



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANGÉLICA ALVES DE PAULA

**AS VIAS DE EXPOSIÇÃO E A BIOLOGIA DAS ESPÉCIES
PODEM INTERFERIR NA TOXICIDADE DOS METAIS?
EFEITOS DO COBRE EM TRÊS TELEÓSTEOS
NEOTROPICAIS**

Londrina
2020

ANGÉLICA ALVES DE PAULA

**AS VIAS DE EXPOSIÇÃO E A BIOLOGIA DAS ESPÉCIES
PODEM INTERFERIR NA TOXICIDADE DOS METAIS?
EFEITOS DO COBRE EM TRÊS TELEÓSTEOS
NEOTROPICAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitat Fragmentados).

Orientadora: Prof. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez.

Londrina
2020

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

de Paula, Angélica Alves.

As vias de exposição e a biologia das espécies podem interferir na toxicidade dos metais? Efeitos do cobre em três teleósteos Neotropicais / Angélica Alves de Paula. - Londrina, 2020.
133 f. : il.

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, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Ecotoxicologia - Tese. 2. Osmorregulação - Tese. 3. Estresse Oxidativo - Tese. 4. Bioacumulação - 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

ANGÉLICA ALVES DE PAULA

**AS VIAS DE EXPOSIÇÃO E A BIOLOGIA DAS ESPÉCIES
PODEM INTERFERIR NA TOXICIDADE DOS METAIS?
EFEITOS DO COBRE EM TRÊS TELEÓSTEOS
NEOTROPICAIS**

Defesa de curso de Doutorado em associação Ampla
UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título
de Doutor – Área de Concentração Físico-Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Bueno dos Reis
Martinez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Rafael Mendonça Duarte
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho - UNESP

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

Prof^ª. Dr^ª. Mariana Machado Lauer
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof^ª. Dr^ª. Juliana Delatim Simonato Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar meus passos e me ajudar a superar todos os obstáculos. Pela família e pelos amigos que ele colocou no meu caminho, pela saúde e pela vida.

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

A CAPES e a Fundação Araucária pela concessão da bolsa e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Agradeço à Prof. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez por ter me aberto as portas do LEFA e por esses 4 maravilhosos anos de convivência. Você resgatou em mim o amor que eu sentia pela vida acadêmica e que ficou “abafado” durante um tempo. Minha admiração por você é enorme! Você é uma profissional extremamente competente e uma pessoa maravilhosa, muito humana e compreensiva com seus alunos. Sua inteligência, sabedoria e humildade são admiráveis. Muito obrigada por todas as oportunidades concedidas e por ter me feito melhorar como pessoa e profissional. Muito obrigada pela compreensão, preocupação, dedicação e amizade ao longo dessa caminhada, principalmente nos momentos de estresse emocional. A jornada no LEFA foi maravilhosa e foi um prazer enorme compartilhar um tempo da minha vida com você prof! MUITÍSSIMO obrigada!

Agradeço aos membros da banca examinadora, prof. Dra. Helena Cristina da Silva Assis, prof. Dr. Rafael Mendonça Duarte, prof. Dra. Mariana Machado Lauer e prof. Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha pela disponibilidade em colaborar com o nosso trabalho.

A Estação de Piscicultura da UEL pelo fornecimento dos animais e ao “Seu Jurandir” pelo auxílio na coleta dos peixes. Agradeço ao piscicultor Nelson e especialmente ao piscicultor Valmor por fornecer os peixes, pela manutenção e cuidado com as traíras e por todo o auxílio.

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 prof. Dra. Mariana Machado Lauer, Luciana Fernandes de Oliveira e Juliana Delatim Simonato Rocha pelas contribuições ao trabalho no exame de qualificação.

A todos os colegas e amigos do LEFA com quem aprendi e convivi nesses 4 anos.

Agradeço especialmente a velha guarda do LEFA: Luciana, Thais e Carlos por todos os ensinamentos e amizade. Especialmente ao Carlos pela ajuda na idealização do projeto.

À Carol, por todos os ensinamentos, companheirismo, amizade e parceria e, é claro, por todas as comidas maravilhosas e aconchegantes! Você é incrível!

À Hellen pelas parcerias no laboratório e fora do laboratório! Pelas corridas para descontrair a cabeça (ou tentativas de corrida), pela amizade e pelo carinho! A sua companhia na reta final dessa caminhada foi muito importante para mim! Muito obrigada amiga!

À Jéssica pela ajuda imensurável. Por todos os finais de semana que você passou comigo na UEL montando experimentos, por todo apoio, compreensão, por todo carinho (especialmente aqueles da garrafa de café ou dos brigadeiros nos momentos difíceis), por todo companheirismo e pela sua amizade que é muito preciosa para mim! Obrigada amiga! Você foi fundamental no meu doutorado!

Ao Tiago, pela parceria, pela companhia (muitas vezes até muito tarde no laboratório), pelas boas risadas, por toda a ajuda (nos experimentos, no laboratório, e nos momentos de desespero) por me escutar sempre e pela amizade verdadeira! Você é como um irmão mais novo para mim amigo e sua amizade significa muito! Os dias no laboratório são mais divertidos com a sua presença. Muito obrigada por tudo!

À Millena, por todos os ensinamentos nas análises fisiológicas, por toda ajuda no laboratório, principalmente nessa reta final, pelas discussões de ideias, pelos conselhos, pela paciência, pela parceria e pela amizade! Muito obrigada!

Aos alunos de Iniciação Científica Júnior: Laura, Gabi e Heitor pela ajuda e convivência.

Às alunas de Iniciação Científica: Duda e Milena, por toda ajuda, convivência e aprendizado.

Às amigas da graduação que permaneceram: Fábio, Lilian, Paula e Nay por toda preocupação, aconselhamento e amizade! Amo vocês!

Ao meu marido, Lucas, que é parte da minha felicidade diária. Muito obrigada por toda preocupação, amor, carinho e amizade. Meus dias são mais leves por sua causa e eu agradeço a Deus por ter você na minha vida. Te amo!

Aos meus pais e ao meu irmão que são tudo para mim! Obrigada por todo apoio preocupação, compreensão, pelos conselhos e por todo amor e carinho que vocês me dão. Me sinto muito abençoada por ter vocês como minha família! Amo vocês!

À minha cunhada Viviane, pela amizade e por ter me apresentado a própolis, a qual foi essencial para o desenvolvimento dessa tese! Obrigada Vi!

À minha avó aparecida por sempre torcer por mim e pelo enorme carinho e amor.

À Bambina pelo companheirismo e amor. Nunca esquecerei seu olhar afetuoso antes de partir.

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.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

PAULA, Angélica Alves de. **As vias de exposição e a biologia das espécies podem interferir na toxicidade dos metais? Efeitos do cobre em três teleósteos Neotropicais.** 2020. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O cobre é um metal essencial que em concentrações acima das requeridas pelos organismos pode se tornar tóxico. Os efeitos deste metal na água foram e são amplamente avaliados pela ecotoxicologia em peixes de água doce, principalmente em espécies das regiões temperadas. No entanto, no que diz respeito a contaminação pela dieta, há muito ainda a ser explorado. Além disso, estudar a toxicidade do cobre e seus efeitos em espécies Neotropicais se faz necessário, uma vez que os estudos com peixes dessa região são mais escassos. Assim, o objetivo geral deste trabalho é avaliar os efeitos da exposição aguda (96 h) ao cobre em três espécies de peixes Neotropicais, por meio de diversos biomarcadores e da análise de bioacumulação e verificar os efeitos deste metal sobre a perspectiva de diferentes vias de exposição em uma espécie carnívora. Para avaliar os efeitos do metal na água, em espécies Neotropicais, *Astyanax altiparanae*, *Hoplias malabaricus* e *Geophagus brasiliensis* foram expostas as concentrações de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Para cada espécie, um grupo foi mantido em água desclorada e constituiu o grupo controle (CTR). Decorrido 96 h, os animais foram anestesiados em benzocaína e o sangue foi retirado pela veia caudal. Após, os peixes foram mortos por secção medular para retirada dos tecidos (brânquias, trato gastrointestinal, fígado, rim, músculo e cérebro). Os órgãos foram armazenados (-72°C) e processados para análises de parâmetros fisiológicos e bioquímicos. Das três espécies avaliadas *A. altiparanae* foi a mais sensível ao cobre. Essa espécie demonstrou desequilíbrio iônico (Na^{+} e Cl^{-}), danos em biomoléculas (lipoperoxidação e danos no DNA) e até mesmo morte de 25% dos peixes no grupo Cu 20. *G. brasiliensis* parece ter sido a espécie menos sensível, uma vez que não apresentou redução nas concentrações iônicas plasmáticas e tampouco estresse oxidativo. *H. malabaricus* foi a única espécie em que o cobre não acumulou em nenhum tecido. Assim, essa espécie não apresentou danos oxidativos, porém uma hipocalcemia concentração dependente foi observada. Uma vez que a toxicidade do cobre via água foi verificada para *H. malabaricus*, essa espécie foi submetida a exposição pela via trófica para investigar a importância da via de exposição na toxicidade do cobre. Um grupo de 10 animais recebeu, a cada 96 h, *A. altiparanae* previamente exposta (96 h) a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre e constituiu o grupo EXP. Outro grupo recebeu *A. altiparanae* mantidos apenas em água desclorada e consistiu no grupo CTR. Após um período de 40 dias (10 alimentações) os animais foram amostrados, conforme descrito anteriormente, para retirada dos tecidos. Parâmetros fisiológicos e de estresse oxidativo foram avaliados. Os animais do grupo EXP apresentaram não só distúrbios iônicos, como na exposição via água, mas acúmulo de cobre no sangue, anemia e indícios de estresse oxidativo. Dessa forma, foi demonstrado a importância da via de exposição na toxicidade do cobre.

Palavras-chave: *Hoplias malabaricus*; *Astyanax altiparanae*; *Geophagus brasiliensis*; osmorregulação; estresse oxidativo.

PAULA, Angélica Alves de. **Do the route of exposure and biology of the species interfere in metal toxicity? Effects of copper on three Neotropical teleosts.** 2020. 133 p. Thesis (Doctorate degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Copper is an essential metal, which in concentrations higher than those required by organisms can become toxic. Waterborne effects of this metal have been widely evaluated in freshwater fish, mainly in species from temperate regions. However, regarding contamination through the diet, much remains to be explored. In addition, study of the toxicity of copper and its effects on Neotropical species is necessary, since studies with fish in this region are scarce. Thus, the aim of this work is to evaluate the effects of acute exposure to copper (96 h) in three species of Neotropical fish, through different biomarkers and bioaccumulation analysis, and to verify the effects of this metal from the perspective of different exposure pathways in a carnivorous species. To assess the effects of metal in the water, in Neotropical species, *Astyanax altiparanae*, *Hoplias malabaricus*, and *Geophagus brasiliensis*, were exposed to copper concentrations of 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10, and Cu 20). For each species, one group was kept in dechlorinated water and constituted the control group (CTR). After 96 h, the animals were anesthetized with benzocaine and blood samples were collected from the caudal vein. Subsequently, the fish were killed by medullary section and the gills, gastrointestinal tract, liver, kidney, muscle, and brain were removed. The organs were stored (-72°C) and processed for analysis of physiological and biochemical parameters. Of the three species evaluated, *A. altiparanae* was the most sensitive to copper. This species demonstrated ionic imbalance (Na^{+} and Cl^{-}), damage to biomolecules (lipoperoxidation and DNA damage), and even death in 25% of the fish in the Cu 20. *G. brasiliensis* was the least sensitive species, since it did not present oxidative stress or decreases in plasma ionic concentrations. *H. malabaricus* was the only species in which copper did not accumulate in any tissue. Thus, this species did not demonstrate oxidative damage, however, concentration-dependent hypocalcemia was observed. Since the toxicity of waterborne copper was verified for *H. malabaricus*, this species was subjected to exposure through the trophic pathway to investigate the importance of the exposure pathway in copper toxicity. Every 96 h, a group of 10 animals was fed *A. altiparanae* previously exposed (96 h) to 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ of copper, constituting the EXP group. Another group was fed *A. altiparanae* kept only in dechlorinated water, constituting the CTR group. After a period of 40 days (10 feedings) the animals were sampled as previously described. Physiological parameters and oxidative stress were evaluated. The animals in the EXP group demonstrated not only ionic disorders, like the animals after waterborne exposure, but also blood accumulation, anemia, and evidence of oxidative stress. Thus, the results demonstrated the importance of the exposure route in copper toxicity.

Key-words: *Hoplias malabaricus*; *Astyanax altiparanae*; *Geophagus brasiliensis*; osmoregulation; oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	anidrase carbônica
AChE	acetilcolinesterase
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
Ca ²⁺	cálcio
CaATP	cálcio ATPase
CaCO ₃	carbonato de cálcio
CAT	catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cl ⁻	cloreto
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CO ₂	gás carbônico
Cu	cobre
Cu ⁺	cuproso
Cu ²⁺	cúprico
DMSO	dimetilsulfóxido
DNP	dinitrofenilhidrazina
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EC	eficiência de conversão alimentar
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPUEL	Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina
ERO	espécie reativa de oxigênio
FC	fator de condição
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione reduzida
GST	glutathione S-transferase
H ⁺	próton
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HATP	próton ATPase ou bomba de próton

Hb	hemoglobina
HCO ₃ ⁻	bicarbonato
Hct	hematócrito
HNO ₃	ácido nítrico
K ⁺	potássio
KOH	hidróxido de potássio
K ₂ SO ₄	sulfato de potássio
LPO	lipoperoxidação
MDA	malondialdeído
MT	proteínas semelhantes a metalotioneínas
Na ⁺	sódio
NaCl	cloreto de sódio
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NaOH	hidróxido de sódio
NEM	N-etilmaleimida
NKA	sódio-potássio ATPase ou bomba sódio-potássio
OH·	radical hidroxil
PCO	proteínas carboniladas
RBC	número de eritrócitos
SOD	superóxido dismutase
SEID	sacarose, EDTA, imidazol, deoxicolato
-SH	grupamento sulfidrílico
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNP	tiolato
TRC	taxa de reação catalizada
TRNC	taxa de reação não catalizada
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	16
INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO	17
1.1.1. A Contaminação dos Ecossistemas Aquáticos e a Ecotoxicologia.....	17
1.1.2. A Contaminação dos Ecossistemas Aquáticos pelos Metais.....	17
1.1.3. O Cobre.....	18
1.1.4. O Cobre em Ambientes Dulcícolas e a Legislação Brasileira (CONAMA 357)	19
1.1.5. A Especificação do Cobre no Ambiente.....	19
1.1.6. A Toxicidade do Cobre em Peixes Neotropicais	20
1.1.7. Efeitos do Cobre em Peixes de Água Doce	21
1.1.8. Vias de Exposição	25
1.1.9. Modelos Biológicos.....	26
1.2. JUSTIFICATIVA	30
1.3. HIPÓTESES	31
1.4. OBJETIVOS.....	32
1.4.1. Objetivo Geral.....	32
1.4.2. Objetivos Específicos	32
1.5. REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO II	39
EFEITOS DO COBRE NOS PEIXES NEOTROPICAIS (<i>Astyanax altiparanae</i> E <i>Hoplias malabaricus</i>): UMA ABORDAGEM COMPARATIVA ENTRE PRESA E PREDADOR	40
RESUMO GRÁFICO	41
RESUMO	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1. ACLIMATAÇÃO.....	45
2.2. DESENHO EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM.....	45
2.3. ANÁLISE DO COBRE E DO Na ⁺ NA ÁGUA	46

2.4.	ANÁLISE DO COBRE EM TECIDOS	46
2.5.	BIOMARCADORES.....	46
2.5.1.	Parâmetros Fisiológicos.....	46
2.5.2.	Parâmetros Bioquímicos – Defesas Antioxidantes e Danos Oxidativos	48
2.5.3.	Proteínas Semelhantes a Metalotioneínas.....	49
2.5.4.	Genotoxicidade	50
2.5.5.	Atividade da Acetilcolinesterase.....	50
2.5.6.	Determinação de Proteínas nos Tecidos.....	51
2.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
3.	RESULTADOS	51
3.1.	COBRE E Na^+ NA ÁGUA.....	51
3.2.	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	52
3.3.	CONCENTRAÇÃO DE COBRE NOS TECIDOS	56
3.4.	DEFESAS ANTIOXIDANTES	57
3.5.	DANOS OXIDATIVOS.....	59
3.6.	ATIVIDADE DA AChE.....	59
4.	DISCUSSÃO	61
4.1.	EFEITOS NAS CONCENTRAÇÕES IÔNICAS	61
4.2.	ACÚMULO DE COBRE NOS TECIDOS.....	63
4.3.	GLICOSE PLASMÁTICA E GLICOGÊNIO MUSCULAR.....	63
4.4.	ATIVIDADE DA ENZIMA AChE.....	64
4.5.	DEFESAS ANTIOXIDANTES E DANOS.....	64
4.6.	HISTÓRIA DE VIDA DAS ESPÉCIES E A TOXICIDADE DO COBRE	65
4.4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
	AGRADECIMENTOS	67
	REFERÊNCIAS	67
	 CAPÍTULO III	 72
	EFEITOS DO COBRE EM <i>Hoplias malabaricus</i> APÓS EXPOSIÇÃO PELA VIA TRÓFICA COM DIETA VIVA: UMA ABORDAGEM DE MÚLTIPLOS BIOMARCADORES	73

	RESUMO GRÁFICO	74
	RESUMO	75
1.	INTRODUÇÃO	76
2.	MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1.	<i>Hoplias malabaricus</i>	78
2.2.	<i>Astyanax altiparanae</i> (dieta viva)	78
2.3.	Desenho Experimental.....	78
2.4.	AmostraGem	79
2.5.	Quantificação do Cobre	79
2.6.	Biomarcadores	80
2.7.	Análise Estatística	82
3.	RESULTADOS	82
3.1.	Concentração de Cobre nos Tecidos	83
3.2.	Ganho de Peso, Eficiência de Conversão e Fator de Condição	83
3.3.	Parâmetros Fisiológicos.....	84
3.4.	Defesas Antioxidantes	87
3.5.	Danos Oxidativos	88
3.6.	Atividade da AChE	89
4.	DISCUSSÃO	90
4.1.	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	90
4.2.	BIODISPONIBILIDADE DE COBRE NA PRESA.....	91
4.3.	EFEITOS RELACIONADOS AO GANHO DE PESO EM <i>H. MALABARICUS</i>	92
4.4.	EFEITOS IONORREGULATÓRIOS	92
4.5.	OUTROS EFEITOS NO SANGUE.....	94
4.6.	EFEITOS NAS BRÂNQUIAS	94
4.7.	EFEITOS NO FÍGADO	95
4.8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
	AGRADECIMENTOS	96
	REFERÊNCIAS	96
	 CAPÍTULO IV	 100
	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E DE ESTRESSE	
	OXIDATIVO NO PEIXE NEOTROPICAL <i>Geophagus</i>	

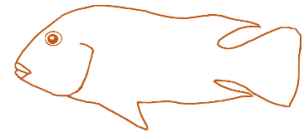
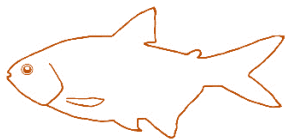
	<i>brasiliensis</i>: UMA ESPÉCIE DE ORIGEM EVOLUTIVA	
	MARINHA RECENTE	101
	RESUMO GRÁFICO	102
	RESUMO	103
1.	INTRODUÇÃO	104
2.	MATERIAL E MÉTODOS	105
2.1.	ACLIMATAÇÃO.....	105
2.2.	DESENHO EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM.....	105
2.3.	COBRE NA ÁGUA DOS AQUÁRIOS.....	106
2.4.	METAIS NOS TECIDOS DE <i>G. BRASILIENSIS</i>	106
2.5.	BIOMARCADORES.....	107
2.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	109
3.	RESULTADOS	109
3.1.	CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA ÁGUA.....	109
3.2.	ACÚMULO DE COBRE NOS TECIDOS DE <i>G. BRASILIENSIS</i>	110
3.3.	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS	111
3.4.	DEFESAS ANTIOXIDANTES E DANOS EM BIOMOLÉCULAS	115
3.5.	ACETILCOLINESTERASE.....	118
4.	DISCUSSÃO	118
4.1.	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS NAS BRÂNQUIAS E NO PLASMA.....	118
4.2.	ACÚMULO DE METAL	120
4.3.	OUTROS EFEITOS.....	121
5.	CONCLUSÃO	122
	AGRADECIMENTOS	122
	REFERÊNCIAS	122
	CAPÍTULO V	126
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
	ANEXO	133

APRESENTAÇÃO

Esta tese foi organizada de modo a atender às exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Primeiramente, é apresentada uma introdução geral (Capítulo I) que contempla a contextualização do trabalho desenvolvido, sua justificativa, hipóteses e objetivos. Na sequência, estão inseridos os três capítulos que correspondem aos manuscritos gerados por este trabalho. Assim, no Capítulo II intitulado “Efeitos do cobre em duas espécies de peixes Neotropicais (*Astyanax altiparanae* e *Hoplias malabaricus*): uma abordagem comparativa entre presa e predador” busca-se compreender os efeitos do cobre nestas duas espécies, enfatizando as características biológicas de cada uma e comparando os resultados obtidos. Este trabalho será submetido para publicação no periódico *Aquatic Toxicology* (FI = 3,794). No Capítulo III, a importância da via trófica na exposição ao cobre é verificada em “Efeitos do cobre em *Hoplias malabaricus* após exposição pela via trófica com dieta viva: uma abordagem de múltiplos biomarcadores”, o qual será submetido a avaliação no periódico *Ecotoxicology and Environmental Safety* (FI = 4,527). O quarto capítulo aborda a toxicidade do cobre em uma espécie de origem evolutiva marinha e é intitulado: “Parâmetros fisiológicos e de estresse oxidativo no peixe Neotropical *Geophagus brasiliensis*: uma espécie de origem evolutiva marinha recente” a ser submetido ao periódico *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* (FI = 2,697). No V capítulo estão apresentadas as considerações finais deste estudo, onde as hipóteses são verificadas e os resultados dos diferentes trabalhos são comparados, visando integrar os três manuscritos.

Capítulo I

Referencial teórico



INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Contextualização

1.1.1. A contaminação dos ecossistemas aquáticos e a ecotoxicologia

Elemento essencial para todas as formas de vida no planeta, a água possui propriedades que permitem usos e funções múltiplas, as quais são essenciais para o modelo de desenvolvimento atual das sociedades: consumo, irrigação, regulação térmica, produção de energia, navegação, diluição, meio para reações, pesca, aquicultura, transporte e harmonia paisagística. No entanto, nas últimas décadas, a qualidade da água vem sendo ameaçada devido a intensa urbanização e conseqüente aumento de descarga de recursos hídricos contaminados, além do aumento e exacerbação das fontes poluidoras, falta de ações consistentes na governabilidade deste recurso e na sustentabilidade ambiental (TUNDISI, 2008).

Uma vez que os ecossistemas aquáticos são receptores finais de muitos contaminantes, conhecer o impacto ecológico e o comportamento das diversas substâncias introduzidas no ambiente pelas atividades humanas tornou-se essencial para a restauração e a conservação destes ambientes (MOISEENKO, 2008). Desta forma, a ecotoxicologia, ciência que estuda os efeitos dos contaminantes na biosfera, busca avaliar a qualidade ambiental considerando: as propriedades, o comportamento, a quantidade e a biodisponibilidade de um agente tóxico no ambiente natural, as características do ambiente, bem como a interação com a biota e os efeitos que eles provocam nos organismos, populações e comunidades (FERNICOLA et al., 2003; MOISEENKO, 2008; NEWMAN e CLEMENTS, 2008). Esta ciência tem contribuído para o levantamento de informações essenciais e para o embasamento de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes gerenciais, relacionadas aos riscos ecotoxicológicos da entrada de contaminantes no ambiente aquático (FERNICOLA et al., 2003). Assim, no âmbito da região Neotropical, é essencial que se explore a diferença de sensibilidade das espécies dessa região para que medidas protetivas mais eficientes possam ser tomadas (FURLEY et al., 2018)

1.1.2. A contaminação dos ecossistemas aquáticos pelos metais

A contaminação aquática por metais tem sido apontada como um dos fatores mais importantes na intoxicação de organismos vivos nos ecossistemas aquáticos, em razão disso, os metais vêm sendo assiduamente estudados pela ecotoxicologia. Os estudos sobre os efeitos toxicológicos dos metais e a dispersão destes elementos no ambiente começaram a surgir por

volta de 1950, principalmente após o caso da “Doença de Minamata” no Japão, na qual o acúmulo de mercúrio em peixes utilizados como fonte de alimento causaram sérias consequências a saúde humana (MCALPINE e ARAKI, 1958; WOOD, 2012).

Os metais podem ser disponibilizados por processos geoquímicos que ocorrem naturalmente. No entanto, fontes antropogênicas como atividades mineradoras, domésticas e industriais contribuem para liberação destes elementos químicos nos corpos de água. (NORDBERG et al., 2007). Por não serem degradados, uma vez extraídos, os metais são dispersos no ambiente, podendo acumular na água, sedimento e cadeias alimentares, além de causarem efeitos subletais nos organismos e até mesmo morte em populações de peixes, representando um risco para a biota aquática (WOOD, 2012; YI e ZHANG, 2012).

Por outro lado, muitos metais são necessários a vida, desempenhando várias funções nos sistemas biológicos e, desta forma, a deficiência destes elementos pode ser prejudicial. São os chamados metais essenciais, os quais podem se tornar tóxicos em concentrações acima das requeridas pelos organismos (NORDBERG et al., 2007).

1.1.3. O cobre

O cobre é um metal essencial necessário a diversas funções biológicas, podendo desempenhar papel importante na respiração celular, atuar como cofator de enzimas relacionadas à defesa antioxidante, participar da biossíntese de neurotransmissores e da homeostase do ferro (GROSSELL, 2012). O cobre encontra-se amplamente distribuído na natureza e pode ser liberado naturalmente de suas fontes por processos geoquímicos. No entanto, fontes antropogênicas como mineração, esgoto doméstico e, também industriais, como por exemplo, produção de fertilizantes, fungicidas, equipamentos eletrônicos, tintas anti-incrustantes entre outros, contribuem significativamente com a contaminação de ecossistemas aquáticos por este metal (GROSELL, 2012).

1.1.4. O cobre em ambientes dulcícolas e a legislação brasileira (CONAMA 357)

Dependendo dos níveis naturais de cobre no ambiente e das ações antrópicas ao redor de um determinado corpo de água, a concentração de cobre nos ambientes dulcícolas pode variar entre valores menores que $1 \mu\text{g L}^{-1}$ até $9000 \mu\text{g L}^{-1}$ (KAMUNDE E WOOD, 2004). Em regiões onde há a contaminação antrópica com cobre os valores podem ser maiores que $100 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo que nas áreas de mineração a concentração pode ultrapassar 100mg L^{-1} (GROSELL, 2012).

No Brasil, a legislação CONAMA 357 regulamenta a concentração de $9 \mu\text{g L}^{-1}$ e $13 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre dissolvido, dependendo do uso da água. No entanto, na região sudeste do país, em monitoramento realizado pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) no ano de 2017, foram encontradas concentrações acima das permitidas pela legislação brasileira, ao longo de todo ano, na região metropolitana de São Paulo (reservatório de Guarapiranga) (CETESB, 2017). Já na região norte do país, estudos realizados em afluentes do Rio Negro mostraram que o cobre na água de locais menos impactados pode variar sazonalmente entre 10 e $50 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto em regiões que sofrem uma maior pressão antrópica os valores podem chegar a $2100 \mu\text{g L}^{-1}$ (GIACOMIN et al., 2018).

1.1.5. A especiação do cobre no ambiente

Como mencionado anteriormente, o cobre ocorre amplamente nos ecossistemas aquáticos e pode ser encontrado na forma de íon livre, complexado a compostos orgânicos e inorgânicos ou, ainda, associado a partículas em suspensão (ACHTERBERG et al., 2002). A toxicidade deste metal pode variar não apenas em função das concentrações no ambiente, mas também em razão da ligação aos compostos presentes na água, bem como em função da competição com cátions pela tomada nas brânquias (GROSELL, 2012).

Um consenso em estudos de especiação do cobre é que a ligação deste metal a matéria orgânica, carbonatos e hidróxidos presentes na água levam a uma menor disponibilidade do cobre para os organismos aquáticos. Dessa forma, quando complexado a matéria orgânica o cobre é menos tóxico que na forma de íon livre ou, ainda, quando associado a matéria inorgânica (KAMUNDE E WOOD, 2004).

Em água doce com alto pH e alcalinidade as formas predominantes de cobre são o CuCO_3 e $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{2-}$ enquanto que em alto pH e baixa alcalinidade encontram-se principalmente CuOH^- e $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (CHAKOUMAKOS et al., 1979; ERICKSON et al., 1996). Por outro lado, em pH menores e baixa alcalinidade, Cu^{2+} é a forma que predomina e sua concentração aumenta em pHs neutros e ácidos (CHAKOUMAKOS et al., 1979; CUSIMANO et al., 1986).

As formas mais biodisponíveis e tóxicas do cobre são o Cu^{2+} e o CuOH^+ (ALLEN E HANSEN, 1996). No entanto, nos ambientes dulcícolas, a maior parte do cobre está adsorvida em partículas coloidais ou combinadas em complexos orgânicos e inorgânicos sendo que, apenas, uma pequena porcentagem está presente na forma de Cu^{2+} . O cobre pode ocorrer em dois estados de valência, sendo Cu^+ (íon cuproso) normalmente mais tóxico que o Cu^{2+} (íon cúprico). O Cu^{2+} pode ser convertido a Cu^+ em alguns tecidos, como por exemplo antes de ser

transportado pelas membranas celulares. Dessa forma, em alguns casos, a toxicidade do cobre se deve ao Cu^+ mesmo quando o organismo é exposto ao Cu^{2+} (NIKINMAA, 2014).

