonstradas, evidenciando que o As aumenta a geração de ERO e é genotóxico para a linhagem celular ZFL.

No mesmo sentido, os resultados apresentados aqui demonstram que a concentração permitida na resolução CONAMA/ 357 de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ não é segura para *P. lineatus* e para a linhagem celular ZFL, já que importantes alterações foram observadas nestes experimentos em curtos períodos de exposição.

Ainda respondendo as hipóteses, embora a literatura descreva que a peroxidação de lipídeos seja um importante biomarcador para os efeitos da exposição ao As, neste trabalho não foi observado esta resposta. Para exposições agudas a concentrações baixas, a ativação das enzimas antioxidantes primárias aparentemente foi suficiente para evitar a ocorrência de danos oxidativos.

Por fim, este trabalho contribuiu para o conhecimento dos efeitos do As para uma espécie neotropical e uma linhagem celular, mostrando a importância de estudos com diferentes modelos e abordagens experimentais (*in vivo* e *in vitro*), evidenciando as diferentes respostas que foram demonstradas aqui quando comparada aos dados existentes na literatura.