Além da importância da especiação do cobre de acordo com as características da água (pH, alcalinidade e matéria orgânica), cátions presentes no ambiente aquático podem representar impacto importante na toxicidade do Cu^{2+} , uma vez que estes íons podem competir com o metal pela entrada nas células brânquias, apresentando dessa forma um efeito protetor. Os íons H^+ , Na^+ e Ca^{2+} são exemplos de íons que podem agir reduzindo a toxicidade do cobre (GROSELL, 2012). Assim, águas pobres em íons podem representar um desafio maior para peixes expostos ao cobre.

1.1.6. A toxicidade do cobre em peixes Neotropicais

O estudo da concentração letal média (CL50) permite avaliar a sensibilidade das espécies frente a toxicidade do metal. A CL50 corresponde a concentração do composto que leva a morte de 50% da população de peixes estudadas. Assim, quanto menor o valor dessa taxa, maior a sensibilidade da espécie em estudo.

Como dito anteriormente, a toxicidade do metal pode ser alterada de acordo com as características da água. A espécie de peixe Neotropical *Prochilodus lineatus* apresenta em pH neutro (7,3), água mole (24 mg L^{-1} de CaCO_3) e $25 \text{ }^\circ\text{C}$ uma CL50 de $29 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre (MAZON e FERNANDES, 1999). No entanto, nas mesmas condições de dureza e temperatura, *P. lineatus*, apresentou uma CL50 de $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre em pH 4,5 e $15 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre em pH 8,0 (TAKASUSUKI et al., 2004). Segundo os autores, apesar da maior presença da forma tóxica do cobre (Cu^{2+}) em baixo pH, a menor toxicidade do metal em pH 4,5 para *P. lineatus* ocorreu devido a ação protetiva da competição por sítios de ligação dos íons H^+ com os íons Cu^{2+} .

A toxicidade do cobre pode, também, variar de acordo com a espécie estudada. Duarte et al. (2009) ao avaliar dez peixes ornamentais da Amazônia, expostos ao cobre em água pobre em íons, encontraram valores de CL50 que variaram de $12,81 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ a $74,14 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre total, sendo as espécies do grupo Characiformes mais sensíveis que as dos grupos Perciformes e Siluriformes.

1.1.7. Efeitos do cobre em peixes de água doce

Os teleósteos dulcícolas são hiperosmóticos em relação ao meio que vivem. Dessa forma, esses animais gastam energia para compensar o ganho de água e a perda de íons por difusão (EVANS et al., 2005). No ambiente aquático, a brânquia dos peixes é alvo da toxicidade dos metais, devido ao seu contato íntimo com a água. Muitos metais podem interferir na tomada de íons importantes na manutenção do equilíbrio osmo-iônico desses animais (ex: Na^+ , Cl^- , Ca^{2+}) e muitas vezes a toxicidade destes metais está atrelada a essa condição (WOOD, 2012).

O cobre, por exemplo, tem efeito conhecido na osmorregulação dos peixes de água doce. Esse metal pode competir com o Na^+ por canais de entrada na membrana apical das células branquiais e prejudicar a tomada desse íon (Fig. 1.1) (GROSELL et al., 2002). Além disso, o cobre pode interferir nas junções paracelulares das células, ao deslocar o cálcio, causando aumento da permeabilidade iônica branquial e perda de Na^+ e Cl^- para o ambiente externo (Fig. 1.1) (LAUREN e MCDONALD, 1985). A perda do Na^+ e do Cl^- plasmáticos, promovida pelo cobre, pode levar a uma diminuição da osmolalidade plasmática e, em consequência, direcionamento do fluido para as células sanguíneas. O aumento da viscosidade do sangue em conjunto com a vasoconstrição pode levar ao colapso cardiovascular e a morte dos animais (GROSELL, 2012).

Além de competir com o Na^+ pela entrada nas células branquiais e interferir na permeabilidade da brânquia, o cobre pode causar a inibição de enzimas importantes na osmorregulação, como a Na^+/K^+ -ATPase, a H^+ -ATPase, a Ca^{2+} -ATPase e a anidrase carbônica, agravando desequilíbrios iônicos no plasma e, também, alterando o equilíbrio ácido-base dos peixes (Fig. 1.1) (GROSELL et al., 2002; ATLI e CANLI, 2011; GROSELL, 2012; CHOWDHURY et al., 2016). A enzima Na^+/K^+ -ATPase está presente na membrana basolateral das células branquiais e ao transportar, com gasto de energia, Na^+ para o plasma e K^+ para o interior da célula, cria um gradiente favorável para a tomada do Na^+ em canais presentes na membrana apical da célula branquial (Fig. 1.1). A H^+ -ATPase, por sua vez, bombeia íons H^+ para a superfície externa das células branquiais, acidificando o meio e favorecendo a entrada de Na^+ por canais apicais sensíveis ao ácido (Fig. 1.1) (DYMOWSKA et al., 2014). Já a anidrase carbônica, ao catalisar a reação do CO_2 e H_2O formando H_2CO_3 fornece íons H^+ para a H^+ -ATPase, e também, para o trocador Na^+/H^+ presentes na membrana apical das células branquiais, além de fornecer o íon HCO_3^- para o trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Fig. 1.1) (EVANS, 2011). Assim, a inibição dessa enzima pelo cobre, pode levar tanto a redução da tomada do Na^+ e do Cl^- , como interferir no equilíbrio ácido-base do animal. Por último, localizada na membrana

basolateral das células branquiais, a Ca^{2+} -ATPase é responsável por manter um gradiente favorável a captação de Ca^{2+} ao promover o bombeamento desse íon para o plasma, assim, a inativação dessa enzima pelo cobre pode levar a uma hipocalcemia (Fig. 1.1) (ATLI e CANLI, 2011).

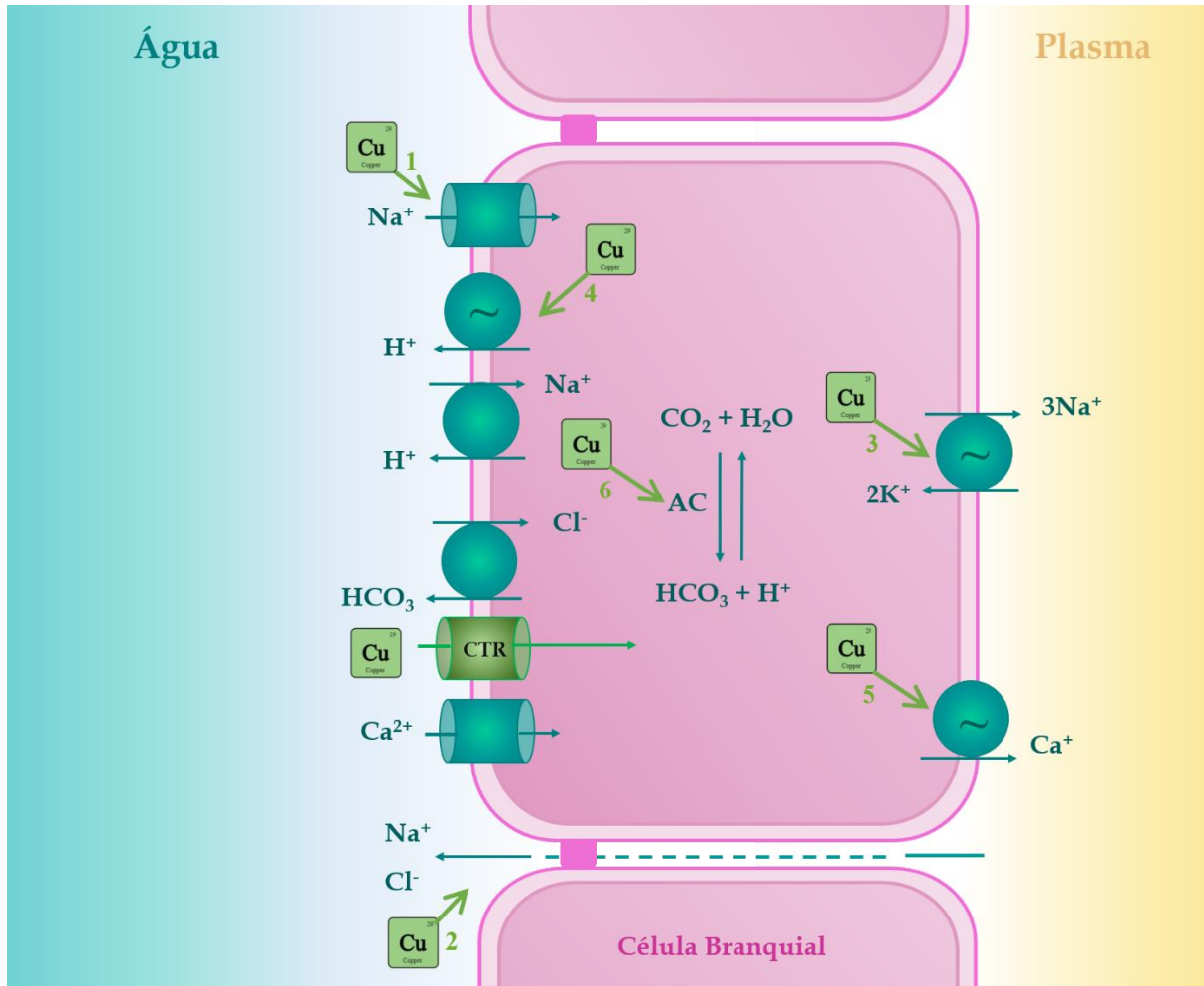


Figura 1.1. Esquema simplificado dos transportes branquiais sensíveis ao cobre. Adaptado de Grosell (2012). O cobre pode competir pela tomada de Na^+ na membrana apical das células branquiais (1). Causar um aumento do efluxo de Na^+ e Cl^- pela via paracelular (2). Promover a inibição da NKA (3), da HATP (4), da CaATP (4) e da AC (6). CTR= canal específico de entrada do cobre. (Atli e Canli, 2011; Grosell, 2012; Zimmer et al., 2012; Chowdhury et al., 2016).

Por ser um metal essencial, o cobre é finamente regulado. No entanto, um excesso desse metal na água pode levar a bioacumulação em peixes. Em geral, os órgãos que participam da captação, detoxificação e eliminação são os que mais acumulam o metal (WOOD, 2012). Durante a exposição via água, a brânquia é o principal órgão em contato com o metal e, portanto, o que primariamente o acumula (poucas horas) (GROSELL, 1997). Após a passagem pela membrana basolateral das células branquiais o cobre atinge o sistema circulatório e é

transportado, principalmente em associação a ceruloplasmina, aos demais órgãos (GROSELL, 2012). A presença do cobre no sangue é geralmente transitória, devido a eliminação promovida pelo fígado (GROSELL et al., 2001). O fígado é o principal órgão envolvido na homeostase do cobre e, portanto, as maiores concentrações de cobre são encontradas nesse órgão (25 - 60% de todo o cobre no organismo) (GROSELL, 2012). Por fim, a eliminação do cobre se dá, provavelmente, pela via hepatobiliar (GROSELL et al., 2001).

A possibilidade do cobre de existir em dois estados de valência ($\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$) faz com que este metal apresente um alto poder redox, uma vez que este processo pode transferir elétrons nos sistemas biológicos (LUSHCHAK, 2016). O potencial redox do cobre o torna elemento essencial para a vida dos organismos aeróbicos, visto que pode ser usado pela enzima citocromo c oxidase para transferência de elétrons na cadeia de transporte de elétrons (GROSELL, 2012). Por outro lado, quando a concentração de cobre na célula excede a requerida, a propriedade redox deste metal pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são altamente instáveis (GROSELL, 2012). Normalmente, a concentração de cobre livre no interior das células é mantida baixa, e quando os sítios de ligação para este metal são saturados novas moléculas com capacidade ligante, como por exemplo as metalotioneínas, são produzidas. No entanto, quando todos os sítios de ligação são saturados, pode ocorrer uma elevada produção de ERO via reação de Fenton levando a célula ao estresse oxidativo (Fig. 1.2) (LUSCHAK, 2016).

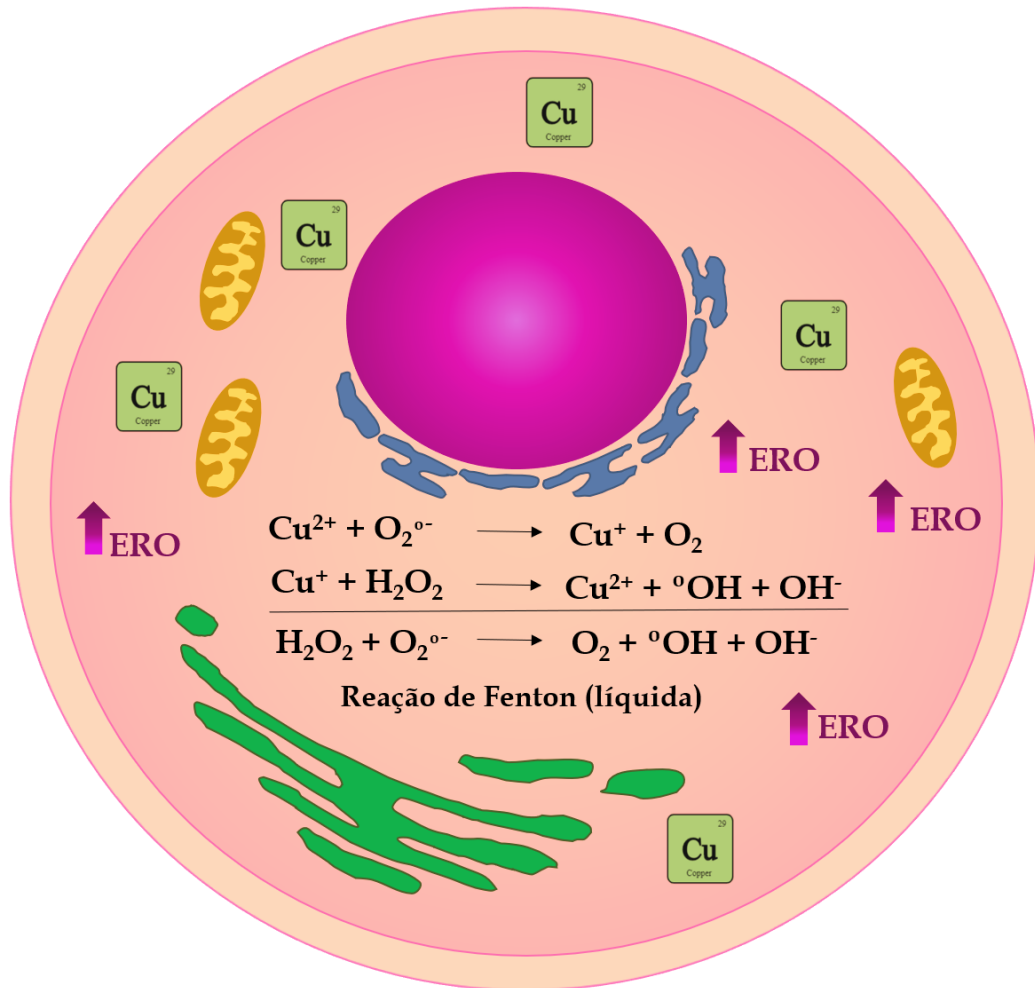


Figura 1.2. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela reação de Fenton. Baseado em Luschack (2016)

O estresse oxidativo é o processo em que a formação de ERO excede a capacidade de eliminação destas moléculas pelas defesas antioxidantes. As defesas antioxidantes por sua vez são enzimas ou moléculas que atuam neutralizando as ERO. Portanto, a exposição dos peixes ao cobre pode aumentar a atividade das enzimas antioxidantes primárias, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), além do conteúdo do tripeptídeo glutathione (GSH) (Figura 1.3) (HANSEN et al., 2006; LUSHCHAK, 2016). No entanto, quando não são neutralizadas, as ERO podem interagir com biomoléculas como proteínas, lipídeos e DNA causando prejuízo ao funcionamento celular.

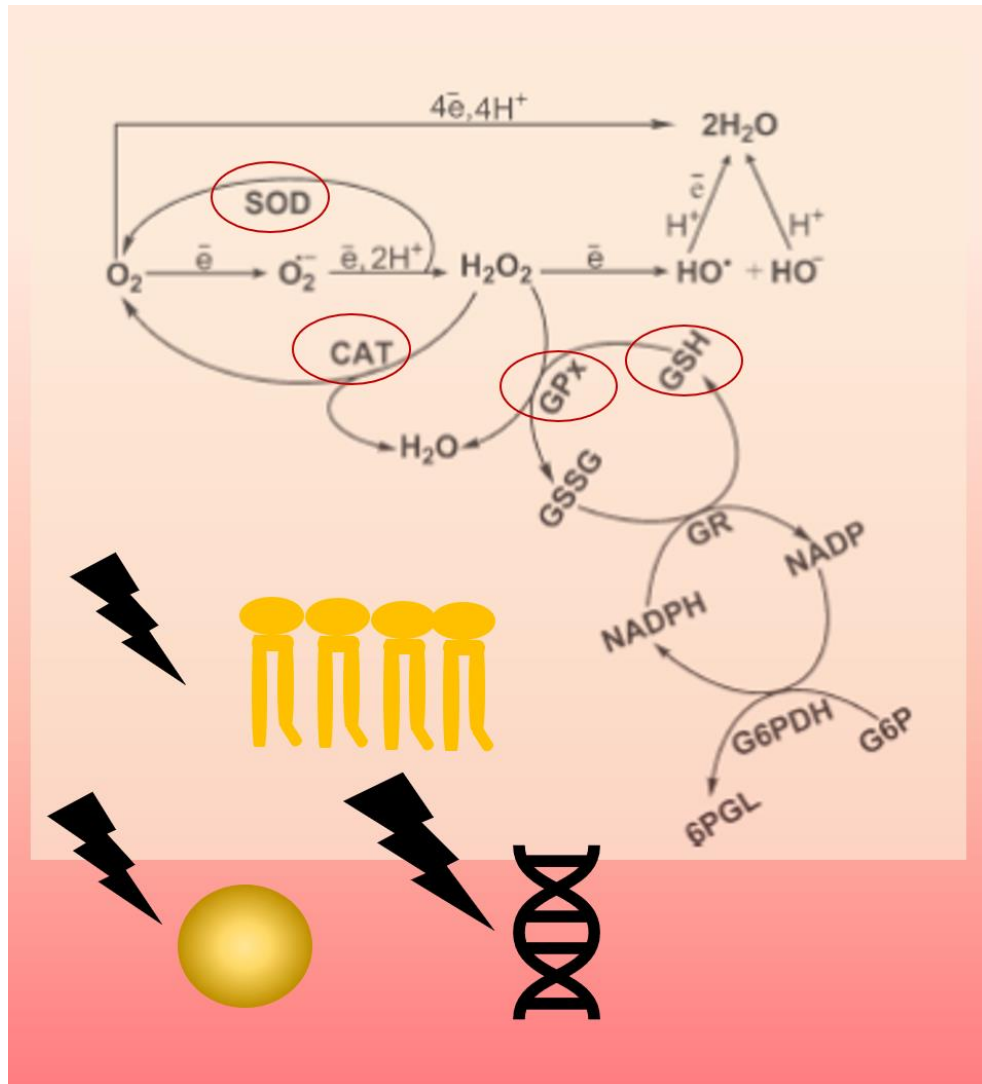


Figura 1.3. Ação das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e do tripeptídeo GSH no combate as ERO. Quando a ação das defesas antioxidantes não é suficiente para combater as ERO podem ocorrer danos em biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA. Adaptado de Luscheck (2016)

1.1.8. Vias de exposição

Diferentes vias de exposição podem afetar a toxicocinética dos metais, a qual corresponde ao tempo de captação, translocação, capacidade de transformação e eliminação, levando dessa forma a possíveis mudanças na toxicodinâmica, ou seja, tempo de ação de um composto em seu sítio alvo, bem como os efeitos e respostas dos organismos à presença do contaminante (ASHAUER e ESCHER, 2010). Dessa forma, estudar diferentes vias de contaminação pode trazer dados mais consistentes sobre a toxicidade de um dado contaminante.

Na ecotoxicologia, um composto tóxico que se quer estudar pode ser administrado de diversas formas, via intravenosa, injeção intraperitoneal, via gavagem (alimentação forçada), como parte da dieta normal ou, ainda, o organismo pode ser exposto ao contaminante na água.

Todas as formas são válidas para estudar a toxicidade dos compostos. No entanto, os resultados podem não ser ambientalmente relevantes se os mecanismos de tomada não forem considerados (NIKINMAA, 2014).

Apesar da maioria dos estudos ecotoxicológicos apresentarem enfoque na toxicidade dos metais via água, há uma crescente percepção da importância da via trófica na toxicologia destes elementos (WOOD, 2012). Contudo, as diferenças metodológicas empregadas na avaliação da toxicidade dos metais pela dieta geram dúvidas. Estudos que utilizaram dieta contaminada naturalmente com metais mostraram toxicidade em concentrações menores do que as requeridas para causar toxicidade em dietas preparadas em laboratório (ex: ração acrescida de solução de metal) (revisado por CLEARWATER et al, 2002). Dessa forma, surgiu a preocupação de que estudos com dieta suplementadas em laboratório poderiam subestimar a toxicidade do metal pela dieta e o significado ecológico da via trófica para os organismos aquáticos (CLEARWATER et al, 2002; HANSEN et al, 2004; GROSELL, 2012).

1.1.9. Modelos biológicos

Os peixes são organismos sentinelas empregados mundialmente na ecotoxicologia aquática devido a variedade de nichos ecológicos que esses organismos ocupam e por serem amplamente utilizados para alimentação humana (RATTE et al., 2002). São considerados os organismos mais viáveis para o monitoramento da poluição em ecossistemas aquáticos, uma vez que podem ser encontrados facilmente nesses ambientes (VAN DER OOST et al., 2003).

Hoplias malabaricus

Em estudos de biomonitoramento de ecossistemas, predadores de topo de cadeia são relevantes por possuírem relação intrínseca com organismos em níveis inferiores da cadeia alimentar, podendo assim, indicar efeitos cumulativos e, além disso, efeitos diretos individuais (LINS et al., 2010).

Conhecida popularmente como traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974), apresenta ampla distribuição na América do Sul e América Central, ocorrendo desde a Costa Rica até a Argentina, na maior parte das bacias hidrográficas dessa extensão. (FISHBASEa, 2018). Esse peixe possui corpo fusiforme de coloração parda a marrom, com faixas oblíquas escuras a partir da cabeça e nadadeiras malhadas (Fig. 1.4). Vive no fundo, em locais mais calmos, próximos à margem. (SHIBATTA et al., 2002). É uma espécie não migradora, essencialmente piscívora e

classificada como de estratégia emboscadora engolindo a presa por inteiro (BENNEMANN e SHIBATTA, 2002).

Em estudos de exposição trófica a contaminantes é um modelo biológico interessante por ter um comportamento voraz, capacidade de adaptação a condições experimentais e por ser predador de topo de cadeia (ALVES COSTA et al., 2007). Além disso *H. malabaricus* é muito tolerante a privação de alimento, sobrevivendo por períodos de mais de 180 dias sem reduzir a taxa metabólica (RIOS et al., 2005).



Figura 1.4. Exemplar de *Hoplias malabaricus* (Foto: Caroline Santos)

Astyanax altiparanae

Pertencente à família Characidae, o gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854, representa um dos principais componentes da cadeia trófica em rios Sul Americanos, uma vez que faz parte da dieta de peixes carnívoros maiores existentes nesses ambientes (PRIOLI et al., 2002).

Conhecido popularmente como lambari-de-rabo-amarelo ou tambiú, a espécie *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 possui porte pequeno, corpo alto, prateado, com nadadeiras amareladas e mancha umeral elíptica de cor castanho-escuro (Fig. 1.5). Vive entre a vegetação submersa e em águas menos turbulentas (SHIBATTA et al., 2002). É classificada como espécie onívora oportunista, forrageando em diversos níveis tróficos (BENNEMANN; SHIBATTA, 2002; GOMIERO e BRAGA, 2003) podendo, dessa forma, entrar em contato com vários contaminantes. Assim, as espécies do gênero *Astyanax* têm se mostrado sensíveis a várias substâncias, constituindo um bom modelo biológico e sendo amplamente utilizadas na ecotoxicologia (VIEIRA et al., 2014; GALVAN et al., 2016; SILVA et al., 2016).



Figura 1.5. Exemplar de *Astyanax altiparanae* (Foto: Angélica A. de Paula)

Geophagus brasiliensis

Conhecida popularmente como cará ou acará a espécie *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) possui corpo alto e porte médio, nadadeira dorsal alongada, raios anteriores pungentes. Boca inferior. Coloração castanho-clara com muitas pintas azuis no tronco e na cabeça (Fig. 1.6). Geralmente ocupa ambientes de água parada (SHIBATTA et al., 2002). Apresenta ampla distribuição nacional, podendo ser encontrada desde a bacia Amazônica até a bacia do rio da Prata no sul do Brasil (FISHBASEb, 2018). Apresenta hábito alimentar onívoro de comportamento predominantemente bentônico (NUNES et al., 2014; GOMIERO e BRAGA, 2008). Essa espécie tolera grandes variações de salinidade sendo encontrada não só em ambientes de água doce, mas também, em regiões costeiras de maior salinidade (FREIRE et al., 2008).

Geophagus brasiliensis também tem sido estudada na ecotoxicologia e tem se mostrado sensível a diversas substâncias químicas como metais (CALZA et al., 2004; RODRIGUEZ-CEA et al., 2006; TERRA et al., 2008; VOIGT et al., 2015), cianotoxinas (CLEMENTE et al., 2010; CALADO et al., 2017), esgoto doméstico (GRISOLIA et al., 2009) e mistura complexa de substâncias (WILHELM FILHO et al., 2001; ROMÃO et al., 2006; BENINCÁ et al., 2012)



Figura 1.6. Exemplo de *Geophagus brasiliensis* (Foto: Angélica A. de Paula)

1.2. Justificativa

O cobre é um metal muito encontrado nos ambientes dulcícolas e seus efeitos em organismos aquáticos têm sido amplamente avaliados pela ecotoxicologia. No entanto, a toxicidade deste metal pode depender da espécie estudada e das características químicas da água. Contudo, a grande maioria dos estudos que avaliam os efeitos do cobre 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 a sensibilidade de diferentes espécies por meio de múltiplos biomarcadores deve ajudar a elencar modelos biológicos mais sensíveis para o biomonitoramento dos ecossistemas aquáticos neotropicais. Além disso, o uso de diferentes biomarcadores em uma abordagem integrada pode fornecer um panorama que agrega maior importância ecológica acerca dos efeitos tóxicos de um composto.

Assim, considerar o histórico de vida e a biologia das espécies na escolha dos modelos biológicos a serem estudados é crucial. Neste contexto, o presente estudo elencou um Perciforme (*Geophagus brasiliensis*), espécie de origem evolutiva marinha recente e eurialina, que por tais características, consegue lidar com distúrbios iônicos do Na⁺. A escolha dessa espécie foi baseada no principal efeito tóxico descrito na literatura para o cobre: o desequilíbrio do Na⁺ plasmático.

Já a escolha de *Astyanax altiparanae* e *Hoplias malabaricus* está baseada principalmente na relação presa e predador dessas espécies, atrelada a necessidade de se compreender como a toxicidade do cobre pode ser alterada em função da via de exposição. Os efeitos do cobre pela via trófica são pouco compreendidos quando comparados a via água, e no que diz respeito às espécies tropicais, este conhecimento é ainda mais escasso. Uma vez que a incorporação do metal em tecidos biológicos pode aumentar a sua toxicidade e a fim de obter respostas com uma maior relevância ecológica, no presente estudo exemplares de *H. malabaricus* foram alimentados com *A. altiparanae* previamente expostos ao cobre.

Adicionalmente, os estudos de exposição ao cobre via água de *A. altiparanae* e *H. malabaricus*, além de contribuir com dados sobre o mecanismo de toxicidade do cobre em duas espécies neotropicais, são essenciais para a comparação da importância da via trófica para espécie *H. malabaricus*.

1.3. Hipóteses

- 1) As espécies estudadas apresentarão sensibilidade distintas ao cobre, sendo *Geophagus brasiliensis* a espécie menos sensível e *Astyanax altiparanae* a espécie mais sensível.
- 2) A via de exposição irá interferir nas respostas dos biomarcadores em *Hoplias malabaricus*, sendo que a exposição via trófica resultará em efeitos mais tóxicos.
- 3) O cobre causará mobilização das defesas antioxidantes e danos oxidativos nas três espécies.
- 4) O cobre causará desequilíbrio do Na⁺ plasmático em *Hoplias malabaricus* e *Astyanax altiparanae*, mas não causará em *Geophagus brasiliensis*.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da exposição aguda (96 h) ao cobre em três espécies de peixes neotropicais por meio de diversos biomarcadores e da análise de sua bioacumulação e verificar os efeitos deste metal considerando-se diferentes vias de exposição (*H. malabaricus*).

1.4.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da exposição ao cobre na água nas espécies *H. malabaricus*, *A. altiparanae* e *G. brasiliensis*;
- Verificar os efeitos do cobre em *H. malabaricus* alimentados com presas vivas (*A. altiparanae*) expostas ao cobre na água;
- Compreender a interferência da via de exposição sobre os efeitos do cobre em *H. malabaricus*, utilizando para tal, exposição por via trófica e via água;
- Verificar a validade protetiva da legislação brasileira (CONAMA/357) em relação ao cobre para as três espécies de peixe;
- Identificar quais biomarcadores são mais sensíveis para examinar o efeito do cobre: biomarcadores fisiológicos ou de estresse oxidativo;
- Identificar diferenças e semelhanças nas respostas das espécies estudadas na exposição aguda ao cobre.

1.5. Referências

- ACHTERBERG, E.R.; VAN ELTEREN; J.T., KOLAR Z.I. Species kinetics and heterogeneous reactivity of dissolved Cu in natural freshwaters. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 914-920, 2002.
- ALLEN, H.E.; HANSEN, D.J. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. **Water Environment Research**, v. 68, p. 42-54, 1996.
- ALVES COSTA, J.R.M.; MELA, M.; ASSIS, H.C.S.; PELLETIER, E.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 67, p. 82-88, 2007.
- ASHAUER, R.; ESCHER, B.I. Advantages of toxicokinetic and toxicodynamic modeling in aquatic ecotoxicology and risk assessment. **Journal of environmental monitoring**, v. 12, p. 2056-2061, 2010.
- ATLI, G.; CANLI, M. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney, and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 1861-1869, 2011.
- BENNEMANN, S.T.; SHIBATTA, O. Dinâmica de uma assembléia de peixes do rio Tibagi. In: MEDRI, M.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.; PIMENTA, J. (Eds.). **A Bacia do rio Tibagi**. Londrina, PR: Eduel, 2002. p. 433-442.
- BENINCÁ, C.; RAMSDORF, W.; VICARI, T.; RIBEIRO, C.A.O.; ALMEIDA, M.I.; ASSIS, H.C.S.; CESTARI, M.M. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast – Southern of Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, p. 2045-2056, 2012.
- CALADO, S.L.M; WOJCIECHOWSKI, J.; SANTOS, G.S.; MAGALHÃES, V.F.; PADIAL, A.A.; CESTARI, M.M.; ASSIS, H.C.S. Neurotoxins in a water supply reservoir: An alert to environmental and human health. **Toxicol**, v. 126, p. 12-22, 2017.
- CALZA, C.; ANJOS, M. J.; CASTRO, C.R.F.; BARROSO, R.C.; ARAUJO, F.G.; LOPES, R.T. Evaluation of heavy metals levels in the Paraíba do Sul River by SRTXRF in muscle, gonads and gills of *Geophagus brasiliensis*. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, p. 787-788, 2004.
- CETESB, Governo do Estado de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2017. Relatório: Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo. <<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2018/06/Relat%C3%B3rio-de-Qualidadedas%C3%81guasInteriores-no-Estado-de-S%C3%A3o-Paulo-2017.pdf>> (accessed 2020.).
- CHAKOUMAKOS, C.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Toxicity of copper to cutthroat trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, pH and hardness. **Environmental Science and Technology**, v. 13, p. 213-219, 1979.

CHOWDHURY, M.J.; GIRGIS, M.; WOOD, C.M. Revisiting the mechanisms of copper toxicity to rainbow trout: time course, influence of calcium, unidirectional Na⁺ fluxes, and branchial Na⁺, K⁺ ATPase and V-type H⁺ ATPase activities. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 51-62, 2016

CLEARWATER, S.J.; FARAG, A.M.; MEYER, J.S. Bioavailability and toxicity of diet borne copper and zinc to fish. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 132, p. 269-313, 2002

CLEMENTE, Z.; BUSATO, R.H.; RIBEIRO, C.A.O.; CESTARI, M.M.; RAMSDORF, W.A.; MAGALHÃES, V.F.; WOSIACK, A.C.; ASSIS, H.C.S. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. **Toxicon**, v. 55, p. 396-406, 2010.

CONAMA 357. Resolução 357, 2005. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> (acesso 2018).

CUSIMANO, R.F.; BRAKKE, D.F.; CHAPMAN, G.A. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 43, p. 1497-1503, 1986.

DUARTE, R.M.; MENEZES, A.C.L.; da SILVEIRA RODRIGUES, L.; de ALMEIDA-VAL, V.M.F., VAL, A.L. Copper sensitivity of wild ornamental fish of the Amazon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 693-698, 2009.

DYMOWSKA, A.K.; SCHULTZ, A.G.; BLAIR, S.D.; CHAMOT, D.; GOSS, C.G. Acid-sensing ion channels are involved in epithelial Na⁺ uptake in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 307, p. 255-265, 2014

ERICKSON, R.J.; BENOIT, D.A.; MATTSON, V.R.; NELSON, H.P., Jr.; LEONARD, E.N. The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 181-193, 1996.

EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v.85, p. 97-177, 2005.

EVANS, D.H. 2011. Freshwater fish gill ion transport: August Krogh to morpholinos and microprobes. **Acta Physiologica**, v. 202, p. 349-359.

FERNICOLA, N.A.G.G; BOHRER-MOREL, M.B.C; BAINY A.C.D. Ecotoxicologia. In: AZEVEDO F.A.; CHASIN A.A.M. (Eds). **As bases toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Paulo: Rima Editora e Intertox, 2003. p. 221-244.

FISHBASEa. *Hoplias malabaricus*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/4757>> Acesso em: 3 mar. 2018.

FISHBASEb. *Geophagus brasiliensis*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/4751>>. Acesso em: 4 fev. 2018.

FREIRE, C.A.; AMADO, E.M.; SOUZA, L.R.; VEIGA, M.P.; VITULE, J.R.; SOUZA, M.M.; PRODOCIMO, V. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 149, p. 435-446, 2008.

FURLEY, T.H.; BRODEUR, J.; ASSIS, H.C.S.; CARRQUIRIBORDE, P.; CHAGAS, K.R.; CORRALES, J.; DENADAI, M.; FUCHS, J.; MASCARENHAS, R.; MIGLIORANZA, K.S.B.; CARAMÉS, D.M.M.; NAVAS, J.M.; NUGEGODA, D.; PLANES, E.; RODRIGUEZ-JORQUERA, I.A.; OROZCO-MEDINA, MARTHA; BOXALL, A.B.A.; RUDD, M.A.; BROOKS, B.W. Toward sustainable environmental quality: identifying priority research questions for Latin America. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 14, p. 344-357, 2018.

GIACOMIN, M.; VILARINHO, G.C.; CASTRO, K.F.; FERREIRA, M.; DUARTE, R.M.; WOOD, C.; VAL, A.L. Physiological impacts and bioaccumulation of dietary Cu and Cd in a model teleost: The amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquatic Toxicology**, v. 1999, p. 30-45, 2018.

GROSELL, M. Copper. In: WOOD, C.M.; FARREL, A.P.; BRAUNER, C.J. (Eds.) **Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals**. San Diego, CA, Academic Press/Elsevier, 2012. p. 54-135.

GROSELL, M.H.; HOGSTRAND, C.; WOOD, C.M. Cu uptake and turnover in both Cu acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 38, p. 257-276, 1997.

GROSELL, M.; MCGEER, J.C.; WOOD, C.M. Plasma copper clearance and biliary copper excretion are stimulated in copper-acclimated trout. **American Journal of Physiology**, v. 280, p. 796-806, 2001.

GROSELL, M.; NIELSEN, C.; BIANCHINI, A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 133, p. 287-303, 2002.

GALVAN, G.L.; LIROLA, J.R.; FELISBINO, K.; VICARI, T.; YAMAMOTO, C.I.; CESTARI, M.M. Genetic and Hematologic Endpoints in *Astyanax altiparanae* (Characidae) after exposure and recovery to water soluble fraction of gasoline (WSFG). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, p. 63-70, 2016.

GOMIERO, L.M.; BRAGA, F.M.S. O lambari *Astyanax altiparanae* (Characidae) pode ser um dispersor de sementes? **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 25, p. 353-360, 2003.

GOMIERO, L.M.; BRAGA, F.M.S. Feeding habits of the ichthyofauna in a protected area in the state of São Paulo, southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 8, p. 41-47, 2008.

GRISOLIA, C.K.; RIVERO, C.L.G.; STARLING, F.L.R.M.; DA SILVA, I.C.R.; BARBOSA, A.C.; DOREA, J.G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 138-143, 2009.

- HANSEN, J.A.; LIPTON, J.; WELSH, P.G.; CACELA, D.; MACCONNELL, B. Reduced growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a live invertebrate diet pre-exposed to metal-contaminated sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 1902-1911, 2004.
- HANSEN, J.A.; RØMMA, S.; SØFTELAND, L.I.R.; OLSVIK, P.A.; ANDERSEN, R.A. Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cu-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). **Chemosphere**, v. 65, p. 1707-1714, 2006.
- KAMUNDE, C.N.; WOOD, C.M. Environmental chemistry, physiological homeostasis, toxicology and environmental regulation of copper, an essential element in freshwater fish. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, v. 10, p. 1-20, 2004.
- LAUREN, D.J.; MCDONALD, D.G. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson – modulation by water hardness and pH. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 155, 635-644, 1985.
- LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S.M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, p. 469-484, 2010.
- LUSHCHAK, V.I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 711-747, 2016.
- MAZON, A.F.; FERNANDES, M.N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, p. 797-804, 1999.
- MCALPINE, D.; ARAKI, S. Minamata disease an unusual neurological disorder caused by contaminated fish. **The Lancet**, v. 272, p. 629-631, 1958.
- MOISEENKO, T.I. Aquatic Ecotoxicology: Theoretical Principles and Practical Application. **Water Resources**, v. 35, p. 530-541, 2008.
- NEWMAN, M. C.; CLEMENTS W. H. **Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 882.
- NIKINMAA, M. C. **An introduction to aquatic toxicology**. Oxford: Academic Press, 2014. 240 p.
- NORDBERG, G.F.; FOWLER, B.A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L.T. **Handbook on the toxicology of metals**. San Diego: Academic Press, 2007. 975 p.
- NUNES, M.V.; ROCHA, O.; VERANI, J.R. Trophic interactions between the fish *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae) and the benthic macroinvertebrate community. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 49, p. 11-17, 2014.
- PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO JR, H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A. V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 421-430, 2002.

RATTE, H.T.; HAMMERS-WIRTZ, M.; CLEUVERS M. Ecotoxicity testing. In: MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. (Eds): **Bioindicators and biomonitors**. Amsterdã: Elsevier Science B.V., 2002. p. 221-255.

RIOS, F.S.; OBA, E.T.; FERNANDES, M.N.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 140, p. 281-287, 2005.

RODRÍGUEZ-CEA, A.; ARIAS, A.R.L.; DE LA CAMPA, M.R.F.; MOREIRA, J.C.; SANZ-MEDEL, A. Metal speciation of metallothionein in white sea catfish, *Netuma barba*, and pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, by orthogonal liquid chromatography coupled to ICP-MS detection. **Talanta**, v. 69, p. 963-969, 2006.

ROMÃO, S.; DONATTI, L.; FREITAS, M.O.; TEIXEIRA, J.; KUSMA, J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 441-448, 2006.

SHIBATTA, O.A.; ORSI, M.L.; BENNEMANN, S.T.; SILVA-SOUZA, T.A. Diversidade e Distribuição de Peixes na Bacia do Tibagi. In: MEDRI, M.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.; PIMENTA, J. (Eds.). **A Bacia do Tibagi**. Londrina, PR: Eduel, 2002. p. 403-423.

SILVA, S. V.S.; DIAS, A.H.C.; DUTRA, E.S.; PAVANIN, A.L.; MORELLI, S.; PEREIRA, B.B. The impact of water pollution on fish species in southeast region of Goiás, Brazil. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 79, p. 8-16, 2016.

TAKASUSUKI, J.; ARAUJO, M.R.R.; FERNANDES, M.N. Effect of Water pH on Copper Toxicity in the Neotropical Fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 72, p. 1075-1082, 2004.

TERRA, B.F.; ARAÚJO, F.G.; CALZA, C.F.; LOPES, R.T.; TEIXEIRA, T.P. Heavy metal in tissues of three fish species from different trophic levels in a tropical Brazilian river. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 187, p. 275-284, 2008.

TUNDISI, J.G. Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 22, p. 7-16, 2008.

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

VIEIRA, C.E.D; ALMEIDA, M.S.; GALINDO, B.A.; PEREIRA, L.; MARTINEZ, C. B.R. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, p. 153-164, 2014.

VOIGT, C.L.; DA SILVA, C.P.; DORIA, H.B.; RANDI, M.A.F.; RIBEIRO, C.A.O.; CAMPOS, S.X. Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 8242-8252, 2015.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; TRIBESS, T.B.; PEDROSA, R.C.; SOARES, C.H.L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 719-726, 2001.

WOOD, C.M., 2012. An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. In: WOOD, C.M.; FARRELL, A.P.; BRAUNER, C.J. (Eds.), **Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals**. San Diego, CA Academic Press/Elsevier, 2012. p. 1-51.

YI, Y.; ZHANG, S. 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**, v. 19, p. 3989-3996, 2012.

Capítulo II

Efeitos do cobre em duas espécies de peixes Neotropicais (*Astyanax altiparanae* e *Hoplias malabaricus*): uma abordagem comparativa entre presa e predador

Angélica Alves de Paula, Wagner Ezequiel Riso, Claudia Bueno dos Reis Martinez



VS



Manuscrito a ser submetido para avaliação no periódico Aquatic Toxicology

Normas disponíveis em:

<https://www.elsevier.com/journals/aquatic-toxicology/0166-445x/guide-for-authors>

Efeitos do cobre nos peixes Neotropicais *Astyanax altiparanae* e *Hoplias malabaricus*: uma abordagem comparativa entre presa e predador

Angélica Alves de Paula¹, Wagner Ezequiel Risso¹, Claudia Bueno dos Reis Martinez*¹

¹Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

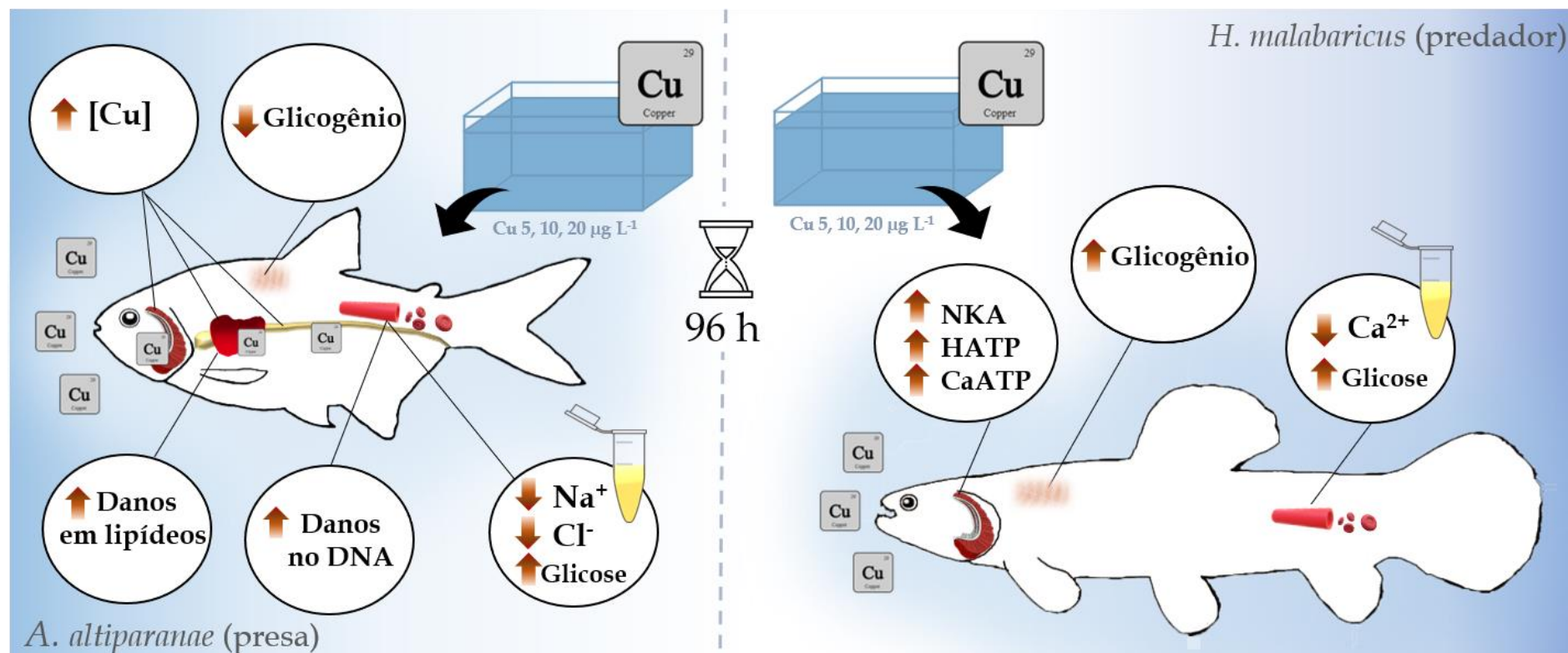
* Autor correspondente:

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

Highlights

- A presa (*A. altiparanae*) apresentou maior sensibilidade ao cobre
- O cobre acumulou nos tecidos de *A. altiparanae* e não nos tecidos de *H. malabaricus*
- Houve aumento da atividade das ATP-ases branquiais apenas em *H. malabaricus*
- Houve danos em lipídeos e no DNA de eritrócitos apenas de *A. altiparanae*
- *A. altiparanae* catabolizou e *H. malabaricus* estocou glicogênio muscular

Resumo gráfico



Resumo

O cobre é um metal essencial para a vida. No entanto, quando em excesso, pode levar a distúrbios osmorregulatórios e estresse oxidativo em peixes e esses efeitos parecem ser espécie específicos. A fim de avaliar os efeitos do cobre e comparar a sensibilidade de duas espécies Neotropicais que coocorrem na natureza como presa (*Astyaynax altiparanae*) e predador (*Hoplias malabaricus*), peixes foram expostos a três concentrações de Cu ($5 \mu\text{g L}^{-1}$, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$) por 96 h. Ao final do período experimental, foram avaliados parâmetros osmorregulatórios, biomarcadores de estresse oxidativo, concentração de cobre nos tecidos, glicose plasmática e glicogênio e atividade da acetilcolinesterase. Os resultados revelaram distúrbios iônicos espécie-específicos. Apesar da hipocalcemia, *H. malabaricus* mostrou um aumento das principais ATPases branquiais, o que provavelmente garantiu a manutenção do Na^+ plasmático. Já em *A. altiparanae* não houve alteração na atividade das ATPases nas brânquias mas uma hiponatremia foi observada em todas as concentrações de cobre avaliadas, bem como uma diminuição do Cl^- do grupo Cu 20. A estratégia adotada por *H. malabaricus* parece ter contribuído para que não houvesse acúmulo de cobre nos tecidos, além de possivelmente estar relacionada a ausência de estresse oxidativo nessa espécie. Em contrapartida, houve um aumento na concentração de cobre nas brânquias, no fígado e no trato gastrointestinal de *A. altiparanae*, além de estresse oxidativo evidenciado por aumento da lipoperoxidação no fígado e danos no DNA de eritrócitos. Houve ainda, mortalidade de 25% dos peixes do grupo Cu 20 de *A. altiparanae*. Este trabalho reforça a ideia de que as respostas ao cobre são espécie específicas de forma que uma mesma concentração pode não ser segura para espécies diferentes, que possam vir a coexistir no mesmo ambiente.

Palavras chave: Biomarcadores, osmorregulação, dano oxidativo, hipocalcemia, hiponatremia

1. Introdução

O cobre é um dos metais mais abundantes na natureza e pode ser liberado naturalmente de suas fontes por processos geoquímicos, sendo, dessa forma, comumente encontrado em ambientes aquáticos (USEPA, 2007). No entanto, fontes antropogênicas como mineração, esgoto doméstico e fontes industriais (*e.g.* produção de fertilizantes, fungicidas, equipamentos eletrônicos, tintas anti-incrustantes, entre outros) contribuem significativamente com a contaminação de ecossistemas aquáticos por este metal (Simonato et al., 2016). Essencial para vida dos organismos, o cobre atua em várias funções celulares, podendo agir como cofator de enzimas antioxidantes, fazer parte da biossíntese de neurotransmissores e atuar na respiração celular (Grosell, 2012). Todavia, quando em altas concentrações na água, pode levar a efeitos adversos em organismos aquáticos.

Em peixes dulcícolas, a exposição aguda a um excesso de íons de cobre parece ter como órgão alvo as brânquias, causando principalmente distúrbios osmorregulatórios e até mesmo danos histológicos e/ou morte dos animais (Cerqueira e Fernandes, 2002; Mazon et al., 2002). O cobre pode levar a uma diminuição na tomada do Na^+ tanto por competir por canais de entrada, quanto por desencadear um aumento do efluxo desse íon nas brânquias e, por consequência, perda de íons Cl^- (Grosell et al., 2012). Além de competir com o aporte de Na^+ nas brânquias, o cobre pode causar a inativação de enzimas dependentes de ATP, como a Na^+/K^+ -ATPase, a H^+ -ATPase e a Ca^{2+} -ATPase (Atli e Canli, 2011; Chowdhury et al., 2016) contribuindo ainda mais para o desequilíbrio iônico em peixes de água doce. Por outro lado, apesar da hiponatremia ser um efeito amplamente relatado em peixes expostos ao cobre (revisado por Grosell, 2012), hipocalcemia e ausência de distúrbios iônicos com relação ao Na^+ também já foram observadas em *Danio rerio* exposto a esse metal por 96 h (Alsop e Wood, 2011).

Por ter um alto potencial oxidativo o cobre pode levar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e alterar a homeostase celular (Lushchak, 2016). Em consequência, após exposição aguda a esse metal, peixes podem apresentar um aumento na produção de moléculas com capacidade antioxidante, como as metalotioneínas (Kim et al., 2014; Simonato et al., 2016) e a glutathiona (Eyckmans et al., 2011). Para as defesas antioxidantes enzimáticas já foram reportadas tanto a ativação de enzimas antioxidantes em brânquia e fígado, como a catalase, glutathiona S-transferase (Nunes et al., 2015) e superóxido dismutase (Vutukuru et al., 2005; Simonato et al., 2016), bem como diminuição de todas essas enzimas (Gopi et al., 2019). Quando as defesas antioxidantes não são suficientes para garantir o equilíbrio redox nas células,

o cobre pode induzir estresse oxidativo em animais aquáticos, ocasionando inativação enzimática, dano no DNA, lipoperoxidação e carbonilação de proteína (Van der Oost et al., 2003; Craig et al., 2007; Braz-mota et al., 2016; Simonato et al., 2016; Kirici et al., 2017; Husak et al., 2018).

Os mecanismos de resposta frente à toxicidade do cobre parecem ser espécie específicos para peixes e estão associados principalmente à capacidade de lidar com o estresse oxidativo, à homeostase das metalotioneínas e à capacidade de manutenção do equilíbrio iônico (Duarte et al., 2009; Braz-Mota et al., 2018; Shekh et al., 2019; Shekh et al., 2020). Peixes de água doce de regiões neotropicais possuem grande diversidade em atributos ecológicos, morfológicos e fisiológicos e sua sensibilidade aos metais é pouco explorada quando comparadas a peixes de ambientes temperados amplamente estudados como *Oncorhynchus mykiss* e *Pimephales promelas* (Giacomin et al., 2018). Assim, caracterizar a sensibilidade espécie-específica, por meio de biomarcadores comumente empregados para avaliar a toxicidade de metais como o cobre, é de extrema importância para o conhecimento da toxicidade destes compostos para a fauna neotropical.

As espécies de peixes neotropicais *Astyanax altiparanae* (lambari) e *Hoplias malabaricus* (traíra), podem ser encontradas em um mesmo ambiente, sendo presa e predador, respectivamente, podendo, portanto, estar sujeitas a um mesmo aporte de contaminantes. O lambari (*A. altiparanae*), é uma espécie onívora oportunista (Bennemann e Shibatta, 2002; Gomiero e Braga, 2003) que forrageia ativamente em diversos níveis tróficos e pode, dessa forma, entrar em contato com vários contaminantes. Essa espécie tem se mostrado sensível a várias substâncias, constituindo um excelente modelo biológico para estudos ecotoxicológicos (Vieira et al., 2014; Galvan et al., 2016; Silva et al., 2016; Pereira et al., 2019). Já a traíra, é um predador essencialmente piscívoro de estratégia emboscadora (senta-espera) (Bennemann e Shibatta, 2002). *Hoplias malabaricus* é utilizada em estudos ecotoxicológicos, principalmente de exposição trófica, devido ao seu comportamento voraz, alta capacidade de adaptação a condições experimentais e por ser predador de topo de cadeia (Alves Costa et al., 2007; Monteiro et al., 2013; Monteiro et al., 2020).

A relação de equilíbrio entre as populações de presa e predador é de suma importância para a manutenção da integridade dos ecossistemas aquáticos. Ao adentrarem os corpos d'água os metais podem interferir tanto na química da comunicação entre presa e predador (Gosavi et al., 2020) como causar outros efeitos subletais ou até mortalidade de espécies mais sensíveis, afetando essa relação. Dessa forma, considerando a especificidade de resposta em teleósteos de

água doce ao cobre, *A. altiparanae* e *H. malabaricus* foram expostos às mesmas concentrações deste metal, a fim de comparar os mecanismos resposta de cada espécie, enfatizando efeitos na osmorregulação e metabolismo e biomarcadores de estresse oxidativo e neurotoxicidade. Nós levantamos a hipótese de que a presa será mais sensível ao cobre, uma vez que de um modo geral, na natureza, a mortalidade das presas é maior que a dos predadores.

2. Material e Métodos

2.1. Aclimação

Fêmeas adultas de *A. altiparanae* ($n = 64$; $11,27 \pm 0,12$ cm; $19,43 \pm 0,61$ g; média \pm EP) e juvenis de *H. malabaricus* ($n = 64$; $18,78 \pm 0,64$ cm; $97,80 \pm 10,26$ g; média \pm EP) foram adquiridos de pisciculturas da região (Paraná, Brasil). Os animais foram aclimados durante 10 dias em tanques de 500 L, contendo água limpa e desclorada, areação constante ($> 75\%$ de saturação), fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro, pH ($\sim 7,2$) e temperatura controlada (~ 25 °C). Durante o período de aclimação, exemplares de *A. altiparanae* foram alimentados com ração comercial (Pirá Mirim QS 1,7 mm, Guabi), a cada 24 h e de *H. malabaricus* com juvenis de *A. altiparanae* vivos, a cada 72 h. Para ambas as espécies, a alimentação foi suspensa 24 h antes do início dos experimentos.

2.2. Desenho experimental e amostragem

Após aclimação, cada espécie foi submetida, separadamente, a testes agudos (96 h) e semi-estáticos (renovação de 75% em 48 h). Foram feitos dois experimentos com réplicas independentes, cada uma com o seu respectivo controle, a fim de obter a quantidade de tecido necessária para todas as análises. No experimento 1 (EXP 1) os tecidos foram processados para análise da concentração de cobre e de metalotioneínas e no experimento 2 (EXP 2) foram analisados os demais biomarcadores.

Os peixes foram alocados em aquários individuais (40 L), contendo apenas água desclorada (CTR; $n = 8$) ou cobre nas concentrações nominais de: $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5; $n = 8$), $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 10; $n = 8$) e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 20; $n = 8$). As concentrações de cobre de 5 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ foram escolhidas por estarem próximas as dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para água doce (9 e $13 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu dissolvido – CONAMA 357/2005). Já a maior concentração testada ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) corresponde a uma concentração subletal para algumas espécies de peixes neotropicais em 96 h de exposição (Simonato et al., 2016; Braz-Mota et al., 2018). Os meios

experimentais foram preparados a partir de uma solução de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ que era adicionada aos aquários uma hora antes dos peixes. Durante todos os experimentos, dureza, temperatura, pH, oxigênio e condutividade se mantiveram constantes ($29,70 \pm 0,17 \text{ CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$; $22,58 \pm 0,09 \text{ }^\circ\text{C}$; $8,29 \pm 0,02 \text{ pH}$; $7,19 \pm 0,04 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$; $98,90 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$; média \pm EP) e não houve diferença para esses parâmetros entre os grupos experimentais.

Decorrido 96 h, os animais foram anestesiados em benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e tiveram o sangue retirado pela veia caudal. Em seguida, os animais foram mortos por secção medular para remoção das brânquias, fígado, trato gastrointestinal, rim, cérebro e músculo os quais foram armazenados a $-72 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das análises de biomarcadores. Estes procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 4547.2018.48).

2.3. Análise do cobre e do Na^+ na água

Amostras de água (15 ml) foram coletadas a cada 24 h, para análise da concentração do cobre total (não filtrada) e dissolvido (filtrada em poro $0,45 \text{ } \mu\text{m}$). Após a coleta, as amostras foram imediatamente acidificadas ($\text{HNO}_3 \text{ 1\%}$) e refrigeradas até a análise em espectrofotômetro de absorção atômica com atomizador de forno de grafite (Perkin Elmer, AAnalyst 700, EUA) em comparação com soluções padrão de referência (SpcoSol, Brazil), com limite de detecção de $0,014 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Além do cobre, a concentração de Na^+ foi mensurada nas amostras em fotômetro de chama (Digimed DM-62, Brasil).

2.4. Análise do cobre em tecidos

A determinação da concentração de cobre em brânquias, fígado, trato gastrointestinal, rim, cérebro e músculo seguiu o protocolo de Alves e Wood (2006). Os tecidos foram completamente secos a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, e posteriormente submetidos a digestão em ácido nítrico suprapuro (5N) por 48 h a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Após digestão, a concentração de cobre foi medida em espectrofotômetro de absorção atômica equipado com forno de grafite (Perkin Elmer, AAnalyst 700, EUA) em comparação com soluções padrão de referência (SpcoSol, Brazil).

2.5. Biomarcadores

2.5.1. Parâmetros fisiológicos

A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método colorimétrico com cianeto de metahemoglobina (kit comercial, Labtest Diagnóstica, Brasil) e leitura em

espectrofotômetro (540 nm). Para determinação do hematócrito, alíquotas de sangue foram adicionadas a microcapilares de vidro, centrifugadas (1200 g, 7 min) e lidas em um cartão padronizado. O número de células sanguíneas por mm^3 foi determinado em câmara de Neubauer sob microscopia de luz. O plasma foi obtido após centrifugação do sangue total (1870 g, 10 min) e congelado (-20°C). A glicose plasmática foi determinada pelo método da glicose oxidase com utilização de kit comercial (Doles Reagentes Ltda, Brasil). A concentração de Na^+ e K^+ no plasma foi mensurada em fotômetro de chama (Digimed DM-62, Brasil) e a concentração de Ca^{2+} em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer A700) com atomizador de chama. A concentração de Cl^- plasmático foi mensurada com uso de kit comercial (Labteste Diagnóstica, Brasil) a 470 nm.

Para análise da atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (NKA), H^+ -ATPase (HATP), Ca^{2+} -ATPase (CaATP) e anidrase carbônica (AC) amostras de brânquias foram homogeneizadas (1:5 m:v) em tampão SEID (Sacarose 150 mM, EDTA 10 mM, Imidazol 50 mM, deoxicolato de sódio 2,4 mM, pH 7,5). Os filamentos branquiais, centrifugados (10000 g, 20 min, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para a análise das atividades enzimáticas.

A análise da atividade das enzimas NKA e HATP foi realizada segundo protocolo estabelecido por Gibbs e Somero (1989) e adaptado para microplacas, em sobrenadante contendo 1 mg L^{-1} de proteína. As atividades enzimáticas foram mensuradas pelo declínio da absorbância, em virtude da quebra de ATP e consequente produção de ADP, nas amostras incubadas em meio de reação (ATP 1 mM, NADH 0,2 mM, piruvato quinase 3 U mL^{-1} , lactato desidrogenase 2 U mL^{-1} , frutose 1,6 difosfato 0,1 mM, fosfoenol-piruvato 2 mM, pH 9,0), contendo N-etilmaleimida (NEM - 2 mM, inibidor da HATP), ou ouabaína (2 mM, inibidor da NKA), ou, ainda, nenhum dos inibidores (atividade total das ATPases). A absorbância das amostras foi medida a cada minuto durante 15 minutos (340 nm – Victor3, PerkinElmer, USA). A atividade da NKA foi calculada pela diferença dos meios contendo ou não ouabaína, e da HATP, pela diferença dos meios com e sem NEM. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol ADP mg proteína}^{-1}\text{ h}^{-1}$.

A atividade enzimática da CaATP foi mensurada segundo método proposto por Vijayavel et al. (2007) com modificações. As amostras foram incubadas em solução reativa ($\text{NaCl } 189\text{ mM}$, $\text{MgCl}_2\text{ } 5\text{ mM}$, Tris 20 mM, $\text{CaCl}_2\text{ } 5\text{ mM}$, ouabaína 2 mM, pH 7,6) sem ATP, para a determinação da concentração de fosfato inorgânico basal (Pi), e com ATP (3 mM). A atividade da CaATP foi determinada pela diferença de absorbância entre as amostras com ATP e sem ATP, decorrente da liberação de Pi, em presença de solução de coloração descrita por Ames

(1966). As leituras foram realizadas em leitora de microplacas (ELX 800, Bio-Tek Instruments) a 620 nm, sendo os valores expressos em $\mu\text{mol Pi mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

A atividade da AC foi determinada pela catálise de uma solução saturada de CO_2 com liberação de H^+ e consequente diminuição do pH segundo proposto por Vitale et al. (1999). Foram adicionados a um tampão base (manitol 225 mM, sacarose 75 mM, tris-base 10 mM, NaH_2PO_4 10 mM, pH 7,4) à amostra e água saturada com CO_2 . A atividade catalítica da enzima foi quantificada pelo decaimento do pH a cada 4 s durante 20 s, utilizando-se um pHmetro de bancada (Jenway 3510, EUA). A inclinação da reta gerada pela queda do pH ao longo do tempo forneceu a taxa de reação catalisada (TRC). A taxa de reação não catalisada (TRNC) foi obtida pela leitura do pH na ausência de amostra. A atividade da anidrase carbônica (UAC) foi calculada pela fórmula: $[(\text{TRC}/\text{TRNC})^{-1}]/[\text{proteína}]$ da amostra⁻¹. Os resultados foram expressos em UAC $\text{mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

A concentração de glicogênio muscular foi determinada pelo método descrito por Bidinotto et al. (1998) no qual as amostras foram incubadas em KOH (6N), por 5 min a 100 °C. Após dissolução do tecido, etanol e K_2SO_4 (10%) foram adicionados para hidrólise e precipitação do glicogênio. As amostras foram centrifugadas (850 g; 3 min) e o pellet foi ressuspendido em água destilada. O extrato aquoso final foi analisado quanto ao seu teor de açúcares redutores totais pelo método hidrolítico ácido de Dubois et al. (1956), onde fenol (4,1%) e ácido sulfúrico concentrado foram adicionados e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 480 nm (Libra S32, Biochrom, Reino Unido). O conteúdo de glicogênio foi expresso em $\mu\text{mol de glicosil glicose g de tecido}^{-1}$.

2.5.2. Parâmetros bioquímicos – Defesas antioxidantes e danos oxidativos

Brânquias e fígado foram homogeneizados (brânquias 1:5 m:v; fígado 1:10 m:v) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0) e centrifugados (16000 g, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona S-transferase (GST), além da quantificação de lipoperoxidação (LPO) e de proteínas carboniladas (PCO). A concentração de glutatona (GSH) foi avaliada apenas no fígado.

A atividade da Cu-Zn-SOD foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido em espectrofotômetro, a 550 nm e 25 °C, assim como proposto por McCord e Fridovich (1969). A atividade da enzima foi expressa em U de SOD $\text{mg de proteína}^{-1}$, sendo que U representa a quantidade de SOD capaz de promover a inibição

de 50% da taxa de redução do citocromo c. A atividade da CAT foi determinada pelo monitoramento do decaimento da absorbância (240 nm) ao longo do tempo, em razão da decomposição do H₂O₂ (Beutler, 1975). A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$ degradado $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$. A atividade da GPx foi estimada indiretamente através da oxidação do NADPH pela glutatona redutase (GR) em presença de glutatona reduzida (GSH) e H₂O₂. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 340 nm segundo o método de Hopkins e Tudhope (1973). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de NADPH min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$. A atividade da GST foi determinada pelo monitoramento da complexação da GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em espectrofotômetro (340 nm), de acordo com o método descrito por Keen et al. (1976). A atividade da enzima foi expressa em $\text{nmol de CDNB conjugado min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

A LPO foi avaliada pela medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em espectrofotômetro de fluorescência (ex/em: 535/590 nm) e o cálculo da concentração foi realizado com base em uma curva de malondialdeído (MDA) (Camejo et al., 1998). A concentração de TBARS foi expressa em $\text{nmol de MDA mg proteína}^{-1}$.

As PCO foram quantificadas a partir da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e consequente formação de dinitrofenil hidrazonas (Levine et al., 1994). O conteúdo de carbonil foi determinado em espectrofotômetro a 360 nm e expresso em $\text{nmol de carbonil mg de proteína}^{-1}$.

A concentração de 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), após tratamento ácido. O tiolato (TNP) formado em decorrência dessa reação foi quantificado em espectrofotometria (412 nm). A concentração foi determinada com base em uma curva padrão de GSH e expressa em $\mu\text{g GSH mg proteína}^{-1}$.

2.5.3. *Proteínas semelhantes a metalotioneínas*

O conteúdo de proteínas semelhantes as metalotioneínas (MT) foi determinado no fígado segundo protocolo proposto por Viarengo et al. (1997) com modificações. Após homogeneização (1:3 – m:v) e centrifugação (18650 g; 45 min, 4 °C), foi adicionado ao sobrenadante etanol e clorofórmio a fim de obter uma fração parcialmente purificada de metalotioneína. Nessa fração grupamentos sulfidrilas (-SH) foram quantificados em espectrofotômetro (412 nm), utilizando-se reagente de Elman's. Com base em uma curva

padrão de GSH, o conteúdo de proteínas semelhantes a metalotioneína foi expresso em nmol de GSH mg proteína⁻¹.

2.5.4. Genotoxicidade

O ensaio do cometa em eritrócitos foi realizado segundo proposto por Singh et al. (1988). Uma alíquota de sangue fresco foi adicionada em soro bovino fetal (1:100) e armazenada a 4° C. Esta suspensão celular foi misturada com agarose de baixo ponto de fusão (0,8%), adicionada a uma lâmina previamente coberta com agarose de ponto normal de fusão (1%), coberta com lamínula e mantida sob refrigeração (4 °C) por 50 min. As lâminas foram então colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% de lauril sarcosinato de sódio, 10% de DMSO, 1% Triton X-100, pH 10,0) por 2 h, a 4 °C, no escuro. Em seguida, foram mantidas por 30 minutos em tampão de eletroforese (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) a 4 °C, no escuro, para a desnaturação do DNA e então submetidas a etapa de eletroforese (20 min, 300 mA, 25 V, 1V cm⁻¹). As lâminas foram neutralizadas em tampão (0,4 M Tris, pH 7,5) por 3 vezes a cada 5 min e fixadas em etanol por 10 min. Após coloração com gelRed as lâminas foram avaliadas (teste cego) em microscópio de fluorescência (Leica DM2500) com aumento de 400x. Os danos no DNA foram quantificados em 100 nucleoides selecionados aleatoriamente e não sobrepostos. O comprimento da calda formado pela migração de DNA danificado foi visualmente classificado em quatro classes: classe 0 – ausência de calda; classe 1 – calda menor que o diâmetro do nucleoide; classe 2 – calda maior que o diâmetro do nucleoide e classe 3 – calda duas vezes maior que o diâmetro do nucleoide. O escore de danos no DNA foi calculado pela multiplicação do número de nucleoides em cada classe pelo valor da classe de danos (0 a 3) podendo, dessa forma, variar de 0 (todos nucleoides sem danos) a 300 (todos os nucleoides com danos máximos).

2.5.5. Atividade da acetilcolinesterase

Músculo e cérebro foram homogeneizados (1:10 – m:v) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5) e centrifugados (16000 g, 20 min, 4 °C) para a determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE). Iodeto de acetilcolina (75 mM) foi utilizado como substrato e ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (5 mM) como reagente de cor (Ellman et al. 1961). A atividade foi determinada a 415 nm e os resultados foram expressos em nmol min⁻¹ mg proteína⁻¹.

2.5.6. Determinação de proteínas nos tecidos

Todos os parâmetros bioquímicos e os parâmetros fisiológicos avaliados em brânquias, fígado, cérebro e músculo (exceto glicogênio) 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.

2.6. Análises estatísticas

Após checagem dos dados para as premissas de normalidade (Shapiro Wilk) e homocedasticidade (Levene's) os valores médios de cada parâmetro, para cada órgão, foram comparados entre os quatro grupos (CTR, Cu 5, Cu 10 e Cu 20) de cada espécie, por meio de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguidos pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) ou Dunn's, respectivamente, quando necessário. A comparação das concentrações médias de Na^+ na água, entre os tempos inicial (0 h) e final (96 h) do experimento, foi feita por meio do teste paramétrico t de Student, ou não paramétrico, U de Mann-Whitney. Para todos os testes, foram consideradas significativas diferenças com valor de $p < 0,05$. Os resultados apresentados nos gráficos e tabelas representam média \pm EP.

3. Resultados

3.1. Cobre e Na^+ na água

As concentrações de cobre total na água desviaram de 3,1% a 22,9% dos valores nominais, sendo as maiores variações encontradas para os grupos Cu 20. Apesar disso, nos experimentos com ambas as espécies, houve um gradiente de concentração entre os grupos experimentais ($\text{Cu 20} > \text{Cu 10} > \text{Cu 5} > \text{CTR}$) (Tabela 2.1). Os valores de cobre total e cobre dissolvido ficaram próximos (Tabela 2.1), sendo que as concentrações de cobre dissolvido corresponderam a aproximadamente 82% do cobre total. Além disso, quando comparados os valores de cobre dissolvido entre as espécies, as concentrações foram semelhantes (Tabela 2.1). Para simplificar, na sequência, as concentrações de cobre serão referidas pelos valores das concentrações nominais.

As concentrações não foram letais para *H. malabaricus*. No entanto, houve 25% de mortalidade para *A. altiparanae* exposta a maior concentração de cobre (Cu 20).

Tabela 2.1. Concentração de cobre total (Cu T) e dissolvido (Cu D) (média \pm EP; n = 62-92) na água do grupo controle (CTR) e dos grupos expostos às concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20) para as duas espécies estudadas.

	CTR		Cu 5		Cu 10		Cu 20	
	Cu T	Cu D	Cu T	Cu D	Cu T	Cu D	Cu T	Cu D
<i>Astyanax altiparanae</i>	2,11 $\pm 0,09$	1,71 $\pm 0,05$	5,22 $\pm 0,11$	4,25 $\pm 0,12$	8,76 $\pm 0,21$	7,24 $\pm 0,22$	15,92 $\pm 0,37$	13,66 $\pm 0,30$
<i>Hoplias malabaricus</i>	1,76 $\pm 0,09$	1,34 $\pm 0,08$	5,58 $\pm 0,09$	4,86 $\pm 0,09$	9,69 $\pm 0,14$	7,49 $\pm 0,16$	15,42 $\pm 0,22$	12,71 $\pm 0,27$

Limite de detecção = 0,014 $\mu\text{g L}^{-1}$

Quando comparados os tempos inicial (0 h) e final do experimento (96 h), foi verificado um aumento de Na^+ na água dos aquários dos grupos experimentais Cu 10 (*A. altiparanae*: $p < 0,001$; $t = 8,90$ e *H. malabaricus*: $p = 0,017$; $t = 3,27$) e Cu 20 (*A. altiparanae*: $p = 0,004$; $U = 0$ e *H. malabaricus*: $p = 0,004$; $t = 4,58$) das duas espécies (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Concentração de sódio (Na^+) (média \pm EP; n = 4-8) mensuradas na água do grupo controle (CTR) e dos grupos expostos às concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20) para as duas espécies estudadas. O * indica diferença entre os tempos inicial (0 h) e final (96 h) ($p < 0,05$).

		Na^+ (mM)			
		CTR	Cu 5	Cu 10	Cu 20
<i>Astyanax altiparanae</i>	t=0h	0,092 $\pm 0,003$	0,090 $\pm 0,002$	0,087 $\pm 0,001$	0,089 $\pm 0,001$
	t=96h	0,092 $\pm 0,001$	0,094 $\pm 0,001$	0,098 $\pm 0,001$	* 0,102 $\pm 0,001$ *
<i>Hoplias malabaricus</i>	t=0h	0,104	0,104	0,105 $\pm 0,001$	0,107 $\pm 0,001$
	t=96h	0,105 $\pm 0,001$	0,109	0,111 $\pm 0,001$	* 0,115 $\pm 0,001$ *

3.2. Parâmetros fisiológicos

Os parâmetros hematológicos de *A. altiparanae* e *H. malabaricus* expostas ao cobre não variaram significativamente dentre os grupos testados (Tabela 2.3). No entanto, ambas as espécies apresentaram desequilíbrio iônico após exposição ao Cu (Fig. 2.1). Houve uma diminuição do Na^+ plasmático de *A. altiparanae* nas três concentrações de cobre testadas ($p < 0,001$; $F = 9,42$) (Fig. 2.1A) e uma diminuição de Cl⁻ no grupo Cu 20 ($p = 0,006$; 12,39) (Fig.

2.1C), ao passo que *H. malabaricus* apresentou uma hipocalcemia quando exposta ao cobre ($p < 0,001$; $F = 36,80$) (Fig. 2.1D). Não houve alteração na concentração de K^+ plasmático para ambas as espécies (Fig. 2.1B).

Tabela 2.3. Parâmetros hematológicos (média \pm EP; $n = 6-8$): Concentração de hemoglobina (Hb), porcentagem de células sanguíneas (hematócrito (Hct) e número de células vermelhas (RBC) em *A. altiparanae* e *H. malabaricus* mantidas por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostas ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20).

		Hb (g dL ⁻¹)	Hct (%)	RBC (*10 ⁶ células mm ⁻³)
<i>Astyanax altiparanae</i>	CTR	7,35 \pm 0,37	31,86 \pm 1,92	2,08 \pm 0,19
	Cu 5	7,79 \pm 0,50	27,86 \pm 1,24	2,19 \pm 0,17
	Cu 10	7,95 \pm 0,40	29,75 \pm 1,44	1,82 \pm 0,05
	Cu 20	7,25 \pm 0,32	30,5 \pm 1,91	1,70 \pm 0,09
<i>Hoplias malabaricus</i>	CTR	13,11 \pm 1,73	31,00 \pm 1,76	2,12 \pm 0,11
	Cu 5	13,46 \pm 0,92	33,25 \pm 1,36	2,59 \pm 0,03
	Cu 10	11,76 \pm 0,53	29,25 \pm 1,88	2,72 \pm 0,21
	Cu 20	12,80 \pm 0,94	27,86 \pm 2,00	2,63 \pm 0,18

A espécie *A. altiparanae* não mostrou alterações das ATPases branquiais quando exposta ao cobre (Figs. 2.2A, 2.2B e 2.2C), ao passo que *H. malabaricus* mostrou um aumento da NKA branquial quando exposta ao Cu 20 ($p = 0,03$; $F = 3,43$) (Fig. 2.2A), da CaATP nos grupos expostos ao Cu 10 e ao Cu 20 ($p = 0,013$; $F = 4,32$) (Fig. 2.2B) e da HATP em todas as concentrações de cobre avaliadas ($p < 0,001$; $F = 15,51$) (Fig. 2.2C). Não houve diferença na atividade da AC nas brânquias das duas espécies (Fig. 2.2D).

Ambas as espécies mostraram um aumento da glicose plasmática quando expostas ao Cu 20 (*A. altiparanae*: $p < 0,001$; $F = 9,06$ e *H. malabaricus*: $p < 0,001$; $F = 42,86$) (Fig. 2.3A). No entanto, nessa mesma concentração de cobre *A. altiparanae* mostrou diminuição do glicogênio muscular ($p = 0,021$; $F = 3,92$) enquanto *H. malabaricus* mostrou um aumento dessa molécula ($p = 0,001$; $H = 16,35$) (Fig. 2.3B).

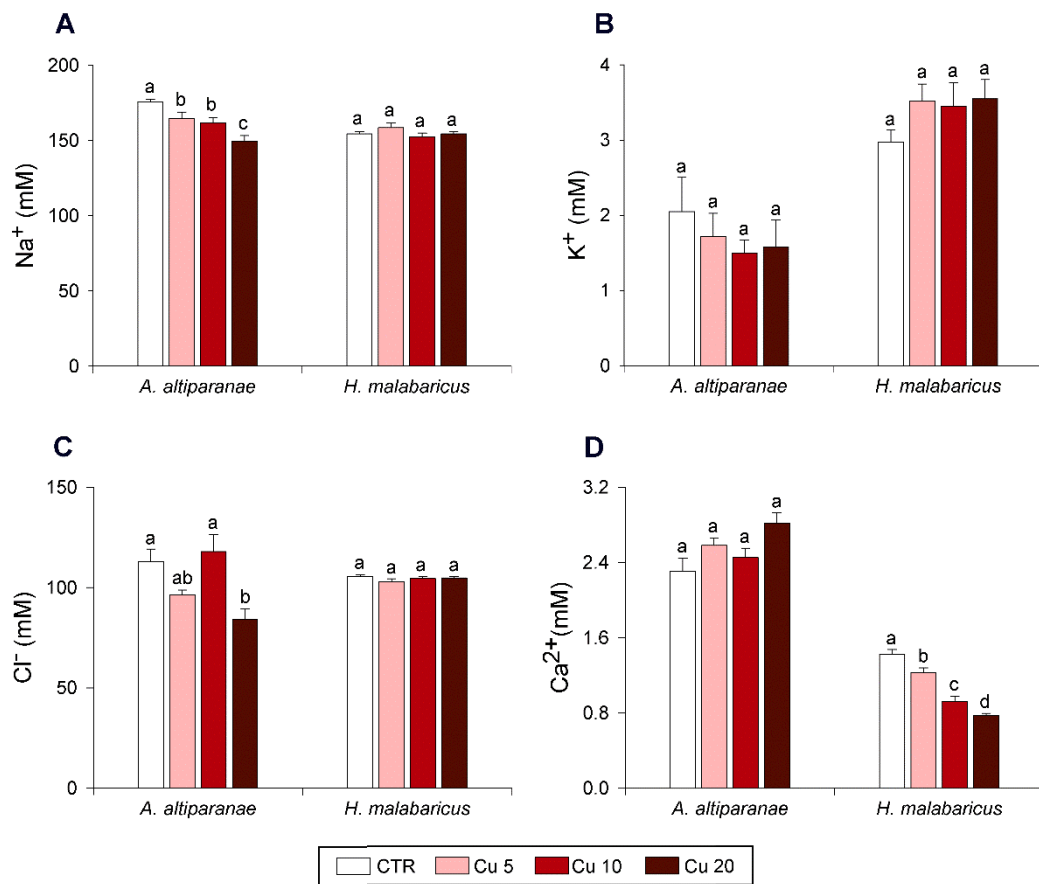


Figura 2.1. Concentração de Na⁺ (A) K⁺ (B) Cl⁻ (C) e Ca²⁺ (D) no plasma de *A. altiparanae* e *H. malabaricus* mantidas por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostas ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 µg L⁻¹ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média ± EP (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos da mesma espécie (p < 0,05).

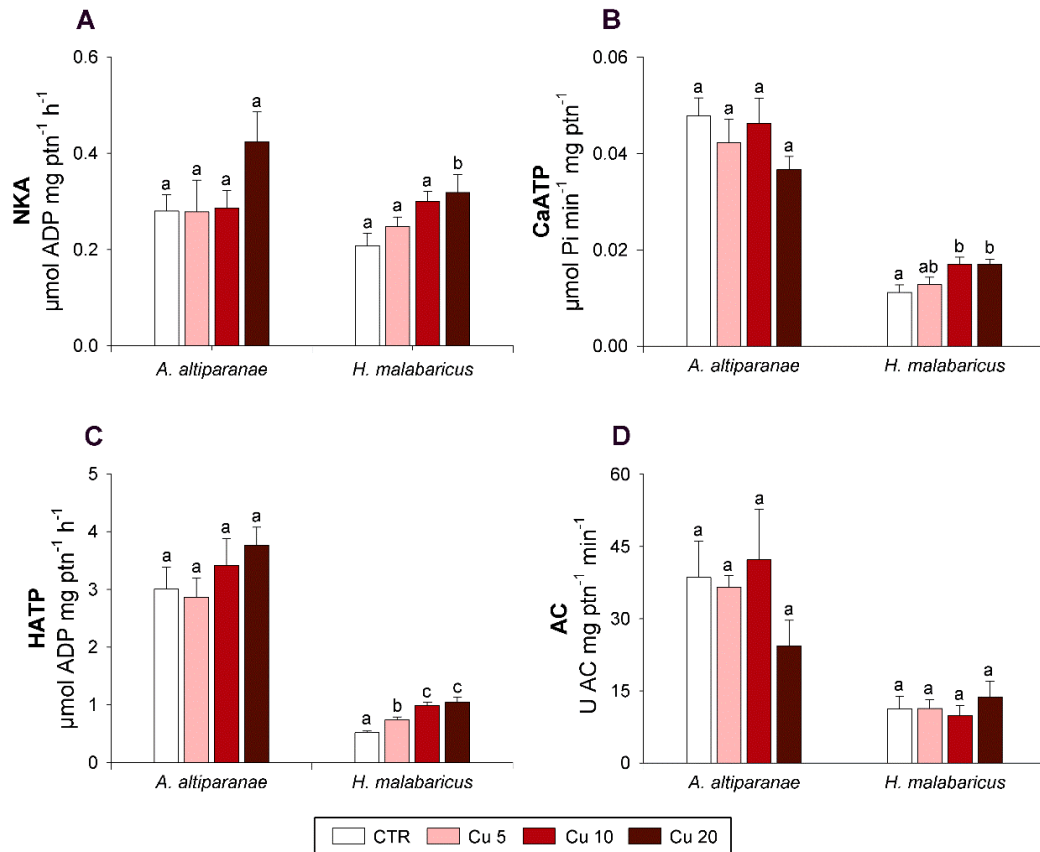


Figura 2.2. Atividade das enzimas Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) (A) Ca²⁺-ATPase (CaATP) (B) H⁺-ATPase (HATP) (C) e anidrase carbônica (AC) (D) em brânquias de *A. altiparanae* e *H. malabaricus* mantidas por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostas ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 µg L⁻¹ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os gráficos representam média ± EP (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos da mesma espécie (p < 0,05).

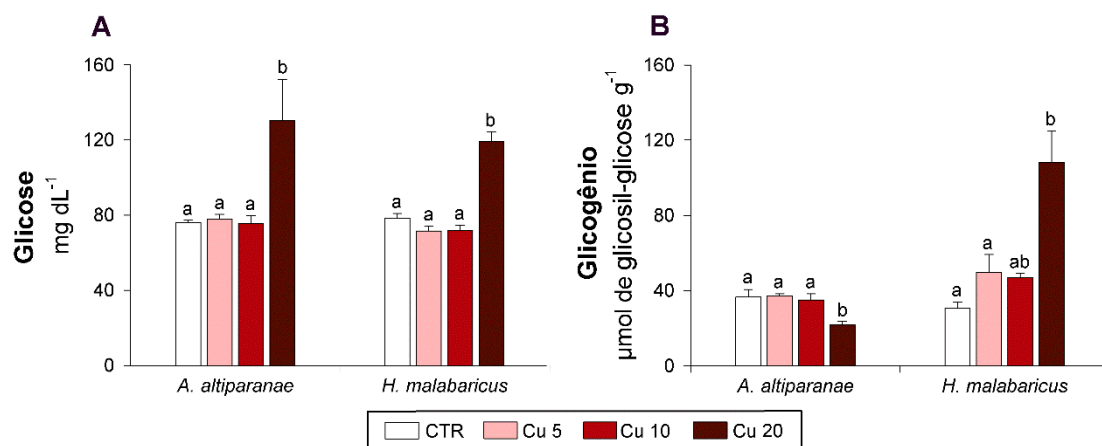


Figura 2.3. Concentração de glicose plasmática (A) e glicogênio muscular (B) em *A. altiparanae* e *H. malabaricus* mantidas por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostas ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 µg L⁻¹ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média ± EP (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos da mesma espécie (p < 0,05).

3.3. Concentração de cobre nos tecidos

Quando comparado ao grupo CTR, não houve aumento da concentração de cobre em nenhum dos tecidos avaliados na espécie *H. malabaricus* (Fig. 2.4B). Já *A. altiparanae* mostrou aumento da concentração deste metal nas brânquias dos peixes expostos a todas as concentrações de cobre avaliadas ($p < 0,001$; $F = 10,77$), além de um aumento significativo no fígado ($p < 0,001$; $F = 7,96$) e no trato gastrointestinal ($p = 0,02$; $F = 3,95$) no grupo Cu 20 (Fig. 2.4A).

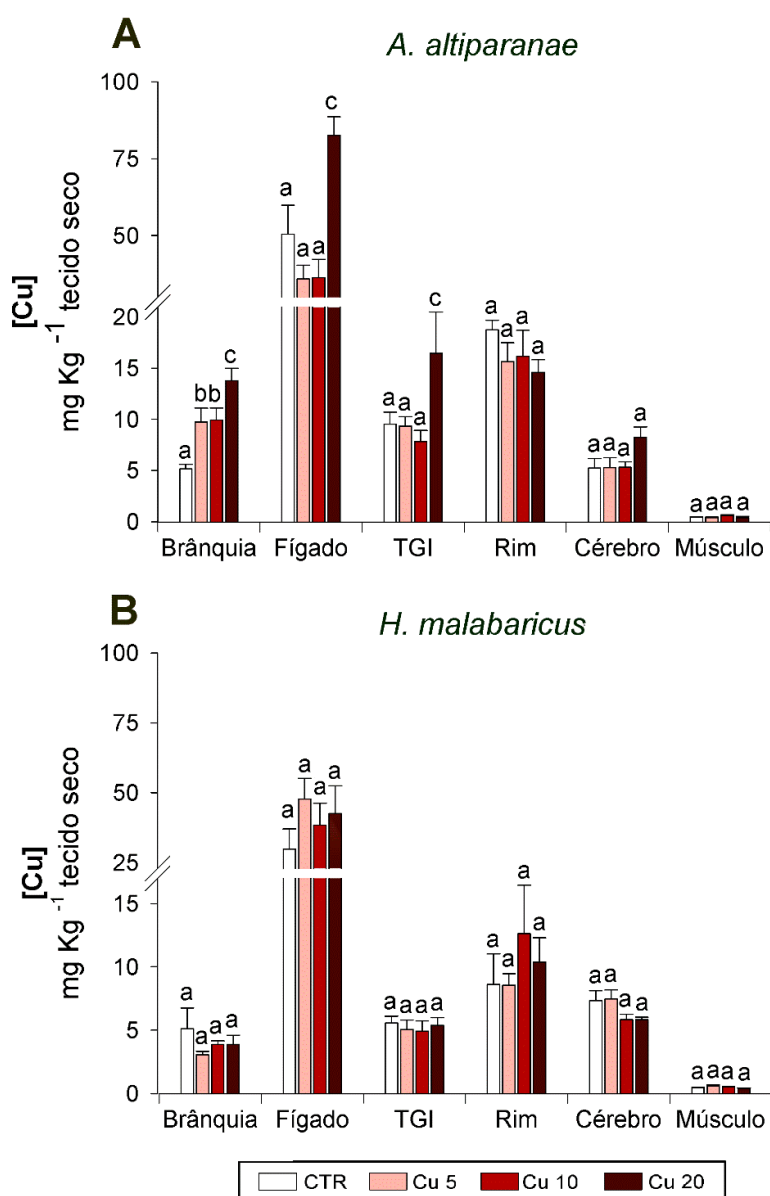


Figura 2.4 - Concentração de cobre em brânquias, fígado, trato gastrointesntinal (TGI), rim, cérebro e músculo de *A. altiparanae* (A) e *H. malabaricus* (B) mantidas por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostas ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média \pm EP. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos da mesma espécie ($p < 0,05$).

3.4. Defesas antioxidantes

Para as duas espécies, não houve diferença na concentração de GSH no fígado dos animais expostos ao cobre em relação ao grupo CTR. No entanto, vale destacar uma tendência de diminuição desse tripeptídeo no fígado dos peixes expostos ao metal em *A. altiparanae* ($p = 0,08$; $F = 2,47$) (Fig. 2.5A). A concentração de proteínas semelhantes a metalotioneínas se mostrou maior que o dobro do CTR no fígado de *A. altiparanae* dos grupos Cu 10 e Cu 20 ($p < 0,001$; $F = 22,10$) enquanto em *H. malabaricus* não houve alteração (Fig. 2.5B).

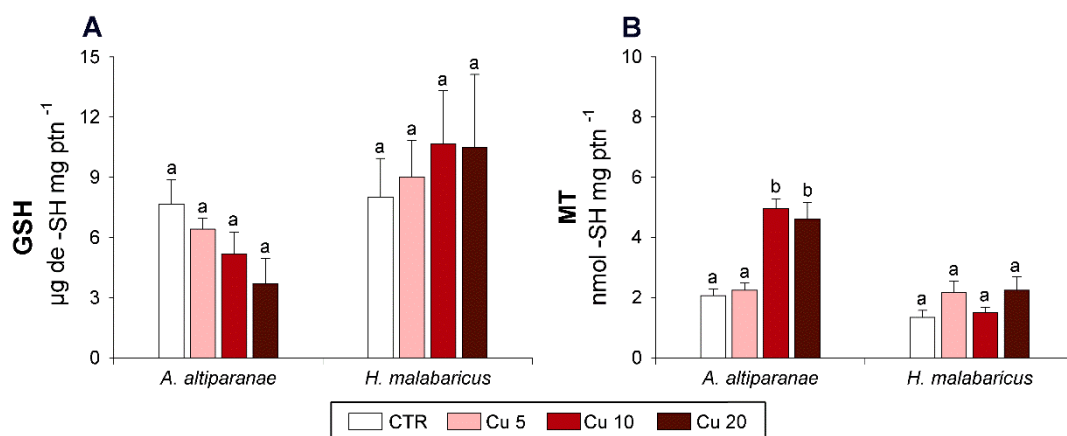


Figura 2.5 – Concentração de glutatona (GSH) (A) e proteínas semelhantes a metalotioneína (MT) (B) em fígado de *A. altiparanae* e *H. malabaricus* mantidas por 96 h em água desclorada (CTR), ou expostas ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média \pm EP. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos da mesma espécie ($p < 0,05$).

Foram observadas apenas alterações pontuais na atividade das enzimas antioxidantes: houve uma diminuição na atividade da CAT no fígado de *A. altiparanae* exposto ao Cu 10 ($p = 0,003$; $F = 6,00$) (Fig. 2.6D) e uma diminuição na CAT ($p = 0,013$; $F = 4,31$) e GPx ($p = 0,006$; $F = 5,00$) nas brânquias de *H. malabaricus* do grupo Cu 20 quando comparadas ao grupo CTR (Fig. 2.6C e 2.6E). Por outro lado, em *H. malabaricus*, houve um aumento da SOD branquial no grupo Cu 5 em comparação com o grupo CTR ($p = 0,008$; $H = 11,73$) (Fig. 2.6A). Não houve alteração na atividade da GST na brânquia e no fígado de ambas as espécies (Fig. 2.6G e 2.6H).

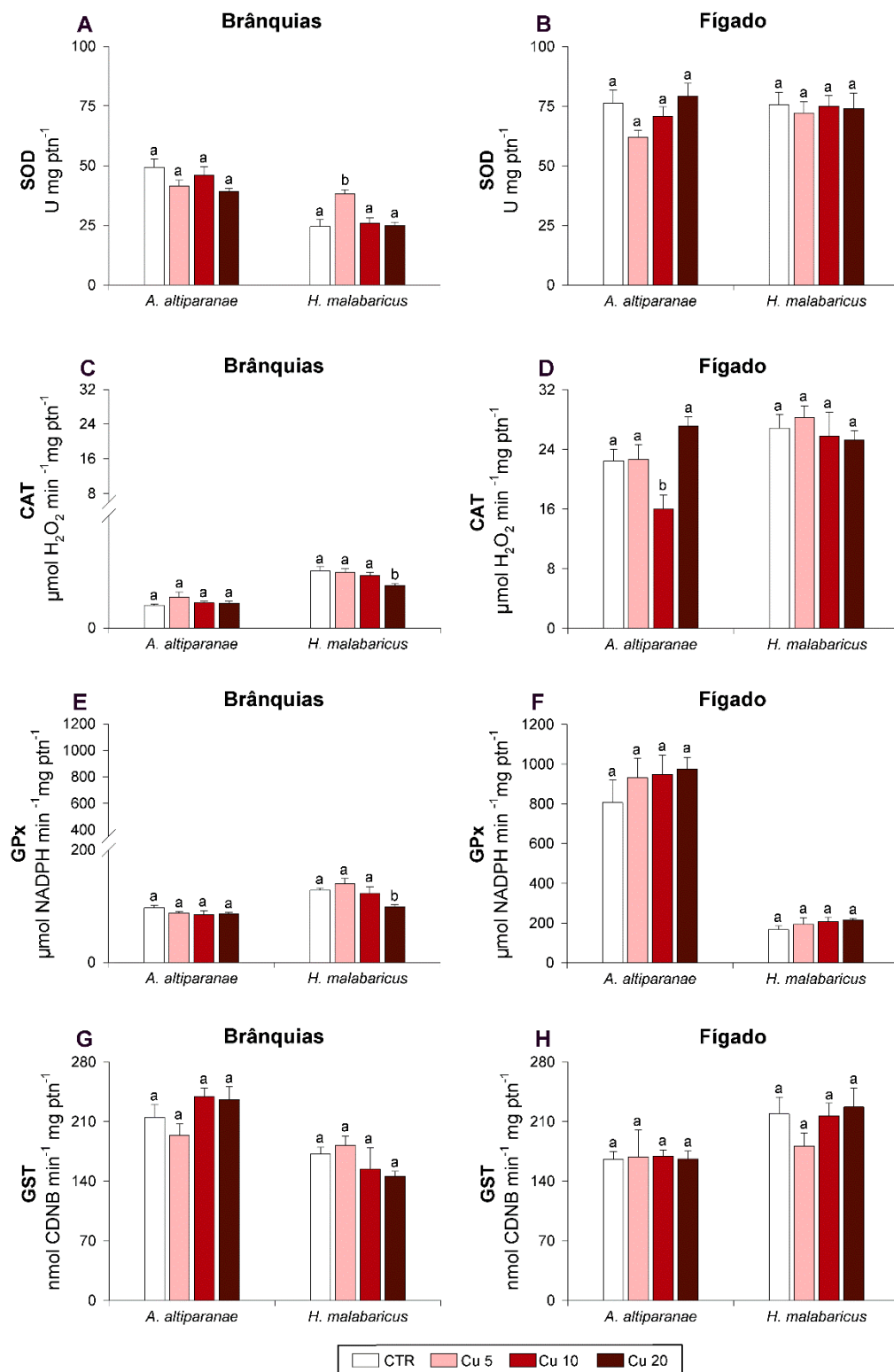


Figura 2.6. Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (A;B), catalase (CAT) (C;D), glutatona peroxidase (GPx) (E;F) e glutatona S-transferase (GST) (G;H) em brânquias e fígado de *A. altiparanae* e *H. malabaricus* mantidas por 96 h em água desclorada (CTR), ou expostas ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 μg L⁻¹ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média ± EP. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos da mesma espécie (p < 0,05).

3.5. Danos oxidativos

Foi observada uma diminuição da LPO ($p = 0,022$; $F = 3,84$) e da PCO ($p = 0,015$; $F = 4,55$) nas brânquias do grupo Cu 20 de *A. altiparanae* (Fig. 2.7A e 2.7C) e um aumento da LPO no fígado de *A. altiparanae* ($p = 0,025$; $F = 3,77$) (Fig. 2.7B) bem como do escore de danos nos eritrócitos dessa espécie quando exposta a maior concentração de cobre ($p = 0,016$; $H = 10,27$) (Fig. 2.7C). Por outro lado, *H. malabaricus* não mostrou dano oxidativo em nenhuma das biomoléculas avaliadas (Fig. 2.7)

3.6. Atividade da AChE

O cobre não afetou a atividade da enzima AChE de ambas as espécies avaliadas, tanto no músculo, quanto no cérebro (Fig. 2.8).

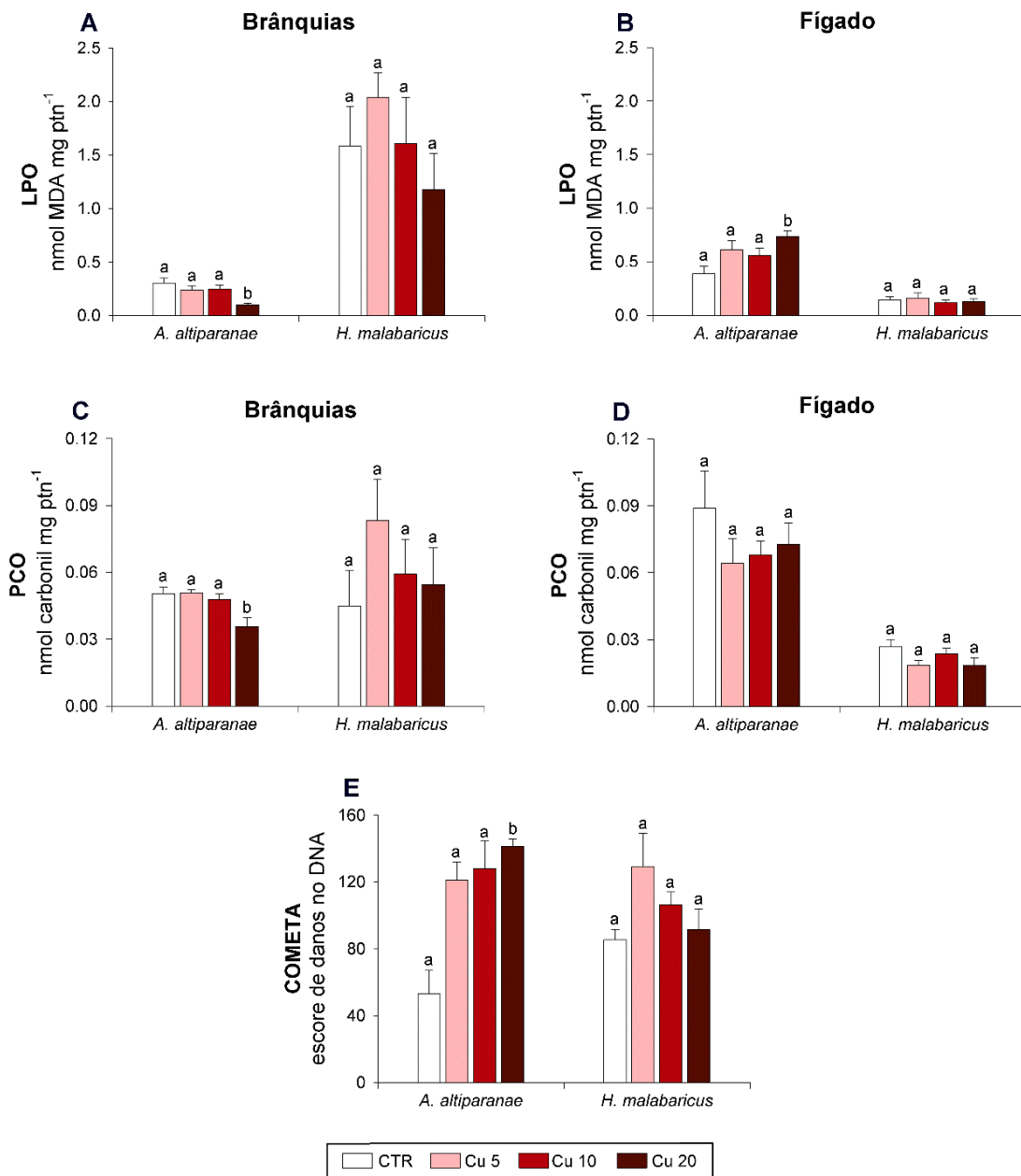


Figura 2.7. Danos oxidativos em biomoléculas: lipoperoxidação (LPO) em brânquia (A) e fígado (B), proteínas carboniladas (PCO) em brânquia (C) e fígado (D) e danos no DNA (Cometa) em eritrócitos (E) de *A. altiparanae* e *H. malabaricus* mantidas por 96 h em água desclorada (CTR), ou expostas ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média \pm EP. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos da mesma espécie ($p < 0,05$).

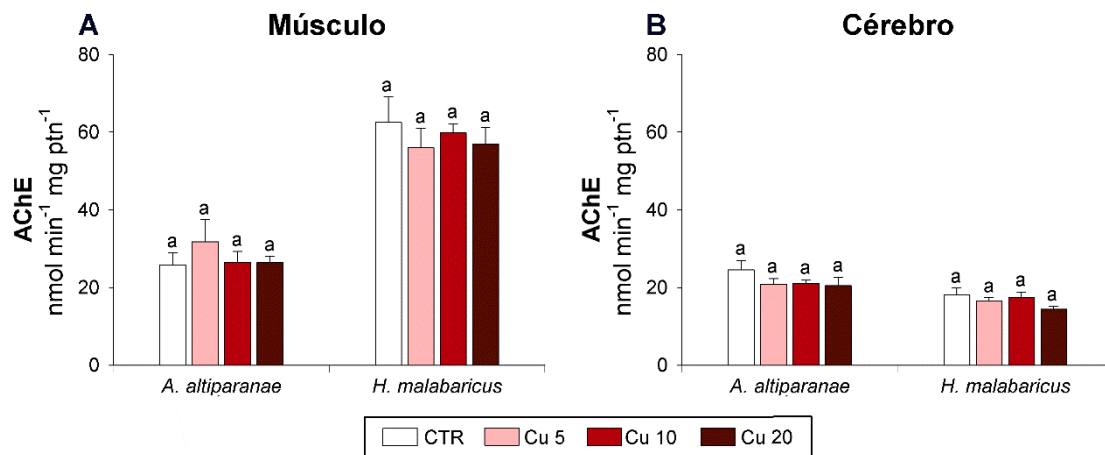


Figura 2.8. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em músculo (A) e cérebro (B), de *A. altiparanae* e *H. malabaricus* mantidas por 96 h em água desclorada (CTR), ou expostas ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média \pm EP. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

4. Discussão

No presente estudo, *A. altiparanae* apresentou maior sensibilidade ao cobre que *H. malabaricus* confirmando nossa hipótese. Em *H. malabaricus* foi observado apenas distúrbios osmo-iônicos e aumento da glicemia, não havendo aumento da concentração de cobre nos tecidos e tampouco estresse oxidativo. Por outro lado, *A. altiparanae* parece ter perdido a capacidade osmorregulatória e além das alterações fisiológicas, a concentração de cobre aumentou em diferentes órgãos, as defesas antioxidantes parecem não ter sido suficientes para combater as espécies reativas de oxigênio, ocasionando dano oxidativo e, até mesmo, morte dos animais (25%) na maior concentração de cobre testada (Cu 20).

4.1. Efeitos nas concentrações iônicas

Exposições agudas ao cobre podem levar a letalidade em peixes de água doce, sendo o principal mecanismo de ação distúrbios osmorregulatórios, principalmente quando ocasionam a hiponatremia (Grosell et al., 2002). O cobre iônico pode mimetizar o Na^+ e competir por canais de entrada na membrana apical das células de cloreto, prejudicando assim a tomada desse íon, sendo essa a principal causa da hiponatremia em peixes expostos a concentrações mais baixas do metal (*e.g.* 12,5 ppb e 50 ppb em *O. mykiss*) (Laurén e McDonald, 1985; Wood, 2012). No entanto, em concentrações mais elevadas de cobre (*e.g.* 100 ppb e 200 ppb em *O. mykiss*), o equilíbrio do Na^+ pode ser afetado tanto por esta competição nos canais apicais, quanto por um aumento da perda desse íon, uma vez que o cobre pode causar um deslocamento

do Ca^{2+} nas junções paracelulares aumentando, conseqüentemente, a permeabilidade branquial (Laurén e McDonald, 1985).

No presente estudo, a exposição ao cobre (Cu 10 e Cu 20) parece ter levado a um desequilíbrio do Na^+ nas duas espécies, como indicado pelo aumento desse íon na água ao final dos experimentos. No entanto, as respostas a esse desequilíbrio foram espécie-específicas. *Astyanax altiparanae* parece ter perdido a capacidade de osmorregulação, uma vez que foram observadas perdas iônicas e não foram observadas diferenças nas atividades das ATP-ases branquiais. A competição do cobre com o Na^+ nessa espécie resultou em hiponatremia em todas as concentrações de cobre avaliadas, sendo que os animais expostos a maior concentração do metal podem, ainda, ter apresentado um comprometimento estrutural das brânquias, uma vez que a redução paralela do Cl^- plasmático nos animais desse grupo indicam perda de Na^+ por via paracelular. Além disso, a diminuição mais acentuada da concentração de Na^+ nos animais do grupo Cu 20 não apenas em relação ao grupo controle, mas também quando comparada às outras concentrações de cobre avaliadas, corroboram essa ideia.

Por outro lado, *H. malabaricus* parece ter mantido a capacidade de regulação do Na^+ , uma vez que a ativação da NKA no grupo Cu 20 deve ter colaborado com a manutenção dos níveis desse íon no plasma. Além disso, o aumento da HATP branquial nessa espécie pode ter elevado o gradiente eletroquímico na membrana apical das células brânquias e favorecido a captação de Na^+ , visto que a entrada desses íons nas brânquias pode se dar por canais apicais sensíveis ao ácido (Dymowska et al., 2014) e, também, por trocadores Na^+/H^+ presentes na membrana apical das células de cloreto. Dessa forma, o aumento na atividade da HATP em conjunto com o aumento da NKA (Cu 20) em *H. malabaricus* deve ter garantido a manutenção do Na^+ plasmático.

O mecanismo de toxicidade do cobre em peixes de água doce inclui a inativação das ATPases branquiais (Chowdhury et al., 2016). No entanto, em controvérsia, no presente estudo, o aumento das três principais ATPases branquiais foi observada em *H. malabaricus* exposta ao cobre. Dessa forma, a concentração utilizada no presente trabalho para essa espécie parece não ter sido suficiente para causar a inativação dessas enzimas.

Em contraste com *A. altiparanae*, *H. malabaricus* apresentou uma hipocalcemia em todas as concentrações de cobre avaliadas, apesar do aumento da atividade da CaATP branquial nos grupos Cu10 e Cu20. A inibição da tomada de Ca^{2+} pelo cobre já foi relatada por Alsop e Wood (2011) em *Danio rerio* e, segundo os autores, não parece ser um mecanismo de toxicidade aguda desse metal, mas pode ser uma resposta fisiológica para redução do acúmulo do cobre e

proteção contra toxicidade crônica. O cálcio possui efeito protetor frente a toxicidade do cobre, podendo minimizar o desequilíbrio iônico de Na^+ causado por este metal e reduzir, dessa forma, o acúmulo de cobre nas brânquias ao competir por sítios de ligações envolvidos na toxicidade do cobre (Chowdhury et al., 2016). Dessa forma, a hipocalcemia observada em *H. malabaricus* pode ser resultado de uma diminuição da tomada de Ca^{2+} nos canais apicais das células branquiais em decorrência de uma competição com o cobre pelos mesmos sítios de ligação, prejudicando a entrada de Ca^{2+} nas brânquias e, conseqüentemente, contribuindo para que não houvesse acúmulo do metal neste órgão e tampouco nos demais tecidos avaliados.

4.2. Acúmulo de cobre nos tecidos

Os distúrbios iônicos observados em cada espécie estão diretamente relacionados ao aumento, ou não, da concentração de cobre nos tecidos. Enquanto a possível competição do Ca^{2+} com o cobre por sítios ativos nas brânquias parece ter protegido *H. malabaricus* do acúmulo de cobre em todos os tecidos avaliados, em *A. altiparanae* a provável competição com o Na^+ por canais de entrada resultou no aumento da concentração do cobre nas brânquias, além de acumular no fígado e, também, no trato gastrointestinal nos peixes do grupo Cu 20. Em exposições agudas ao cobre a brânquia é o órgão que mais acumula o metal. No entanto, o cobre também é capaz de acumular em outros tecidos (Grosell, 2012). Assim como em *A. altiparanae* (presente trabalho), em outro peixe Neotropical (*Prochilodus lineatus*) exposto ao cobre em condições de temperatura, pH e dureza semelhantes, houve acúmulo de cobre no fígado e no intestino, além do plasma e, segundo os autores esse metal teria sido levado a esses órgãos pelo sangue, o que foi evidenciado pelo aumento da concentração de cobre no plasma (Mazon e Fernandes, 1999). Além do sangue, o cobre pode ter chegado ao intestino pela bile, uma vez que a excreção pela vesícula biliar corresponde a uma importante via de eliminação deste metal (Grosell et al., 2001).

4.3. Glicose plasmática e glicogênio muscular

Nas duas espécies houve indicação de resposta de estresse, sugerida pelo aumento da glicose plasmática dos animais do grupo Cu 20. No entanto, nesta mesma concentração o glicogênio muscular em *A. altiparanae* diminuiu, enquanto em *H. malabaricus* aumentou, indicando respostas metabólicas espécie-específicas, a qual pode estar relacionada a biologia das espécies. *Hoplias malabaricus* é um predador de senta-espera e, portanto, um animal de hábito mais sedentário. Além disso, quando em privação de alimento, a traíra pode entrar em

estado hipometabólico preservando energia para tempos de melhores condições e esta mesma estratégia pode ter sido adotada frente a contaminação por Cu 20 (Rios et al., 2002). Por outro lado, *A. altiparanae* apresenta comportamento de cardume, deslocando-se pela coluna d'água grande parte do tempo. Assim, a exposição de *A. altiparanae* ao cobre pode ter levado a uma resposta comportamental de estresse e, conseqüente glicogenólise no músculo. Comportamento de “avoidance” ao cobre, evidenciado por padrão de natação instável com movimentos bruscos já foram relatados por Batool et al. (2014) no peixe *Channa marulius* exposto ao cobre. No peixe neotropical *P. lineatus* o cobre promoveu um comprometimento da capacidade natatória, diminuindo a velocidade e distância percorrida dos animais (Simonato et al., 2016). Apesar de testes comportamentais não terem sido realizados no presente estudo, foi observado que *A. altiparanae* na maior concentração apresentou natação irregular durante os experimentos, com abertura e fechamento da boca em frequência maior que dos organismos controle e movimentos bruscos.

4.4. Atividade da enzima AChE

Alguns metais podem interferir na atividade da AChE, sendo que estudos já reportaram inibição da atividade dessa enzima pelo cobre in vitro (Frasco et al., 2005) e in vivo, no músculo do peixe *P. lineatus* (Simonato et al., 2016). No entanto, no presente estudo, ambas as espécies não tiveram a atividade da AChE alterada, tanto em músculo quanto em cérebro, e tampouco aumento da concentração do metal nesses tecidos foi evidenciada. Assim, as alterações de comportamento observadas em *A. altiparanae* não podem ser atribuídas a alterações na AChE.

4.5. Defesas antioxidantes e danos

Espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser geradas naturalmente como produtos do metabolismo celular (Lushchak, 2011), todavia, em quantidades elevadas e devido ao seu alto potencial redox, o cobre pode levar a formação de ERO tanto em brânquias (Bopp et al., 2008) quanto em fígado (Braz-Mota et al., 2016) e ocasionar danos oxidativos nesses órgãos. No presente estudo, a exposição ao cobre resultou, nas duas espécies, em alterações pontuais na atividade das enzimas antioxidantes. Segundo Grosell (2012) as respostas antioxidantes enzimáticas podem flutuar em decorrência de um aumento da necessidade de transcrição da enzima induzido pela formação de ERO ou da ação inibitória do cobre nestas enzimas. Dessa forma, em 96 h não foi observado uma resposta consistente das defesas antioxidantes enzimáticas tanto em *A. altiparanae* quanto em *H. malabaricus*.

Por outro lado, as metalotioneínas podem ter sido a principal resposta antioxidante atuante em *A. altiparanae*, uma vez que nas duas maiores concentrações (Cu 10 e Cu 20) a produção dessa proteína mais que dobrou em relação ao grupo CTR. Quando o aumento de cobre nas células satura todos os sítios de ligação para este metal, novas moléculas, como as metalotioneínas, podem ser produzidas para se ligarem ao Cu em excesso. No entanto, quando o aumento de cobre ultrapassa a capacidade celular de se ligar a esses íons, o cobre pode catalisar a reação de Fenton formando radicais hidroxil como consequência (Lushchak, 2014). No presente estudo, o aumento de metalotioneínas em *A. altiparanae* deve não ter sido suficiente para combater o estresse oxidativo ocasionado pelo cobre em excesso, uma vez que, foi observado lipoperoxidação no fígado desta espécie do grupo Cu20.

A GSH é o principal antioxidante não enzimático da célula e pode atuar como linha primária de defesa capturando oxiradicais. Por outro lado, o Cu^{2+} pode oxidar a GSH e ser reduzido a Cu^+ , o qual pode formar $\text{HO}\cdot$ durante a decomposição do peróxido de hidrogênio via reação de Fenton, levando a produção de ERO (Lushchak, 2016). Para ambas as espécies a exposição ao Cu não resultou em alterações na GSH. No entanto, vale ressaltar uma tendência de diminuição no conteúdo de GSH em *A. altiparanae*, o qual pode ter ocorrido devido a ligação com Cu^{2+} , e essa reação pode estar envolvida com o aumento da lipoperoxidação no fígado nos peixes do grupo Cu20.

Além dos danos em lipídeos também foi observado em *A. altiparanae* expostos ao Cu aumento de danos no DNA de eritrócitos. O cobre pode levar a danos no DNA tanto interagindo diretamente com essa molécula (Alak et al., 2019; Govindaraju et al., 2013) quanto por elevar a produção de ERO. Assim, os danos no DNA em células sanguíneas em *A. altiparanae* pode ter ocorrido por ambas as vias. Esse resultado também corrobora a proposta de que o cobre teria sido levado pelo sangue ao fígado e ao intestino, ocasionando um aumento de concentração do metal nesses órgãos.

4.6. História de vida das espécies e a toxicidade do cobre

As diferentes respostas observadas podem estar ligadas a história de vida das espécies. Espécies que vivem em áreas que apresentam maiores perturbações (*e.g.* seca, alagamento, tempestades) podem responder ao longo do tempo desenvolvendo, devido a pressão de seleção, características morfológicas, fisiológicas e ou histórias de vida que minimizem os impactos desse distúrbio (Meffe, 1984). *Hoplias malabaricus* pode ser encontrada em ambientes Neotropicais de pressões ambientais severas como Pantanal e a região Amazônica, podendo

enfrentar hipóxia, mudanças bruscas de temperaturas, escassez de comida e persistir nesses locais (Rios et al., 2005). Já *A. altiparanae* é encontrado em um ambiente de pressões ambientais menores, a bacia do alto Paraná e corresponde a uma espécie de estratégia r (Orsi et al., 2004). Apresenta um ‘boom’ reprodutivo caracterizado por um grande aumento do número de juvenis, dos quais muitos não chegam a fase adulta devido a predação. Dessa forma, as espécies r estrategistas são caracterizadas por uma alta taxa de flutuabilidade na densidade populacional (Winemiller, 1989). No presente estudo, *H. malabaricus* apresentou melhor performance frente a toxicidade do cobre do que *A. altiparanae*, uma vez que não houve acúmulo do metal e estresse oxidativo nessa espécie. Dessa forma, a especificidade de resposta observada no presente estudo pode estar relacionada a história de vida das espécies.

4.7. Considerações finais

Shekh et al. (2019, 2020) demonstraram que a maior sensibilidade do esturjão branco (*Acipenser transmontanus*) em comparação com a espécie modelo truta arco-íris (*O. mykiss*) pode ser explicada por uma maior susceptibilidade na homeostase do Na⁺ e ao estresse oxidativo frente a exposição ao cobre. No presente estudo, a maior sensibilidade de *A. altiparanae* ao cobre também parece estar associada a esses fatores, aliado ao fato de que a espécie em comparação, *H. malabaricus*, conseguiu manter a homeostase deste íon e apresentar um importante mecanismo de proteção frente a toxicidade do cobre.

As concentrações avaliadas neste trabalho são ambientalmente relevantes para águas brasileiras e muito próximas as permitidas (9 e 13 µg L⁻¹) pela legislação do país (CONAMA, 357). Dessa forma, no que se refere a concentração de cobre na água, a legislação não se mostrou protetiva para as espécies estudadas. Além disso, no ambiente natural, os peixes podem ter como fonte de exposição tanto a água, quanto a alimentação. Assim, considerando a possível relação presa-predador de *A. altiparanae* e *H. malabaricus* estudos que investiguem a exposição trófica entre essas espécies podem ser importantes para a compreensão da toxicidade do cobre em peixes Neotropicais. O presente estudo colabora para a compreensão da especificidade de atributos fisiológicos e bioquímicos na sensibilidade da exposição aguda ao cobre em *A. altiparanae* e *H. malabaricus* e pode embasar trabalhos futuros que visem compreender os mecanismos de toxicidade envolvidos na contaminação trófica entre essas espécies.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de Financiamento 001, em associação com a Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná. O presente trabalho é parte da tese de doutorado de A. A. de Paula. CBR Martinez é pesquisadora do CNPQ (Processo 307947/2015-7).

Referências

- Alak, G., Parlak, V., Aslan, M.E., Ucar, A., Atamanalp, M., Turkez, H., 2019. Borax supplementation alleviates hematotoxicity and DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper. *Biological Trace Element Research*, 187, 536–542.
- Alsop, D., Wood, C.M., 2011. Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: common mechanisms across multiple metals. *Aquatic Toxicology*, 105, 385–393.
- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Assis, H.C.S., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 67, 82–88.
- Alves, L.C., Wood, C.M., 2006. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquatic toxicology*, 78, 217–232.
- Ames, B.N., 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods in enzymology*, 8, 115–118.
- Atli, G., Canli, M., 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney, and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology*, 20, 1861–1869.
- Batool, M., Abdullah, S., Javed, M., 2014. Behavioral Intoxication of *Channa marulius* and *Wallago attu* during acute exposure of Cadmium and Copper. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 12, 7–15.
- Bennemann, S.T., Shibatta, O., 2002. Dinâmica de uma assembléia de peixes do rio Tibagi. In: Medri, M., Bianchini, E., Shibatta, O., Pimenta, J. (Eds.). *A Bacia do rio Tibagi*. Londrina, PR: Eduel. pp. 433–442.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882–890.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Grune & Stratton, New York.
- Bidinotto, P.M., Moraes, G., Souza, R.H.S., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Bol. Téc. Cent. Pesqui. Treinamento Agric.* 10, 53–60.
- Bopp, S.K., Abicht, H.K., Knauer, K., 2008. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquatic Toxicology*, 86, 197–204.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

- Braz-Mota, S., Fé, L.M.L., Delunardo, F.A.C., Sadauskas-Henrique, H., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., 2016. Exposure to waterborne copper and high temperature induces the formation of reactive oxygen species and causes mortality in the Amazonian fish *Hoplosternun littorale*. *Hydrobiologia*, DOI:10.1007/s10750-016-2847-y
- Braz-Mota, S., Campos, D.F., MacCormack, T.J., Duarte, R.M., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., 2018. Mechanisms of toxic action of copper and copper nanoparticles in two Amazon fish species: Dwarf cichlid (*Apistogramma agassizii*) and cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*). *Science of the Total Environment*, 630, 1168–1180.
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M., 1998. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: *Free radical and antioxidant protocols*, pp. 377–387. Humana Press.
- Cerqueira, C.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.
- Chowdhury, M.J., Girgis, M., Wood, C.M., 2016. Revisiting the mechanisms of copper toxicity to rainbow trout: time course, influence of calcium, unidirectional Na⁺ fluxes, and branchial Na⁺, K⁺ ATPase and V-type H⁺ ATPase activities. *Aquatic Toxicology*, 177, 51–62.
- CONAMA 357. Resolução 357, 2005. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> (acesso 2018).
- Craig, P.M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2007. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293, 1882–1892.
- Duarte, R.M., Menezes, A.C.L., da Silveira Rodrigues, L., de Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., 2009. Copper sensitivity of wild ornamental fish of the Amazon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 693–698.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.T., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Dymowska, A.K., Schultz, A.G., Blair, S.D., Chamot, D., Goss, C.G., 2014. Acid-sensing ion channels are involved in epithelial Na⁺ uptake in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 307, 255–265.
- Ellman, G.L., Coutney, K.O., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
- Eyckmans, M., Celis, N., Horemans, N., Blust, R., De Boeck, G., 2011. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. *Aquatic Toxicology*, 103, 112–120.
- Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10, 360–375.
- Galvan, G.L., Lirola, J.R., Felisbino, K., Vicari, T., Yamamoto, C.I., Cestari, M.M., 2016. Genetic and Hematologic Endpoints in *Astyanax altiparanae* (Characidae) after exposure and recovery to water soluble fraction of gasoline (WSFG). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97, 63–70.
- Giacomin, M., Vilarinho, G.C., Castro, K.F., Ferreira, M., Duarte, R.M., Wood, C., Val, A.L., 2018. Physiological impacts and bioaccumulation of dietary Cu and Cd in a model teleost: The amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquatic Toxicology*, 1999, 30–45.
- Gibbs, A.L.L.E.N., Somero, G.N., 1989. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. *Journal of Experimental Biology*, 143, 475–492.

- Gopi, N., Vijayakumar, S., Thaya, R., Govindarajan, M., Alharbi, N.S., Kadaikunnan, S., Khaled, J.M., Al-Anbr, M.N., Vaseeharan, B., 2019. Chronic exposure of *Oreochromis niloticus* to sub-lethal copper concentrations: Effects on growth, antioxidant, non-enzymatic antioxidant, oxidative stress and non-specific immune responses. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 55, 170–179.
- Gomiero, L.M., Braga, F.M.S., 2003. O lambari *Astyanax altiparanae* (Characidae) pode ser um dispersor de sementes? *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 25, 353–360.
- Gosavi, S.M., Tapkir, S.D., Kumkar, P., Verma, C.R., Kharat, S.S. Act now before its too late: Copper exposure drives chemo-ecology of predator-prey dynamics of freshwater common spiny loach, *Lepidocephalichthys thermalis* (Valenciennes, 1846). *Environmental Research*, 186, 109509.
- Govindaraju, M., Shekar, H.S., Sateesha, S.B., Raju, P.V., Rao, K.S., Rao, K.S.J., Rajamma, A.J., 2013. Copper interactions with DNA of chromatin and its role in neurodegenerative disorders. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3, 354–359.
- Grosell, M., McGeer, J.C., Wood, C.M., 2001. Plasma copper clearance and biliary copper excretion are stimulated in copper-acclimated trout. *American Journal of Physiology*, 280, 796–806.
- Grosell, M., Nielsen, C., Bianchini, A., 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133, 287–303.
- Grosell, M., 2012. Copper. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.) *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals—Fish Physiology*. Elsevier, San Diego, CA, pp. 54–135.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Journal of Haematology*, 25, 563–575.
- Husak, V.V., Mosiichuk, N.M., Kubrak, O.I., Matviishyn, T.M., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I. Acute exposure to copper induces variable intensity of oxidative stress in goldfish tissues. *Fish Physiology and Biochemistry*. DOI:[10.1007/s10695-018-0473-5](https://doi.org/10.1007/s10695-018-0473-5)
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 251, 6183–6188.
- Kim, W., Park, J., Lim, E., Lee, S., Kim, J., Kim, S., Lee, S., Choi, K., Jung, J., 2014. Tissue-Specific antioxidant responses in pale chub (*Zacco platypus*) exposed to copper and benzo[a]pyrene. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92, 540–545.
- Kirici, M., Turk, C., Caglayan, C., Kirici, M., 2017. Toxic effects of copper sulphate pentahydrate on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of freshwater fish *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) tissues. *Applied Ecology and Environmental Research*, 3, 1685–1696.
- Laurén, D.J., McDonald, D. G. (1985). Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson – modulation by water hardness and pH. *Journal of Comparative Physiology - Part B*, 155, 635–644.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Methods in Enzymology*, 233, 346–357.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101, 13–30.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175.
- Lushchak, V.I., 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, 711–747.
- Mazon, A.F., Fernandes, M.N., 1999. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63, 797–804.

- Mazon, A.F., Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environmental Research Section A*, 88, 52–63.
- McCord, J.E., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049–6055.
- Monteiro, D.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2013. Dietary intake of inorganic mercury: bioaccumulation and oxidative stress parameters in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology*, 22, 446–456.
- Monteiro, D.A., Taylor, E.W., McKenzie, D. J., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2020. Interactive effects of Mercury exposure and hypoxia on ECG patterns in two Neotropical freshwater fish species: Matrinxã, *Brycon amazonicus* and traíra, *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology*, 29, 375–388.
- Meffe, G.K., 1984. Effects of abiotic disturbance on coexistence of predator-prey fish species. *Ecology*, 65, 1525–1534.
- Nunes, B., Caldeira, C., Pereira, J.L., Goncalves, F., Correia, A.T., 2015. Perturbations in ROS-related processes of the fish *Gambusia holbrooki* after acute and chronic exposures to the metals copper and cadmium. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 3756–3765.
- Orsi, M.L., Carvalho, E.D., Foresti, F., 2004. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21, 207–218.
- Pereira, B.V.R., Silva-Zacarin, E.C.M., Costa, M.J., Santos, A.C.A., Carmo, J.B., Nunes, B., 2019. Cholinesterases characterization of three tropical fish species, and their sensitivity towards specific contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173, 482–493.
- Rios, F.S., Kalinin, A.L., Rantin, F.T., 2002. The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Journal of Fish Biology* 61, 85–95.
- Rios, F.S., Oba, E.T., Fernandes, M.N., Kalinin, A.L., Rantin, F.T., 2005. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A*, 140, 281–287.
- Shekh, K., Alcaraz, A.J., Hecker, M., Niyogi, S., 2019. Sensitivity of white sturgeon and rainbow trout to waterborne copper exposure: a comparative study of copper induced disruption of sodium homeostasis. *Aquatic Toxicology*, 215, 105283.
- Shekh, K., Alcaraz, A.J., Niyogi, S., Hecker, M., 2020. Comparative analyses of oxidative stress and metallothionein induction in White sturgeon and rainbow trout during acute copper exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 231, 108723.
- Silva, S.V.S., Dias, A.H.C., Dutra, E.S., Pavanin, A.L., Morelli, S., Pereira, B.B., 2016. The impact of water pollution on fish species in southeast region of Goiás, Brazil. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 79, 8–16.
- Simonato, J.D., Mela, M., Doria, H.B., Guiloski, I.C., Randi, M.A.F., Carvalho, P.S.M., Meletti, 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.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184–191.
- USEPA, 2007 Aquatic Life Ambient Freshwater Quality Criteria — Copper, EPA-822-07-001, 2007 Revision US Environmental Protection Agency, Washington, DC

- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57–149.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, F., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Marine Environmental Research*, 44, 69–84.
- Vieira, C.E.D., Almeida, L.M.S., Galindo, B.A., Pereira, L., Martinez, C.B.R., 2014. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotropical Ichthyology*, 12, 153–164.
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Balasubramanian, M.P., 2007. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere*, 69, 979–986.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122, 121–129.
- Vutukuru, S.S., Suma, C.H., Madhavi, K.R., Pauleena, J.S., Rao, J.V., Anjaneyulu, Y., 2005. Studies on the development of potential biomarkers for rapid assessment of copper toxicity to freshwater fish using *Esomus danricus* as model. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2, 63–73.
- Wood, C.M., 2012. An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Academic Press/Elsevier, San Diego, CA. pp. 1–51.
- Winemiller, K.O., 1989. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. *Oecologia*, 89, 225–241.

Capítulo III

Efeitos do cobre em *Hoplias malabaricus* após exposição pela via trófica com dieta viva: uma abordagem de múltiplos biomarcadores

Angélica Alves de Paula, Wagner Ezequiel Risso, Claudia Bueno dos Reis
Martinez



Manuscrito a ser submetido para avaliação no periódico *Ecotoxicology and Environmental Safety*

Normas disponíveis em:

<https://www.elsevier.com/journals/ecotoxicology-and-environmental-safety/0147-6513/guide-for-authors>

Efeitos do cobre em *Hoplias malabaricus* após exposição pela via trófica com dieta viva: uma abordagem de múltiplos biomarcadores

Angélica Alves de Paula¹, Wagner Ezequiel Risso¹, Claudia Bueno dos Reis Martinez^{1*}

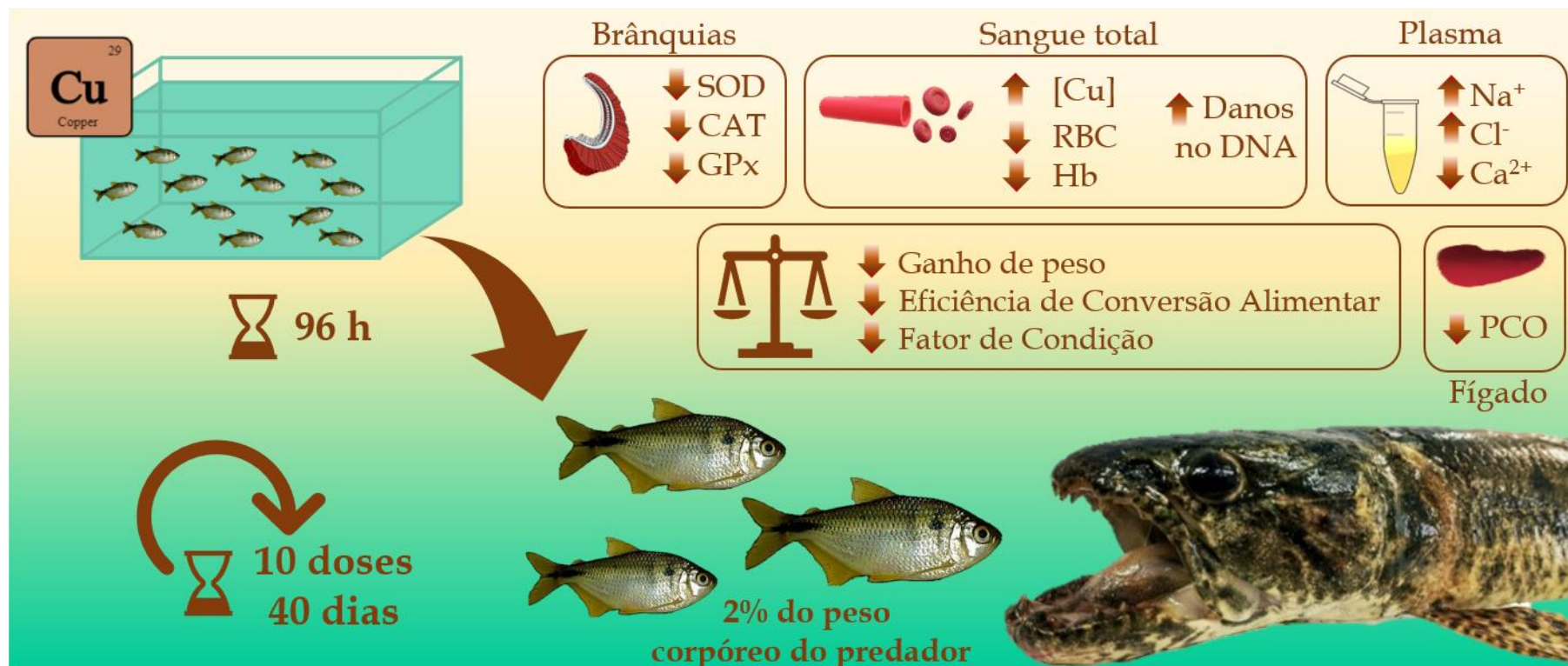
¹Laboratório de Ecofisiologia Animal – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380. C.P. 10011, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil

*Autor correspondente. Tel: +55 43 99994-9275. E-mail: claudiabrmartinez@gmail.com (C. B. R. Martinez)

Highlights

- O cobre prejudicou o ganho de peso das traíras
- A exposição ao cobre causou anemia
- O cobre acumulou no sangue e promoveu danos no DNA de eritrócitos
- Houve desbalanço iônico no plasma: aumento de Na⁺ e Cl⁻ e diminuição de Ca²⁺
- A atividade das enzimas SOD, CAT e GPx diminuiu nas brânquias

Resumo gráfico



Resumo

A toxicidade do cobre é bem compreendida em organismos aquáticos expostos via água. No entanto, quando comparado a essa via, os efeitos na dieta são pouco compreendidos, principalmente nos peixes tropicais. O limite de toxicidade do cobre pela via trófica pode ser influenciado pela composição da dieta, sendo que dietas naturalmente impregnadas com cobre parecem ter maior toxicidade em concentrações menores que dietas artificialmente impregnadas. Desse modo, nosso objetivo foi investigar os efeitos do cobre em *Hoplias malabaricus* alimentados com presas vivas (*Astyanax altiparanae*) previamente expostas ao metal (concentração nominal de $20 \mu\text{g L}^{-1}$) por 96 h. As presas foram fornecidas a *H. malabaricus* a cada 96 h totalizando, ao final do experimento, 10 doses. O sangue mostrou resultados importantes, sendo o único tecido em que o cobre acumulou. Foi constatada anemia e houve danos no DNA dos eritrócitos. Além disso, desequilíbrios iônicos foram observados no plasma. Houve aumento da concentração de Na^+ e do Cl^- e diminuição do Ca^{2+} as quais foram associadas a maior tomada de cobre no trato gastrointestinal dos animais expostos ao metal. Todas as enzimas antioxidantes avaliadas na brânquia (SOD, CAT e GPx) apresentaram uma diminuição da atividade em relação ao grupo controle. No fígado, houve diminuição da SOD e da PCO. O cobre parece ter interferido no metabolismo energético dos animais, uma vez que menor fator de condição e taxa de eficiência de conversão foi observada nos peixes expostos ao metal. O presente estudo consagra a via trófica como uma importante via de toxicidade do cobre para *H. malabaricus* e reforça a ideia de que a toxicidade do metal pode ser aumentada quando este é impregnado naturalmente nos tecidos biológicos das presas, ainda que a presa tenha sido exposta por um curto período em laboratório.

Palavras-chave: anemia, enzimas antioxidantes, fator de condição, danos no DNA, desequilíbrios iônicos

1. Introdução

A contaminação dos corpos d'água por metais pode resultar não só em exposição direta dos animais aquáticos pelas brânquias e pele, mas também, levar a um acúmulo deste metal em organismos de níveis tróficos mais baixos da cadeia alimentar, resultando em uma via potencial de exposição para animais em níveis tróficos mais elevados.

O cobre é um metal amplamente encontrado nos ambientes aquáticos e é essencial para a vida dos organismos. No entanto, em concentrações que excedem a capacidade celular de regulá-lo, este metal pode se tornar tóxico. Os efeitos tóxicos do cobre em teleósteos dulcícolas têm sido extensivamente avaliados na exposição via água, por outro lado, quando comparada a essa via, a toxicidade deste metal pela dieta é pouco compreendida, principalmente em relação as espécies de peixes tropicais (Giacomin et al., 2018). Apesar disso, a via trófica é reconhecida atualmente como uma importante via de contaminação pelo metal (Clearwater et al., 2002; De Forest e Meyer, 2015; Grosell, 2012).

A tomada do cobre pela via trófica ocorre inicialmente com a transferência do metal do alimento para o trato gastrointestinal, tanto pelo estômago quanto pelo intestino, seguindo pelo sangue até o fígado, e na sequência ocorre a distribuição para os demais órgãos ou excreção pela bile (Grosell et al., 2001; Nadella et al., 2007; Nadella et al., 2011). Os efeitos tóxicos do cobre pela dieta podem incluir distúrbios iônicos, principalmente do sódio, uma vez que a tomada do cobre no intestino está atrelada a entrada desse íon (Nadella et al., 2007), estresse oxidativo (Hoyle et al., 2007), diminuição na tomada do alimento (Hoyle et al., 2007; Johari et al., 2020), diminuição na taxa de crescimento (Berntssen et al., 1999; Hansen et al., 2004; Hoyle et al., 2007) e no ganho de peso (Johari et al., 2020).

O limite de concentração em que o metal causa toxicidade pela via trófica pode variar entre as espécies, estágio de vida e composição da dieta (Clearwater., 2002). Estudos com metais incorporados naturalmente a dieta (e.g. Hansen et al., 2004; Woodward et al., 1994, 1995) mostraram efeitos tóxicos em concentrações menores do que os conduzidos com dietas artificiais, sugerindo que a toxicidade do cobre pode ser maior quando este metal está naturalmente incorporado nos tecidos biológicos das presas. A teoria por trás disso seria a de que quando biologicamente incorporados nas presas os metais podem ser mais facilmente absorvidos pelos predadores tornando-se assim, mais tóxicos em menores concentrações (Clearwater et al., 2002). No nosso conhecimento, estudos sobre a toxicidade do cobre em peixes tropicais com uso de dieta viva expostas ao metal ainda não foram realizados.

O modelo biológico escolhido no presente estudo, *Hoplias malabaricus*, é um peixe Neotropical essencialmente piscívoro e de importância econômica na pesca artesanal (Bennemann e Shibatta, 2002; Milani e Fontoura, 2007). Conhecida popularmente como traíra, essa espécie é amplamente utilizada nos estudos de ecotoxicologia, em experimentos de via trófica, uma vez que possui um comportamento voraz, capacidade de adaptação a condições experimentais e por ser predador de topo de cadeia (Alves Costa et al., 2007).

A traíra parece ser pouco suscetível a toxicidade do cobre (via água) quando comparado a outras espécies de peixes Neotropicais. Em estudo conduzido em laboratório por De Paula et al. (2020) (capítulo 1) avaliando a toxicidade do cobre em presa e predador, o cobre se mostrou pouco tóxico para *H. malabaricus* quando comparado a *Astyanax altiparanae*, uma das espécies predadas pela traíra em ambiente natural. Em *H. malabaricus*, a exposição aguda (96 h) a concentração de 20 µg L⁻¹ de cobre levou a um aumento da atividade das ATP-ases branquiais (Na⁺/K⁺-ATPase, H⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase), contrapondo o efeito tóxico esperado de inibição dessas enzimas pelo metal e, além disso, não foi observado aumento da concentração de cobre em nenhum dos tecidos avaliados e tampouco estresse oxidativo (de Paula et al., 2020). Por outro lado, a mesma concentração (20 µg de cobre por L⁻¹ - nominal) levou ao estresse oxidativo, aumento expressivo das metalotioneínas e acúmulo do metal em três tecidos (brânquia, trato gastrointestinal e fígado) em *A. altiparanae* (de Paula et al., 2020). A exposição aguda (96 h) ao cobre (20 µg L⁻¹ - nominal) parece ser tóxica também para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus* causando danos em biomoléculas (lipídios e DNA) e comprometendo a habilidade natatória dos animais (Simonato et al., 2016).

Frente ao exposto e considerando a falta de estudos sobre a toxicidade do cobre na dieta de peixes tropicais, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar os efeitos do cobre em *H. malabaricus* expostos à dieta utilizando presa viva (*A. altiparanae*) contaminada com cobre em laboratório, utilizando diversos biomarcadores comumente empregados na avaliação da toxicidade dos metais. Nossas hipóteses são: 1) o cobre causará alteração na concentração de sódio plasmático; 2) acumulará no trato digestório e fígado e 3) causará estresse oxidativo; 4) as traíras expostas ao cobre terão um menor peso corpóreo ao final do período experimental; e 5) a traíra será mais suscetível a toxicidade do cobre pela dieta quando em comparação com a toxicidade do metal via água (de Paula et al., 2020).

2. Material e Métodos

2.1. *Hoplias malabaricus*

Exemplares de *H. malabaricus* ($n = 20$; $92,15 \pm 7,38$ g; média \pm EP) foram adquiridos da Estação de Piscicultura AquaNorte (Cambará, Paraná, Brasil) e aclimatados durante 90 dias em tanques de 500 L ($n = 10$ por tanque) contendo água desclorada e filtrada em esponja, zeolita, cerâmica e carvão ativado; aeração constante ($> 75\%$); fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro; pH (~ 6) e temperatura controlada (~ 25 °C). Durante este período, os animais foram alimentados a cada 72 h com lambaris (*A. altiparanae*) vivos.

2.2. *Astyanax altiparanae* (dieta viva)

Os espécimes de *A. altiparanae* (~ 1 g) foram obtidos de pisciculturas da região (Paraná, Brasil) e aclimatados em tanques de 500 L em condições controladas (água limpa, aeração constante, fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro, pH ~ 7 e temperatura ~ 25 °C) por, no mínimo, dez dias. Durante este período, os animais foram alimentados a cada 24 h com ração comercial (Pirá Mirim QS 1,7 mm, Guabi).

2.3. Desenho experimental

Aclimação nos aquários - Após a aclimação nos tanques, os espécimes de *H. malabaricus* foram anestesiados, pesados e alocados em aquários individuais de 40 L a fim de formarem dois grupos: grupo controle (CTR; $n = 10$) e grupo experimental (EXP; $n = 10$). Durante todo o período em que as traíras foram mantidas nos aquários, a alimentação foi dada a cada 96 h e consistiu em espécimes vivos de *A. altiparanae*, correspondentes a aproximadamente 2 % do peso corpóreo diário de cada traíra, conforme proposto pelo estudo de Rios et al. (2005). No entanto, as duas primeiras alimentações foram realizadas com intuito de observar se as traíras estavam aclimatadas ao novo ambiente (aquários) e, portanto, os lambaris fornecidos foram mantidos, apenas, em água desclorada. Todas as presas foram consumidas em menos de 24 h sendo que, decorrido 6 h, poucos aquários ainda continham alimento.

Período experimental – O cobre fornecido ao grupo EXP foi preparado com presas (*A. altiparanae*) expostas por 96 h em um sistema semi-estático (renovação de 75% em 48 h) a concentração nominal de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Neste período, os espécimes foram mantidos em aquários de vidro (80 L) contendo uma densidade de aproximadamente 1 g L^{-1} de peixe. Essa

concentração foi escolhida por levar a um acúmulo de cobre (brânquia, fígado e trato) em *A. altiparanae* (de Paula et al., 2020). As traíras do grupo CTR foram alimentadas com presas mantidas por 96 h em aquários contendo somente água desclorada. Decorrido 48 h de cada alimentação as fezes eram sifonadas e 50 % da água de todos os aquários era renovada a fim de minimizar a concentração de amônia. Foram realizadas 10 alimentações totalizando 40 dias de período experimental, assim como proposto por Monteiro et al. (2013). Ao longo de todo o período experimental, temperatura, pH, oxigênio e condutividade se mantiveram constantes e não foram observadas diferenças entre o grupo CTR e o grupo EXP ($26,51 \pm 0,33$ °C; $7,56 \pm 0,08$; $6,38 \pm 0,10$; $132,98 \mu\text{S cm}^{-1}$).

2.4. Amostragem

Decorrido 96 h da décima alimentação os animais foram anestesiados em benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), pesados e medidos, e o fator de condição de Fulton's ($\text{FC} = 100 * [\text{peso (g) / comprimento (cm)}^3]$) foi calculado. Além do FC, foi calculada a eficiência de conversão alimentar ($\text{EC} = 100 * [\text{ganho de peso (g) / peso cumulativo das presas consumidas (g)}]$) (Hardy, 1989). Ainda sob o efeito da anestesia, o sangue foi retirado pela veia caudal para análise dos parâmetros hematológicos e plasmáticos e uma alíquota foi mantida em soro bovino para o teste do cometa. Em seguida, os animais foram mortos por secção medular para a retirada dos tecidos: brânquias, fígado, trato gastrointestinal, rim, cérebro, músculo e osso e estocagem a -72 °C até o momento das análises.

2.5. Quantificação do cobre

Na água – amostras de água (15 ml) foram coletadas dos aquários das traíras após 24 h de cada alimentação, ao longo de todo o período experimental, como também dos aquários nos quais as presas foram mantidas, a cada 24 h de exposição. Foram coletadas alíquotas de água para análise do cobre total (não filtrada) e dissolvido (filtrada em poro de $0,45 \mu\text{m}$) as quais foram acidificadas (HNO_3 1%) e refrigeradas até a análise. A concentração de cobre foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica com atomizador de forno de grafite (Perkin Elmer, AAnalyst 700, EUA) em comparação com solução padrão de referência (Spco, Brasil).

Nos tecidos de H. malabaricus - a concentração de cobre foi avaliada em: sangue total, plasma, brânquias, trato gastro intestinal, fígado, rim, cérebro, músculo e osso. Com exceção do plasma, os tecidos foram completamente secos a 60 °C e digeridos em ácido nítrico

suprapuro (5 N) (48 h; 60 °C) conforme proposto por Alves e Wood (2006). A concentração de Cu foi avaliada tanto nos tecidos (após digestão) quanto no plasma em espectrofotômetro de absorção atômica equipado com forno de grafite (Perkin Elmer, AAnalyst 700, EUA) em comparação com soluções padrão de referência (Spcsol, Brasil). Os resultados foram expressos em mg Kg⁻¹ de peso seco (sangue total, brânquias, trato gastro intestinal, fígado, rim, cérebro, músculo e osso) ou mg L⁻¹ (plasma).

Nas presas (A. altiparanae) - A fim de caracterizar a concentração de cobre ingerida pelas traíras, a concentração de cobre foi avaliada nas presas. O corpo inteiro do animal foi seco completamente a 60° C e, após, foi feita uma maceração mecânica com bastão de vidro. A digestão e a análise da concentração de cobre seguiram os mesmos procedimentos utilizados nos tecidos de *H. malabaricus* descritos anteriormente.

2.6. Biomarcadores

No sangue, a dosagem de hemoglobina (Hb) foi feita em espectrofotômetro (540 nm) com auxílio de kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil). A contagem das células sanguíneas (RBC) ocorreu em câmara de Neubauer sob microscopia de luz.

No plasma, a glicose foi determinada com utilização de kit comercial (Doles Reagentes Ltda, Brasil). O Na⁺ e o K⁺ foram medidos em fotômetro de chama (Digimed DM-62, Brasil) e a concentração de Ca²⁺ e Mg²⁺ mensuradas em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer, A700, EUA) com atomizador de chama. O Cl⁻ plasmático foi quantificado com auxílio de kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil).

A atividade enzimática da Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) e H⁺-ATPase (HATP) foi determinada pela quebra do ATP em extratos branquiais incubados em meios de reação com ou sem inibidores (ouabaína e N-etilamida) e acoplados as enzimas piruvato quinase e lactato desidrogenase, conforme proposto por Gibbs e Somero (1989). A atividade da Ca²⁺-ATPase (CaATP) foi determinada pela liberação de fosfato inorgânico em presença de solução de coloração em amostras incubadas em solução reativa, com ou sem ATP, segundo protocolo descrito por Vijayavel et al. (2007). A atividade da enzima anidrase carbônica (AC) foi monitorada pelo decaimento do pH resultante da liberação de H⁺ fornecido pela catálise de uma solução saturada de CO₂ segundo proposto por Vitale et al. (1999).

Para determinação do glicogênio muscular e hepático os tecidos seguiram as etapas de digestão, hidrólise e precipitação propostas por Bidinotto et al. (1998). Após, o “pellet” foi

ressuspendido em água para avaliação do teor de açúcares redutores segundo metodologia proposta por Dubois et al. (1956).

As enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e, também, a enzima glutathiona S-transferase (GST) foram avaliadas em brânquias e fígado, assim como a concentração de tióis não proteicos (GSH) e proteínas semelhantes às metalotioneínas (MT). A atividade da CuZn-SOD foi determinada pela inibição da redução do citocromo C pelo radical superóxido a 550 nm, conforme proposto por McCord e Fridovich (1969). A atividade da CAT foi monitorada pelo decaimento da absorvância (240 nm) decorrente da quebra do H₂O₂ conforme protocolo estabelecido por Beutler (1975) e a atividade da GPx foi estimada indiretamente pelo decaimento da absorvância (340 nm) do NADPH em presença da glutathiona redutase (GR), GSH e H₂O₂ conforme proposto por Hopkins e Tudhope (1973). A determinação da atividade da GST seguiu protocolo de Keen et al. (1976) onde a complexação da GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) foi monitorada em espectrofotômetro (340 nm). A concentração de GSH foi determinada em espectrofotômetro (412 nm) pela quantificação de tiolatos formados pela reação entre os grupamentos tióis e o composto colorimétrico de Ellman's após tratamento ácido, seguindo protocolo proposto por Beutler et al. (1963). O conteúdo MT foi medido de acordo com Viarengo et al. (1997) onde, após fracionamento com etanol e clorofórmio, foram quantificados os grupos tióis em espectrofotômetro (412 nm).

Os danos oxidativos foram avaliados por meio da lipoperoxidação (LPO) e da concentração de proteínas carboniladas (PCO) em brânquias e fígado além dos danos no DNA (ensaio do cometa) avaliados em eritrócitos. A LPO foi determinada pelo ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) onde após incubação do sobrenadante com o ácido tiobarbitúrico (1,3%) foi realizada leitura de fluorescência em espectrofotômetro (ex/em: 535/590 nm) conforme proposto por Camejo et al (1998). A concentração de PCO foi quantificada (360 nm) pela formação de dinitrofenil hidrazonas em presença de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) segundo protocolo proposto por Levine et al. (1994). Para quantificação dos danos no DNA de eritrócitos foi empregado o ensaio alcalino do cometa proposto por Singh et al. (1998). Foram avaliados 100 nucleóides por animal e os danos foram divididos por classes (de 0 a 3) de acordo com o proposto por de Paula et al. (2020). O escore de danos no DNA foi calculado pela multiplicação do número de nucleóides em cada classe pelo valor da classe de danos (0 a 3).

A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi determinada em músculo e cérebro de acordo com Ellman et al. (1961) a partir da quebra do iodeto de acetilcolina na presença de reagente de cor de Ellman's e leitura em espectrofotômetro (415 nm).

Os biomarcadores determinados em tecido branquial, hepático, muscular e cerebral, com exceção do glicogênio, foram expressos em relação ao conteúdo total de proteínas, determinado a 595 nm pelo protocolo proposto por Bradford (1979).

2.7. Análise estatística

Cada parâmetro avaliado foi comparado entre o grupo CTR e o grupo EXP por meio do teste estatístico paramétrico t de Student's ou não paramétrico U de Mann-Whitney de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homocedasticidade). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

Não houve mortalidade em nenhum dos grupos, sendo, portanto, os efeitos encontrados subletais.

A concentração de cobre na água dos aquários das traíras mantidas sob condição CTR e nos aquários das traíras que foram alimentadas com *A. altiparanae*, previamente expostos ao cobre, foram muito semelhantes e mantiveram-se em torno de $3,7 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu total) e $3,4 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu dissolvido). Dessa forma, os efeitos tóxicos encontrados no presente estudo se devem, provavelmente, a dieta. As concentrações de cobre nas presas, bem como na água dos aquários onde foram mantidas encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Concentração de cobre nas presas (*A. altiparanae*) (média \pm EP; n = 8-30) e cobre total e dissolvido na água dos aquários onde foram mantidas *A. altiparanae* (média \pm EP; n = 2-57).

	Sem cobre		Com cobre	
<i>Astyanax altiparanae</i>	4,61 \pm 0,83 mg Kg ⁻¹		6,04 \pm 0,53 mg Kg ⁻¹	
	Cu total	Cu dissolvido	Cu total	Cu dissolvido
água dos aquários	4,94 \pm 1,89 $\mu\text{g L}^{-1}$	3,38 \pm 1,05 $\mu\text{g L}^{-1}$	15,66 \pm 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$	12,95 \pm 0,22 $\mu\text{g L}^{-1}$

3.1. Concentração de cobre nos tecidos

Houve aumento significativo da concentração de cobre apenas no sangue ($t = 2,88$; $p = 0,013$) das traíras que se alimentaram de lambaris previamente expostos ao Cu (Fig. 3.1). O metal acumulado no sangue estava provavelmente associado as células sanguíneas, uma vez que não foi encontrada diferença na concentração de cobre plasmática (Fig. 3.1).

Apesar de não significativo, todos os outros tecidos do grupo EXP avaliados mostraram um aumento médio da concentração de cobre quando comparados ao grupo CTR (Rim = 44,86%, fígado = 24,38%, cérebro = 23,77%, TGI = 22,30%, osso = 13,33%, músculo = 12,17%, brânquias = 2,83%) indicando que o metal estava mais biodisponível nas presas (*A. altiparanae*) fornecidas ao grupo EXP do que nas presas fornecidas ao grupo CTR.

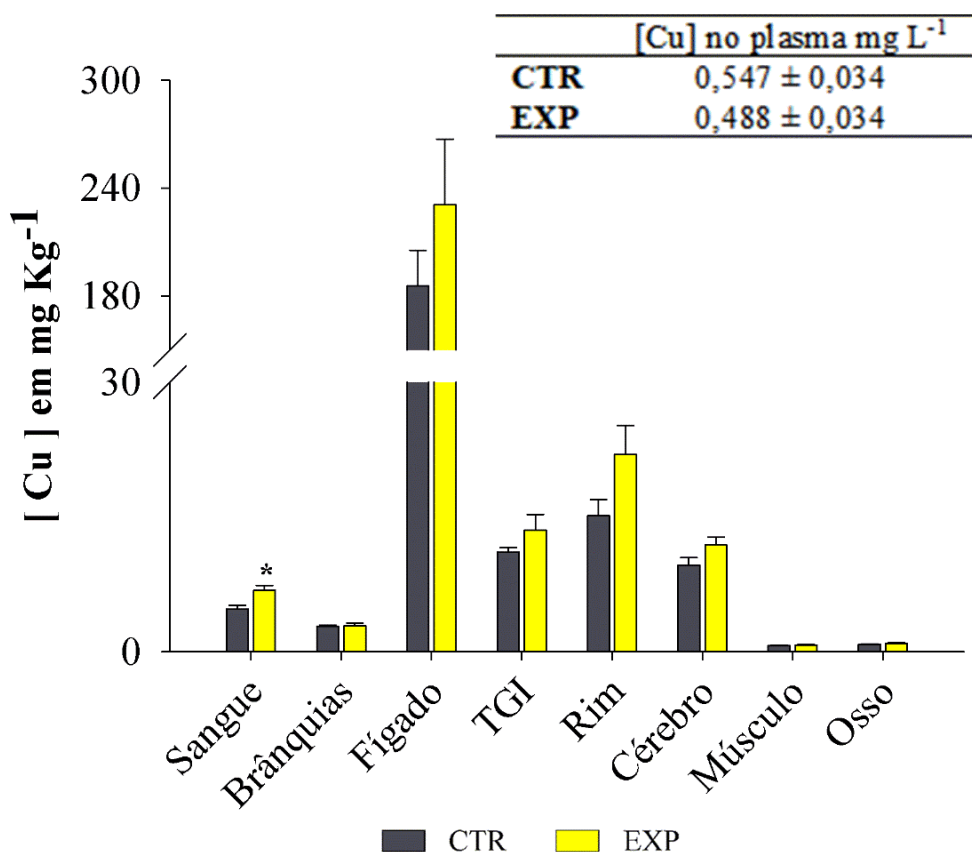


Figura 3.1 – Concentração de Cu em sangue, brânquia, fígado, trato gastrointestinal (TGI), rim, cérebro, músculo e osso de *H. malabaricus* sob condição controle (CTR) e após 40 dias de contaminação trófica com Cu (EXP). Os gráficos representam média \pm EP ($n = 7-10$). O * indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

3.2. Ganho de peso, eficiência de conversão e fator de condição

Não foi constatada diferença significativa de peso entre as traíras do grupo CTR e do grupo EXP tanto no início, quanto no término do experimento. No entanto, ao final do período

experimental, o ganho de peso do grupo EXP foi 35% menor do que o ganho de peso do grupo CTR ($U = 20$; $p = 0,025$), resultado que foi corroborado por uma menor taxa de eficiência de conversão alimentar ($t = 2,83$; $p = 0,011$) e um menor fator de condição ($U = 23$; $p = 0,045$) nas traíras do grupo EXP (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Peso inicial e final, ganho de peso, eficiência de conversão ($EC = 100 * [\text{ganho de peso (g)}/\text{peso cumulativo das presas consumidas (g)}]$) e fator de condição ($FC = 100 * [\text{peso (g)}/\text{comprimento (cm}^3\text{)}]$) de *H. malabaricus* sob condição controle (CTR) e após 40 dias de contaminação trófica (10 alimentações) com Cu (EXP). Os dados estão representados por média \pm EP ($n = 10$). O * indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (g)	Eficiência de conversão (%)	Fator de condição (%)
CTR	98,5 \pm 8,81	124,5 \pm 10,52	26 \pm 2,44	31,54 \pm 2,07	1,10 \pm 0,03
EXP	85,5 \pm 11,96	102,8 \pm 14,34	17 \pm 2,86 *	23,44 \pm 1,97 *	0,98 \pm 0,03*

3.3. Parâmetros fisiológicos

Os parâmetros hematológicos indicaram anemia nas traíras expostas ao cobre, pois houve diminuição da concentração de hemoglobina ($U = 21,0$; $p = 0,031$) assim como do RBC ($t = 3,4$; $p = 0,004$) em *H. malabaricus* do grupo EXP quando comparados ao grupo CTR (Figs 3.2A e 3.2B).

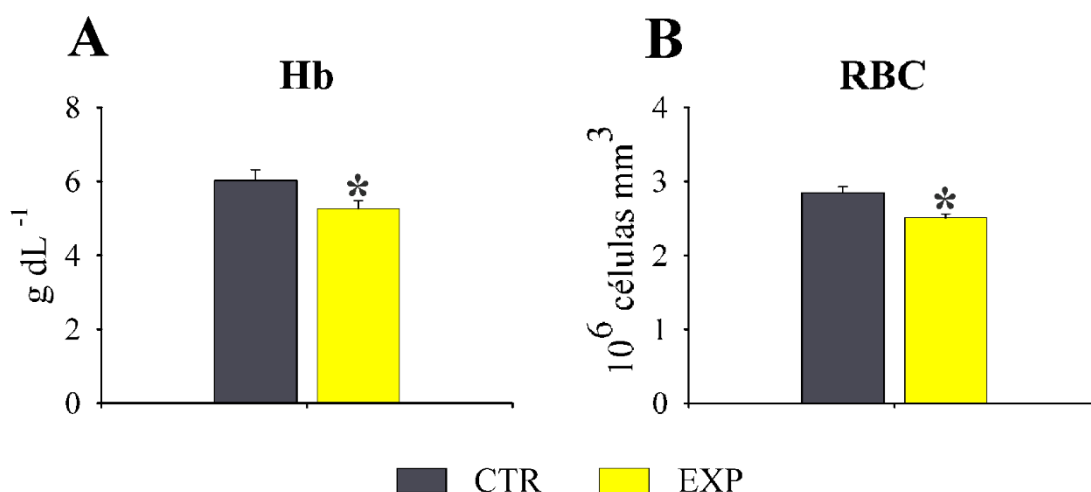


Figura 3.2 – Parâmetros hematológicos em *H. malabaricus* sob condição controle (CTR) e após 40 dias de contaminação trófica (10 alimentações) com Cu (EXP): Concentração de hemoglobina (Hb) (A) e número de células vermelhas por mm³ (RBC) (B). Os gráficos representam média \pm EP ($n = 8-10$). O * indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Concentrações significativamente mais elevadas de Na^+ ($t = 5,77$; $p < 0,001$) (Fig. 3.3A) e de Cl^- ($t = -3,052$; $p = 0,007$) (Fig. 3.3C) foram encontradas no plasma das traíras expostas ao cobre. Além disso, houve diminuição significativa de Ca^{2+} no plasma do grupo EXP quando comparado ao grupo CTR ($t = 2,53$; $p = 0,02$) (Figura 3.3D). Não foram observadas diferenças na concentração de K^+ e Mg^{2+} (Figs 3.3B e 3.3E).

Apesar das alterações iônicas, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos CTR e EXP na atividade da NKA (Fig. 3.4A) e da CaATP (Fig. 3.4B) branquial. Também não houve alteração na atividade da HATP (Fig. 3.4C) e AC (Fig. 3.4D) nesse tecido.

Concentrações semelhantes de glicose plasmática (Fig. 3.5A) foram encontradas em ambos os grupos e tanto para o glicogênio hepático quanto para o glicogênio muscular não foram observadas diferenças significativas entre as traíras do grupo CTR e EXP (Fig. 3.5B).

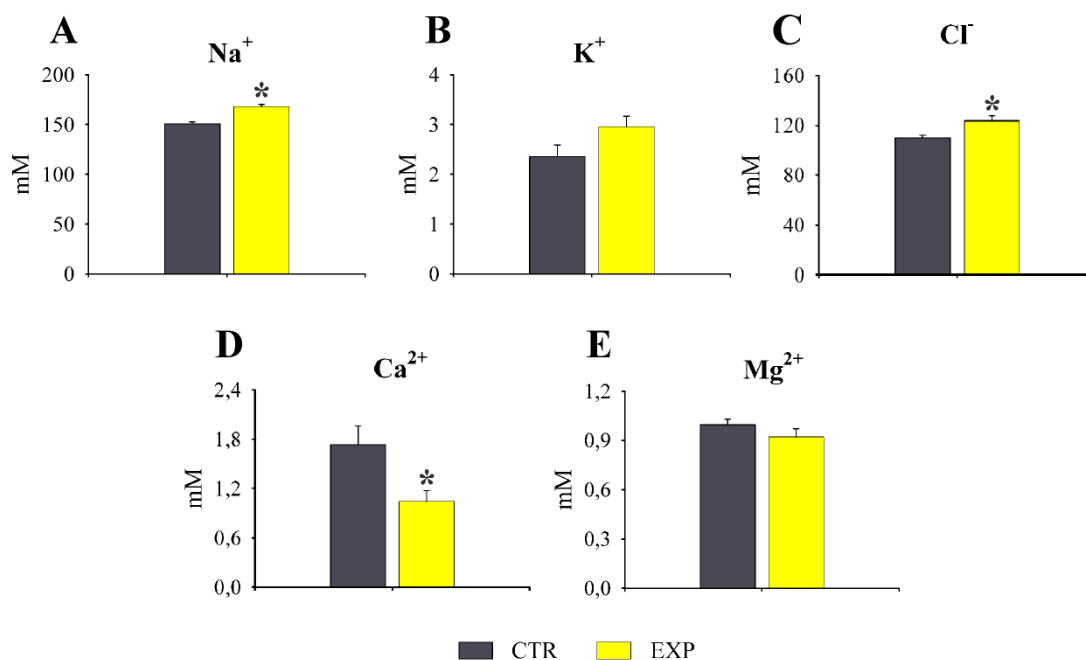


Figura 3.3. Concentração de Na^+ (A), K^+ (B), Cl^- (C), Ca^{2+} (D) e Mg^{2+} (E) no plasma de *H. malabaricus* sob condição controle (CTR) e após 40 dias de contaminação trófica (10 alimentações) com Cu (EXP). Os gráficos representam média \pm EP ($n = 9-10$). O * indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

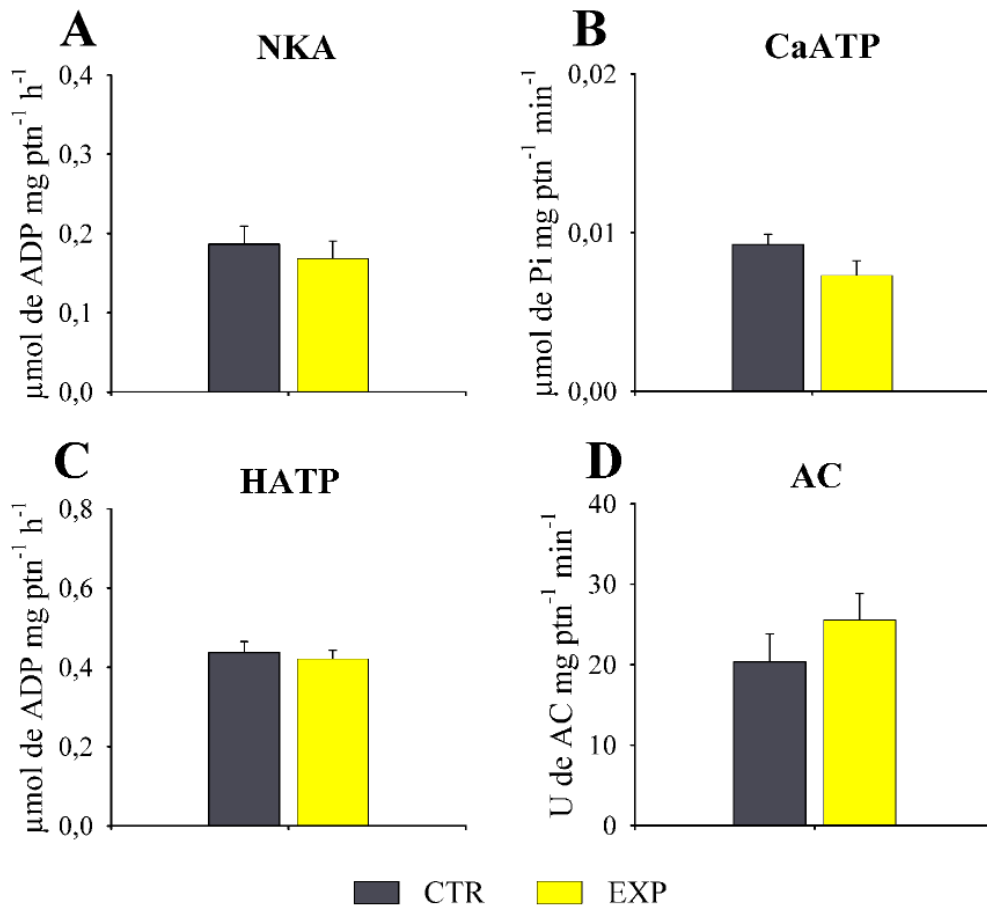


Figura 3.4. Atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (NKA) (A), Ca^{2+} -ATPase (CaATP) (B), H^+ -ATPase (HATP) (C) e anidrase carbônica (D) em brânquias de *H. malabaricus* sob condição controle (CTR) e após 40 dias de contaminação trófica (10 alimentações) com Cu (EXP). Os gráficos representam média \pm EP (n = 8-10).

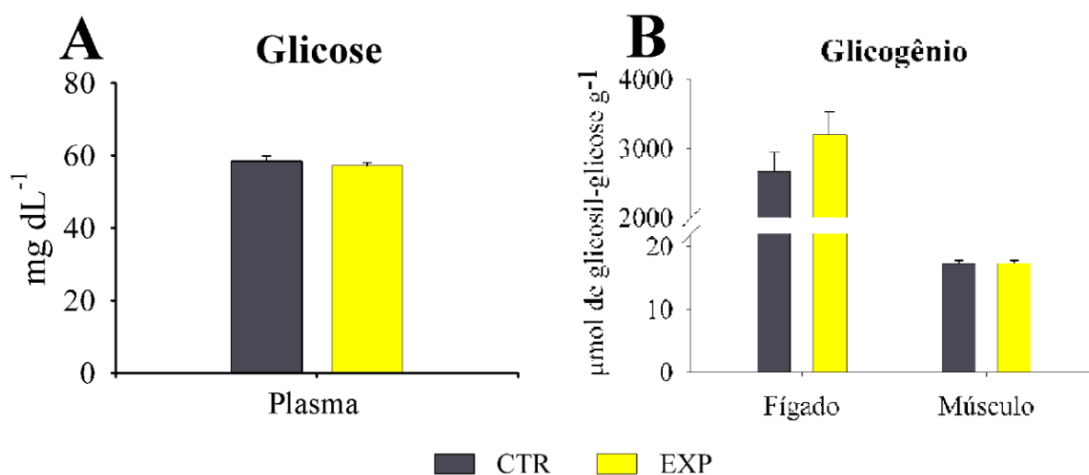


Figura 3.5. Concentração de glicose plasmática (A) e de glicogênio (B) hepático e muscular em *H. malabaricus* sob condição controle (CTR) e após 40 dias de contaminação trófica (10 alimentações) com Cu (EXP). Os gráficos representam média \pm EP (n = 9-10).

3.4. Defesas antioxidantes

De um modo geral, a atividade antioxidante nas brânquias de *H. malabaricus* foi maior no grupo CTR, uma vez que houve diminuição na atividade da SOD ($t = 2,95$; $p = 0,009$), CAT ($U = 0,00$; $p < 0,001$) e GPx ($t = 2,72$; $p = 0,014$) nas brânquias dos animais do grupo experimental (Figs 3.6A, 3.6B e 3.6C). No fígado das traíras que consumiram peixes contaminados com Cu (grupo EXP) foi observada uma diminuição na atividade da SOD (Fig. 3.6A) ($t = 5,61$; $p < 0,001$), mas não foram constatadas alterações na atividade da CAT e GPx (Figs. 3.6B e 3.6C). Não houve variação na atividade da GST tanto em brânquias como no fígado (Fig. 3.6D).

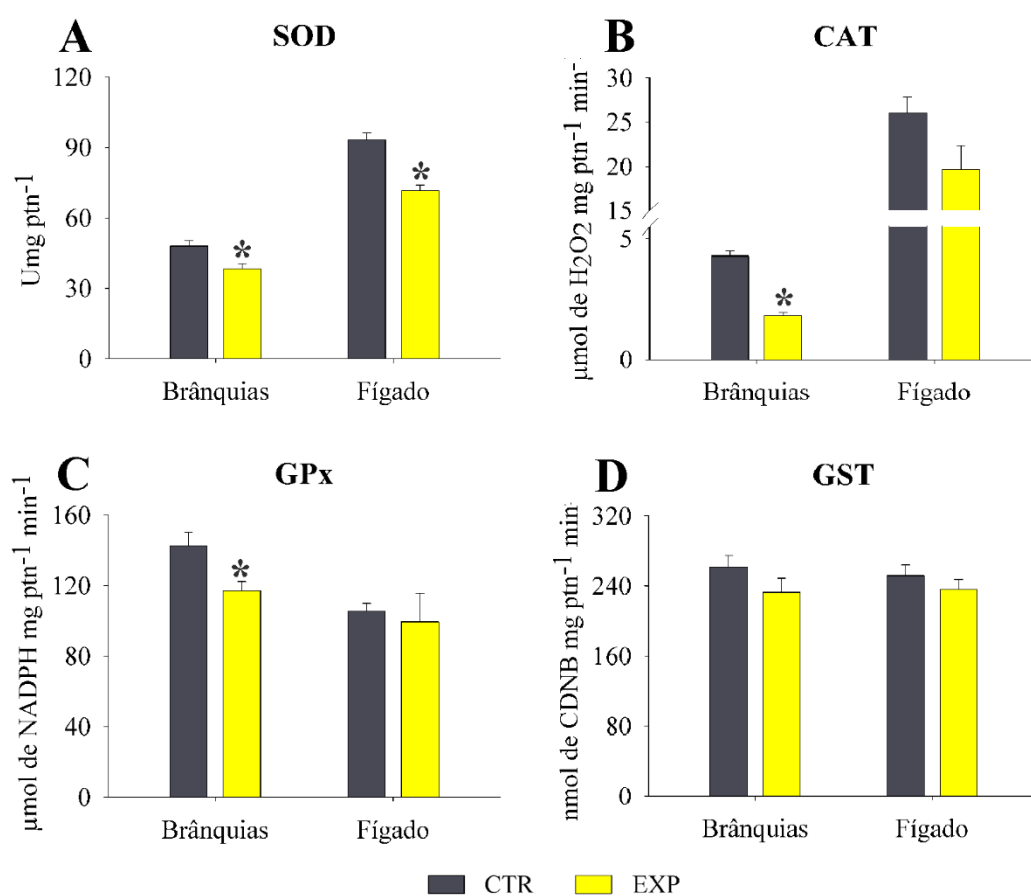


Figura 3.6. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B), glutatona peroxidase (GPx) (C) e glutatona S-transferase (GST) (D) em brânquias e fígado de *H. malabaricus* sob condição controle (CTR) e após 40 dias de contaminação trófica (10 alimentações) com Cu (EXP). Os gráficos representam média \pm EP ($n = 9-10$). O * indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

As concentrações de GSH (Fig. 3.7A) e MT (Fig. 3.7B), tanto nas brânquias quanto no fígado, não variaram significativamente quando foram comparadas as traíras do grupo CTR e EXP.

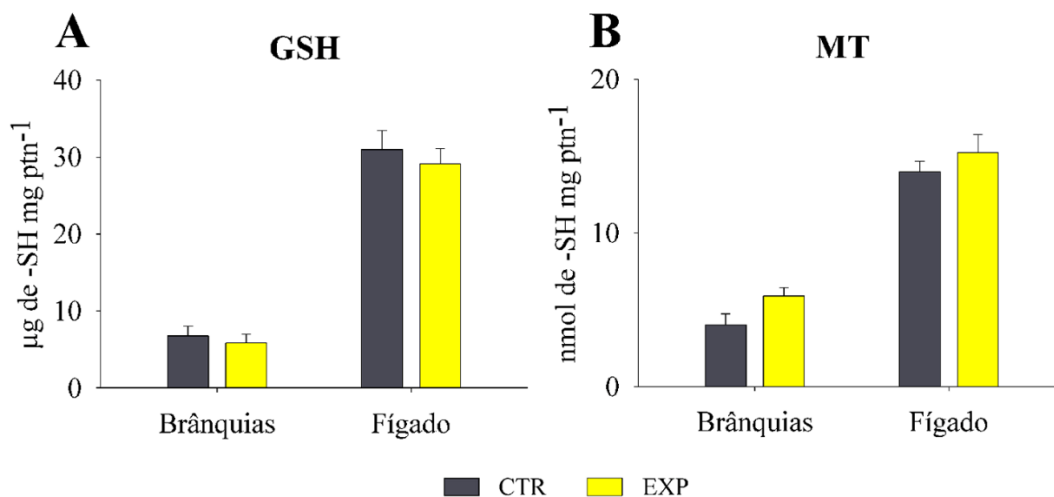


Figura 3.7. Concentração de glutathiona (GSH) (A) e proteínas semelhantes a metalotioneína (MT) (B) em brânquias e fígado de *H. malabaricus* sob condição controle (CTR) e após 40 dias de contaminação trófica (10 alimentações) com Cu (EXP). Os gráficos representam média \pm EP (n = 9-10).

3.5. Danos oxidativos

Não foi observado LPO e PCO nas brânquias das traíras expostas ao cobre (Fig. 3.8A e 3.8B) e tampouco LPO no fígado (Fig. 3.8A). Por outro lado, quando comparado ao grupo CTR, as traíras do grupo EXP mostraram uma diminuição da concentração de PCO no fígado ($t = 4,39$; $p < 0,001$) (Fig. 3.8B).

De modo interessante, o escore de danos no DNA nos eritrócitos dos animais do grupo EXP quase triplicou ($t = 11,26$; $p < 0,001$).

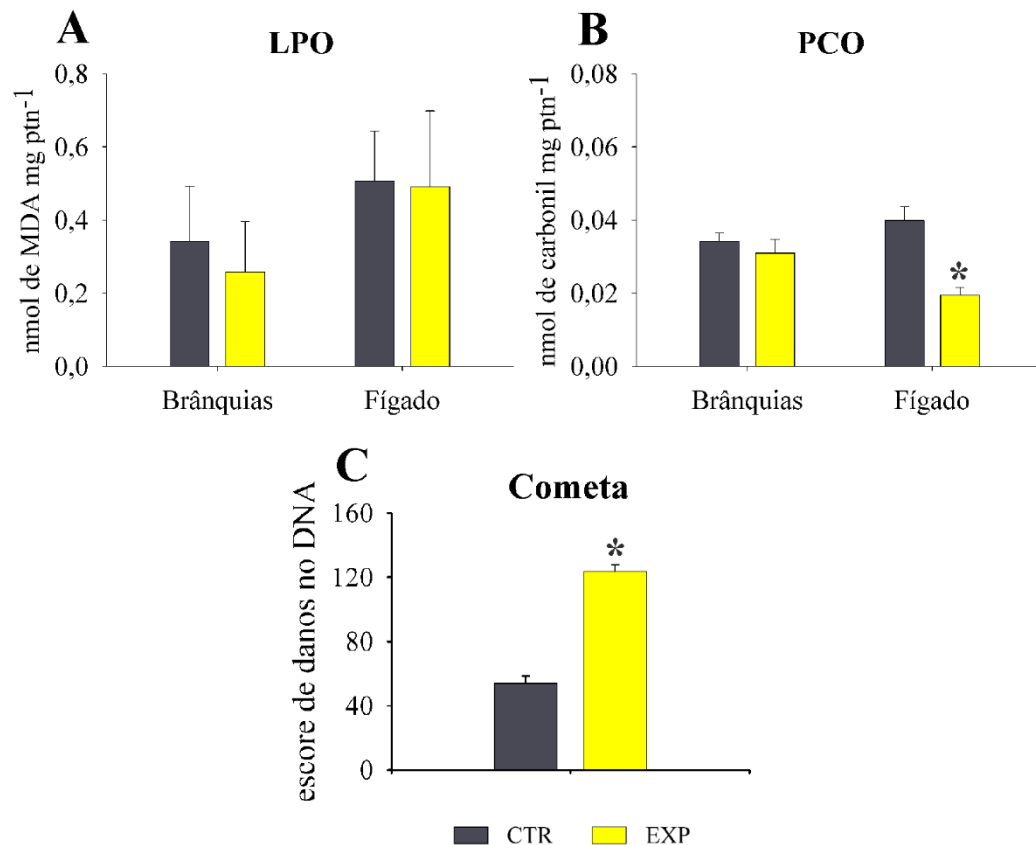


Figura 3.8. Danos em biomoléculas de *H. malabaricus* sob condição controle (CTR) e após 40 dias de contaminação trófica (10 alimentações) com Cu (EXP). Lipoperoxidação (LPO) (A) e proteínas carboniladas (PCO) (B) em brânquias e fígado; Danos no DNA (cometa) em eritrócitos (C). Os gráficos representam média \pm EP (n = 4-10). O * indica diferença significativa entre os grupos (p < 0,05).

3.6. Atividade da AChE

Não foram constatadas alterações na atividade da AChE cerebral e muscular de *H. malabaricus* (Fig. 3.9).

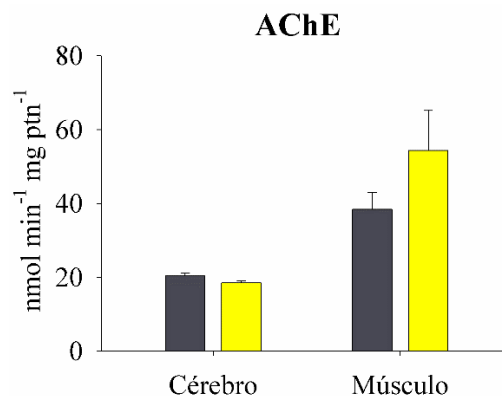


Figura 3.9. Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em cérebro e músculo de *H. malabaricus* sob condição controle (CTR) e após 40 dias de contaminação trófica (10 alimentações) com Cu (EXP). Os gráficos representam média \pm EP (n = 9-10).

4. Discussão

4.1. Considerações gerais

No nosso conhecimento, nosso trabalho é o primeiro a avaliar a toxicidade do cobre pela via trófica em um peixe Neotropical (*H. malabaricus*) exposto ao metal por dieta viva (*A. altiparanae*). Dessa forma, esse estudo agrega informações importantes sobre a toxicidade do cobre em peixes tropicais, além de ter maior relevância ambiental, uma vez que não se trata de dieta artificial (ração comercial impregnada com solução de cobre) e que essas espécies podem co-ocorrer em um mesmo ambiente (bacia do Paraná) sendo presa e predador.

Uma de nossas hipóteses iniciais foi que o cobre poderia interferir no equilíbrio iônico do Na^+ . Essa hipótese foi confirmada e, além disso, o cobre teve influência no equilíbrio iônico do Cl^- e do Ca^{2+} os quais parecem estar relacionados com a tomada do metal no trato gastrointestinal (discutido a seguir) uma vez que não foram observadas alterações nas ATPases branquiais e que a concentração de cobre na água dos aquários do grupo CTR e grupo EXP foram parecidas.

Nossa segunda hipótese foi que o cobre acumularia no trato gastrointestinal e no fígado, o que não se confirmou. O cobre acumulou no sangue dos animais do grupo EXP, tecido no qual foram observados efeitos importantes, como danos no DNA e anemia.

A natureza redox do cobre o torna um metal com potencial tóxico (Grosell et al., 2001). No presente estudo foram observados danos no DNA de células sanguíneas, tecido em que o cobre acumulou. Apesar do cobre poder se ligar diretamente a molécula de DNA e causar alterações estruturais, a anemia observada sugere estresse oxidativo (discutido no item 4.5). Entretanto, brânquias e fígado não apresentaram uma relação consistente entre defesas antioxidantes e danos. Dessa forma a terceira hipótese não pôde ser completamente confirmada uma vez que houve apenas indício de estresse oxidativo em tecido específico, observado pela diminuição das enzimas antioxidantes nas brânquias, aumento de danos no DNA no sangue e diminuição da SOD e PCO no fígado.

Apesar de diferenças de peso não terem sido observadas entre os grupos (CTR x EXP), os cálculos de ganho de peso, eficiência de conversão (EC) e fator de condição (FC) indicam que estratégias díspares para manutenção do metabolismo podem ter sido adotadas pelas traíras expostas ao cobre.

Com relação a nossa quinta hipótese, esse estudo consagra a via trófica como uma importante via de toxicidade do cobre para *H. malabaricus*, uma vez que as 10 doses de presas

expostas a concentração nominal de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (96 h) do presente estudo resultaram em acúmulo do metal (sangue) e danos no DNA de eritrócitos (cometa), enquanto que a exposição aguda (96 h) de *H. malabaricus* à $20 \mu\text{g L}^{-1}$ via água não resultou em estresse oxidativo em nenhum dos tecidos avaliados e tampouco aumento da concentração de cobre (de Paula et al., 2020), indicando que o animal pode ser mais suscetível a toxicidade do metal quando exposto pela dieta.

4.2. Biodisponibilidade do cobre na presa

No ambiente natural, o animal pode incorporar o metal aos tecidos biológicos tendo como via de exposição o alimento, o sedimento e a água, além do fato de poder estar exposto durante todo o tempo de vida (Clearwater et al., 2002). Apesar da dificuldade de reproduzir em laboratório a incorporação natural do metal nos tecidos biológicos e do curto tempo de exposição da presa (96 h) no presente estudo, em outro estudo, de Paula et al. (2020) demonstraram que *A. altiparanae* expostos, também por 96 h, a concentrações muito semelhantes de cobre ($15,92 \pm 0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre total e $13,66 \pm 0,30 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre dissolvido) acumularam o metal em brânquias, trato gastrointestinal e fígado, além de apresentarem um aumento de mais que o dobro das metalotioneínas nos hepatócitos, o que indica uma possível associação do cobre com os tecidos biológicos do lambari. Em baixas concentrações os metais ligados a aminoácidos ou complexados a proteínas, podem ser mais facilmente absorvidos pelos peixes do que na forma inorgânica (Paripatananont e Lovell (1995, 1997). Paripatananont e Lovell (1997) demonstraram que quando quelado a moléculas orgânicas o cobre teve uma melhora na absorção líquida de 40,2 % em uma dieta a base de clara de ovo e de 124,9 % em uma dieta a base de soja fornecida ao bragre *Ictalurus punctatus*.

Vale ainda pontuar que no presente estudo, a concentração de cobre encontrada nas presas fornecidas ao grupo EXP, pode não representar de forma ideal o cobre bioacumulado. Grande parte do corpo dos peixes é constituída por músculo, tecido que menos acumula o cobre em *A. altiparanae* exposto por 96 h (de Paula et al., 2020). Uma vez que a metodologia empregada para avaliar a concentração de cobre na presa consistiu na digestão do animal inteiro, a concentração do metal pode ter sido diluída.

Outra evidência da transferência do metal entre presa e predador no presente estudo, é o acúmulo de cobre no sangue do grupo EXP o qual demonstra que o metal estava mais biodisponível para os animais deste grupo que para o grupo CTR, além do aumento da

concentração de cobre (não significativo) em todos os tecidos avaliados nas traíras expostas ao metal reforçarem essa ideia.

4.3. Efeitos relacionados ao ganho de peso em *H. malabaricus*

A exposição por via trófica ao cobre comumente leva a diminuição do crescimento (revisado por Grosell, 2012), que pode estar associado a diminuição na tomada de alimento (Baker 1998; Shaw e Handy, 2006) ou recusa (Lanno et al., 1985) ou ainda a uma redução da conversão da energia do alimento em biomassa (Hansen et al., 2004; Kang et al., 2005; Lanno et al., 1985). No presente trabalho não foi observado recusa de alimento em ambos os grupos, sendo assim a diminuição do fator de condição das traíras expostas ao cobre pode ter sido devido a uma baixa eficiência de conversão da energia do alimento. No entanto, não houve mobilização do glicogênio, tanto muscular, quanto hepático e da glicose plasmática, o que pode estar associado ao fato dos animais terem sido amostrados 96 h após a última alimentação ou ainda por terem catabolizado reservas energéticas não exploradas no presente estudo como, por exemplo, lipídios e proteínas. Berntssen et al. (1999) ao estudar em alevinos de *Salmon* observaram que a primeira fonte de liberação de energia armazenada em peixes estressados em uma dieta com cobre seria o catabolismo de proteínas e, após, substituída pelo catabolismo do glicogênio. Assim, nós indicamos que estudos futuros sobre a toxicidade do cobre em *H. malabaricus* por via trófica devam mensurar lipídeos e proteínas para um melhor entendimento da mobilização energética desses peixes frente a exposição ao cobre.

Outra hipótese que também não pode ser descartada é a de que o cobre possa ter diminuído o valor nutricional da presa resultando em um menor ganho de peso nas traíras do grupo EXP, uma vez que a exposição aguda a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre (96) levou ao catabolismo do glicogênio muscular em *A. altiparanae* (de Paula et al., 2020).

4.4. Efeitos ionorregulatórios

O transporte de cobre no trato digestório pode ocorrer tanto no estômago quanto no intestino (Nadella et al., 2007; Nadella et al., 2011). No entanto, enquanto nos enterócitos a captação de cobre parece estar atrelada a um gradiente eletroquímico de sódio, tanto in vivo (Kjoss et al., 2005) quanto in vitro, (Nadella et al., 2007), no estômago, o pH ácido parece aumentar a ionização do cobre e garantir o transporte no epitélio gástrico (Nadella et al., 2011). No presente trabalho, estômago e intestino não foram separados, portanto, as considerações serão feitas a respeito do trato gastrointestinal.

O desequilíbrio iônico (aumento de Na^+ e Cl^-) observado no plasma das traíras do grupo EXP no presente estudo, pode estar associado a uma maior tomada do cobre no trato gastrointestinal destes animais. Nos enterócitos de truta a captação de cobre parece ser facilitada por concentrações elevadas de sódio (Nadella et al., 2007). O mecanismo proposto por Nadella et al. (2007) sugere que a captação de Na^+ facilitaria a extrusão de H^+ na membrana apical, seja por um trocador Na^+/H^+ , ou por uma H^+ -ATPase associada a um canal de Na^+ , e a elevada concentração de H^+ na superfície da membrana apical dos enterócitos estimularia a tomada de cobre via um transportador com alta afinidade ao cobre (Ctr 1) ou um transportador de metal divalente (DMT1), ambos estimulados por prótons. Dessa forma, na presença de cobre, a tomada de Na^+ é estimulada na membrana apical do intestino. A atividade da Na^+/K^+ -ATPase por sua vez disponibiliza o Na^+ para o sangue. O Cl^- é captado por cotransporte na membrana apical dos enterócitos ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ e Na^+/Cl^-) e deixa as células por canais de Cl^- na membrana basolateral, pelo simporte K^+/Cl^- ou pelo antiporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. No entanto, Handy et al. (2000) ao bloquearem esses canais de saída do Cl^- na presença de cobre, descobriram um simporte $\text{Cu}/\text{ânion}$ na membrana basolateral com afinidade ao Cl^- . Assim, tanto o aumento de Na^+ no plasma de *H. malabaricus* no grupo EXP (presente estudo) como o aumento do Cl^- pode ser consequência da presença do cobre em maior concentração no lúmen intestinal dos animais expostos, ainda que diferenças estatísticas significativas não tenham sido detectadas na análise de acúmulo do metal.

Hipocalcemia dose dependente também foi observada por de Paula et al. (2020) no plasma de *H. malabaricus* expostos ao cobre via água e a repetição deste resultado na via trófica (presente estudo) torna essa questão intrigante neste modelo biológico. A captação de Ca^{2+} pode ocorrer no intestino por canais de Ca^{2+} presentes na membrana apical dos enterócitos e, em truta arco-íris, o principal transporte deste íon do enterócito para o sistema circulatório ocorre através do antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ na membrana basolateral, sendo que a Ca^{2+} -ATPase apresenta um papel secundário (Baldisserotto et al., 2006). No presente estudo, a diminuição do Ca^{2+} plasmático nas traíras do grupo EXP pode estar associado a um aumento da tomada do cobre, uma vez que, como já discutido anteriormente, a entrada do cobre na célula intestinal está atrelada a captação do Na^+ na membrana apical. Dessa forma, o aumento de Na^+ nos enterócitos pode ter diminuído o gradiente favorável para o antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ na membrana basolateral e consequentemente diminuído a concentração de Ca^{2+} no plasma. No entanto, a inibição da Ca^{2+} -ATPase não pode ser descartada uma vez que o cobre pode ser tóxico para essa bomba (Atli e Canli, 2011).

4.5. Outros efeitos no sangue

Na exposição via água a maior concentração de cobre no sangue está associada a porção plasmática (90% ou mais de todo os níveis de cobre sanguíneo) (Grosell et al., 1997). Por outro lado, segundo alguns autores (Giacomin et al., 2018; Kamunde e Wood, 2003) a exposição por via trófica parece não gerar um aumento dos níveis de cobre no sangue. Surpreendentemente, no presente estudo, o sangue mostrou o tecido com maior acúmulo de Cu entre os tecidos avaliados. O fato de o metal não ter acumulado no plasma indica que o cobre se associou a fração celular sanguínea. Outro fato que corrobora essa premissa são os danos no DNA de eritrócitos evidenciados pelo ensaio do cometa. Este ensaio tem se mostrado bastante sensível na avaliação da toxicidade do cobre uma vez que estudos empregando esta técnica demonstraram que, mesmo em concentrações baixas ($3,2 \mu\text{g L}^{-1}$; $5 \mu\text{g L}^{-1}$), o cobre pode danificar a molécula de DNA em células sanguíneas de peixes (Santos et al., 2010; Simonato et al., 2016).

O cobre pode se ligar diretamente ao DNA e causar danos na estrutura e na funcionalidade dessa molécula (Govindaraju et al., 2013). No entanto, devido ao seu alto poder redox, esse metal pode levar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) via reação de Fenton, as quais podem interagir com o material genético e ocasionar danos oxidativos (Lushchak, 2014).

Em mamíferos, a doença de Wilson é caracterizada por uma desordem no metabolismo do cobre e é comumente relacionada a anemia hemolítica (Daughety e DeLoughery, 2017). A destruição dos eritrócitos nessa condição patológica pode estar associada ao estresse oxidativo desencadeado pela formação elevada de ERO, as quais decorrem das reações de transição do cobre livre (não ligado a ceruloplasmina) (Attri et al., 2006). Dessa forma, ainda que outros biomarcadores de estresse oxidativo não tenham sido avaliados em eritrócitos, no presente estudo, não se pode descartar que a diminuição do RBC e da concentração de Hb possam estar relacionadas aos danos oxidativos observados nas células sanguíneas de *H. malabaricus*.

4.6. Efeitos nas brânquias

Apesar do aumento do Na^+ e do Cl^- encontrados no plasma e da diminuição de Ca^{2+} , não houve diferença na atividade da Na^+K^+ -ATPase, da H^+ -ATPase e da Ca^{2+} -ATPase branquial, indicando que os desbalanços iônicos ocorreram, provavelmente, devido a captação de cobre no trato gastrointestinal (já discutido anteriormente). No entanto, a redução das três enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) avaliadas nas brânquias chamaram a atenção.

Alguns estudos já apontam a relação entre a diminuição das defesas antioxidantes em peixes expostos ao cobre em conjunto com a condição de hipóxia (Sampaio et al., 2007; Zeng et al., 2019). Em condição de hipóxia, a pré-exposição ao cobre promoveu aumento da produção de ERO e comprometimento do tecido hepático na corvina amarela (*Larimichthys crocea*) (Zeng et al., 2019). Esses efeitos foram associados a uma diminuição das defesas antioxidantes e aumento do metabolismo anaeróbico no fígado. Em peixes submetidos a hipóxia em associação com o cobre, os genes que controlam a expressão transcricional das defesas antioxidantes (Nrf2) e do metabolismo energético (HIF-1 α) parecem estar intimamente relacionados (Zeng et al., 2019). Essa relação íntima, se deve ao fato de que ambos os genes apresentam as ERO como molécula importante no seu funcionamento (Archer et al., 2008; Kovac et al., 2015). Uma vez que no presente estudo foi observado anemia nos animais expostos ao cobre, a qual, por sua vez, sugere metabolismo anaeróbio, não se pode descartar que a diminuição das enzimas antioxidantes nas brânquias do grupo EXP pode ser decorrente da modulação das ERO sobre os genes Nrf2 e HIF-1 α .

4.7. Efeitos no fígado

A concentração de PCO é um biomarcador comumente utilizado para verificar estresse oxidativo. As ERO podem interagir com as proteínas formando grupos carbonil e o acúmulo destas proteínas é então mensurado. Por outro lado, ao serem modificadas, essas proteínas podem perder sua funcionalidade e ser degradadas pelo metabolismo celular (Lushchak, 2016). Assim, tanto o aumento como a diminuição das PCO podem indicar estresse oxidativo. Apesar de o fígado ser o principal órgão envolvido na metabolização do cobre, não foi possível observar uma relação mais consistente entre as defesas antioxidantes e danos oxidativos, uma vez que houve apenas uma diminuição pontual da SOD. Assim, os resultados obtidos no presente estudo apontam para estresse oxidativo neste órgão, mas não permitem inferir de forma mais conclusiva sobre a toxicidade do cobre no fígado de animais expostos a este metal por dieta viva.

4.8. Considerações finais

Clearwater et al. (2002) levantaram a preocupação de que estudos com dietas artificiais poderiam estar subestimando a toxicidade do cobre pela via trófica, uma vez que trabalhos com metal naturalmente incorporados a dietas vivas tinham mostrado toxicidade em concentrações muito menores. Assim, nessa mesma revisão os autores sugeriram que estudos com dietas

contaminadas em campo ou preparadas em laboratório de maneira próxima a condições naturais seriam importantes para o avanço nesse conhecimento. Nosso estudo mostra que, de fato, concentrações baixas de cobre quando incorporadas a tecidos biológicos podem ser tóxicas. Além disso, a anemia, os danos no material genético e a diminuição no ganho de peso observados apontam metabolismo energético e estresse oxidativo como questões-chaves a serem estudadas na exposição trófica ao cobre com dieta viva.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o 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 do Paraná. O presente trabalho é parte da tese de doutorado de A. A. de Paula. CBR Martinez é pesquisadora do CNPQ (Processo 307947/2015-7).

Referências

- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotox. Environ. Safe.* 67, 82-88.
- Alves, L.C., Wood, C.M., 2006. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquat. Toxicol.* 78, 217-232.
- Archer, S.L., Gomberg-Maitland, M., Maitland, M.L., Rich, S., Garcia, J.G., Weir, E.K., 2008. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am. J. Physiol.-Heart C.* 294, 570-578.
- Atli, G., Canli, M., 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney, and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology*, 20, 1861-1869.
- Attri, S., Sharma, N., Jahagirdar, S., Thapa, B.R., Prasad, R. 2006., Erythrocyte metabolism and antioxidant status of patients with Wilson disease with hemolytic anemia. *Pediatr. Res.* 59, 593-597.
- Baker, R.T.M. 1998. Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the grey mullet. *Chelon labrosus*. *Mar. Environ. Res.* 45, 357-365.
- Bennemann, S.T., Shibatta, O., 2002. Dinâmica de uma assembléia de peixes do rio Tibagi. In: Medri, M., Bianchini, E., Shibatta, O., Pimenta, J. (Eds.). *A Bacia do rio Tibagi*. Londrina, PR: Eduel. pp. 433-442.
- Bennett, W.A., Sosa, A., Beitinger, T.L. 1995. Oxygen tolerance of fathead minnows previously exposed to copper. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 517-524.
- Berntssen, M.H., Lundebye, A.K., Maage, A., 1999. Effects of elevated dietary copper concentrations on growth: feed utilisation and nutritional status of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. *Aquaculture* 174, 167-181.

- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882-890.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Grune & Straton, New York.
- Bidinotto, P.M., Moraes, G., Souza, R.H.S., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Bol. Téc. Cent. Pesqui. Treinamento Agric.* 10, 53-60.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M., 1998. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: *Free radical and antioxidant protocols*, Humana Press. pp. 377-387.
- Clearwater, S.J., Farag, A.M., Meyer, J.S., 2002. Bioavailability and toxicity of diet borne copper and zinc to fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 132, 269-313.
- Couture, P., Kumar, P.R. 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquat. Toxicol.* 64, 107-120.
- Daughety, M.M., DeLoughery, T.G., 2017. Unusual anemias. *Med. Clin. N. Am.* 101, 417-429.
- DeForest, D.K., Meyer, J.S., 2015. Critical review: toxicity of dietborne metals to aquatic organisms. *Critical Reviews. Environ. Sci. Technol.* 45, 1176-1241.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.T., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Ellman, G.L., Coutney, K.O., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Hansen, J.A., Lipton, J., Welsh, P.G., Cacula, D., MacConnell, B., 2004. Reduced growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a live invertebrate diet pre-exposed to metal-contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1902-1911.
- Giacomin, M., Vilarinho, G.C., Castro, K.F., Ferreira, M., Duarte, R.M., Wood, C., Val, A.L., 2018. Physiological impacts and bioaccumulation of dietary Cu and Cd in a model teleost: The amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquat. Toxicol.* 1999, 30-45.
- Gibbs, A.L.L.E.N., Somero, G.N., 1989. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. *J. Exp. Biol.* 143, 475-492.
- Govindaraju, M., Shekar, H.S., Sateesha, S.B., Raju, P.V., Rao, K.S., Rao, K.S.J., Rajamma, A.J., 2013. Copper interactions with DNA of chromatin and its role in neurodegenerative disorders. *J. Pharm. Anal.* 3, 354-359.
- Grosell, M.H., Hogstrand, C., Wood, C.M., 1997. Cu uptake and turnover in both Cu acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 38, 257-276.
- Grosell, M., McGeer, J. C., Wood, C.M., 2001. Plasma copper clearance and biliary copper excretion are stimulated in copper-acclimated trout. *Am. J. Physiol.* 280, 796-806.
- Grosell, M., 2012. Copper. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.) *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals—Fish Physiology*. Elsevier, San Diego, CA, pp. 54-135.
- Handy, R.D., Musonda, M.M., Phillips, C., 2000. Mechanisms of gastrointestinal copper absorption in the African walking catfish: copper dose-effects and a novel anion-dependent pathway in the intestine. *J. Exp. Biol.* 203, 2365-2377.
- Hansen, J.A., Lipton, J., Welsh, P.G., Cacula, D., MacConnell, B., 2004. Reduced growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a live invertebrate diet pre-exposed to metal-contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1902-1911.
- Hardy, R.W. 1989. Diet preparation. In *Fish Nutrition*. Halver, J.E. (Ed.). San Diego, Academic Press. pp. 475– 548.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Br. J. Haematol.* 25, 563-575.

- Hoyle, I., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Dietary copper exposure in the African walking catfish, *Clarias gariepinus*: transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 83, 62-72.
- Johari, S.A., Sarkheil, M., Asghari, S., Haghghat, F., Dekani, L., Keyvanshokoo, S. 2020. Comparative toxicity of nanoparticulate and ionic copper following dietary exposure to common carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 229, 108680.
- Kamunde, C.M., Wood, C.M., 2003. The influence of ration size on copper homeostasis during sublethal dietary copper exposure in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* 62, 235-254.
- Kang, J.C., Kim, S.G., Jang, S.W., 2005. Growth and hematological changes of rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf) exposed to dietary Cu and Cd. *J. World Aquacult. Soc.* 36, 188-195.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* 20, 6183-6188.
- Kjoss, V.A., Wood, C.M., McDonald, D.G., 2006. Effects of different ligands on the bioaccumulation and subsequent depuration of dietary Cu and Zn in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 63, 412-422.
- Kovac, S., Angelova, P.R., Holmström, K.M., Zhang, Y., Dinkova-Kostova, A.T., Abramov, A.Y., 2015. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *BBA-Gen. Subjects* 1850, 794-801.
- Lanno, R.P., Slinger, S.J., Hilton, J.W., 1985. Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* 49, 257-268.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Method Enzymol.* 233, 346-357.
- Lushchak, V.I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164-175.
- Lushchak, V.I., 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 711-747.
- McCord, J.E., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- Monteiro, D.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L. 2013. Dietary intake of inorganic mercury: bioaccumulation and oxidative stress parameters in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology* 22, 446-456.
- Nadella, S.R., Grosell, M., Wood, C.M., 2007. Mechanisms of dietary Cu uptake in freshwater rainbow trout: evidence for Na-assisted Cu transport and a specific metal carrier in the intestine. *J. Comp. Physiol. B.* 177, 433-446.
- Nadella, S.R., Hung, C.Y., Wood, C.M., 2011. Mechanistic characterization of gastric copper transport in rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B* 181, 27-41.
- Paripatananont, T., Lovell, R.T. 1997. Comparative net absorption of chelated and inorganic trace minerals in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets. *JWAS* 28, 62-67.
- Paripatananont, T., Lovell, R.T., 1995. Chelated Zinc reduces the dietary zinc requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 133, 73-82
- Rios, F.S., Oba, E.T., Fernandes, M.N., Kalinin, A.L., Rantin, F.T., 2005. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Comp. Biochem. Physiol. A* 140, 281-287.
- Sampaio, F.G., de Lima Boijink, C., Oba, E.T., dos Santos, L.R.B., Kalinin, A.L., Rantin, F.T., 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 43-51.

- Santos, E. M., Ball, J. S., Williams, T. D., Wu, H., Ortega, F., Van Aerle, R., Katsiadaki, I., Falciani, F., Viant, M. R., Chipman, J. K., Tyler, C. R., 2010. Identifying health impacts of exposure to copper using transcriptomics and metabolomics in a fish model. *Environ. Sci. Technol.* 44, 820-826.
- Shaw, B.J., Handy, R.D., 2006. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia. *Oreochromis niloticus*. *Aquat. Toxicol.* 76, 111-121.
- Simonato, J.D., Mela, M., Doria, H.B., Guiloski, I.C., Randi, M.A.F., Carvalho, P.S.M., Meletti, P.C., Silva de Assis, H.C., Bianchini, A., Martinez, C.B.R., 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 170, 31-41.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, F., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Mar. Environ. Res.* 44, 69-84.
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Balasubramanian, M.P., 2007. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere*, 69, 979-986.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* 122, 121-129.
- Woodward, D.F., Brumbaugh, W.G., DeLonay, A.J., Little, E.E., Smith, C.E., 1994. Effects on rainbow trout fry of a metals-contaminated diet of benthic invertebrates from the Clark Fork River, Montana. *Trans. Am. Fish. Soc.* 123, 51-62.
- Woodward, D.F., Farag, A.M., Bergman, H.L., DeLonay, A.J., Little, E.E., Smith, C.E., Barrows, F.T., 1995. Metals-contaminated benthic invertebrates in the Clark Fork River, Montana: effects on age-0 brown trout and rainbow trout. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 1994-2004.
- Zeng, L., Ai, C.X., Zheng, J.L., Zhang, J.S., Li, W.C., 2019. Cu pre-exposure alters antioxidant defense and energy metabolism in large yellow croaker *Larimichthys crocea* in response to severe hypoxia. *Sci. Total Environ.* 687, 702-711.

Capítulo IV

Parâmetros fisiológicos e de estresse oxidativo no peixe Neotropical *Geophagus brasiliensis*: uma espécie de origem evolutiva marinha recente

Angélica Alves de Paula, Wagner Ezequiel Risso, Claudia Bueno dos Reis
Martinez



Manuscrito a ser submetido para avaliação no periódico Comparative
Biochemistry and Physiology, Part C

Normas disponíveis em:

<https://www.elsevier.com/journals/comparative-biochemistry-and-physiology-part-c-toxicology-and-pharmacology/1532-0456/guide-for-authors>

**Parâmetros fisiológicos e de estresse oxidativo no peixe Neotropical
Geophagus brasiliensis: uma espécie de origem evolutiva marinha recente**

Angélica Alves de Paula¹, Wagner Ezequiel Risso¹, Claudia Bueno dos Reis Martinez^{1*}

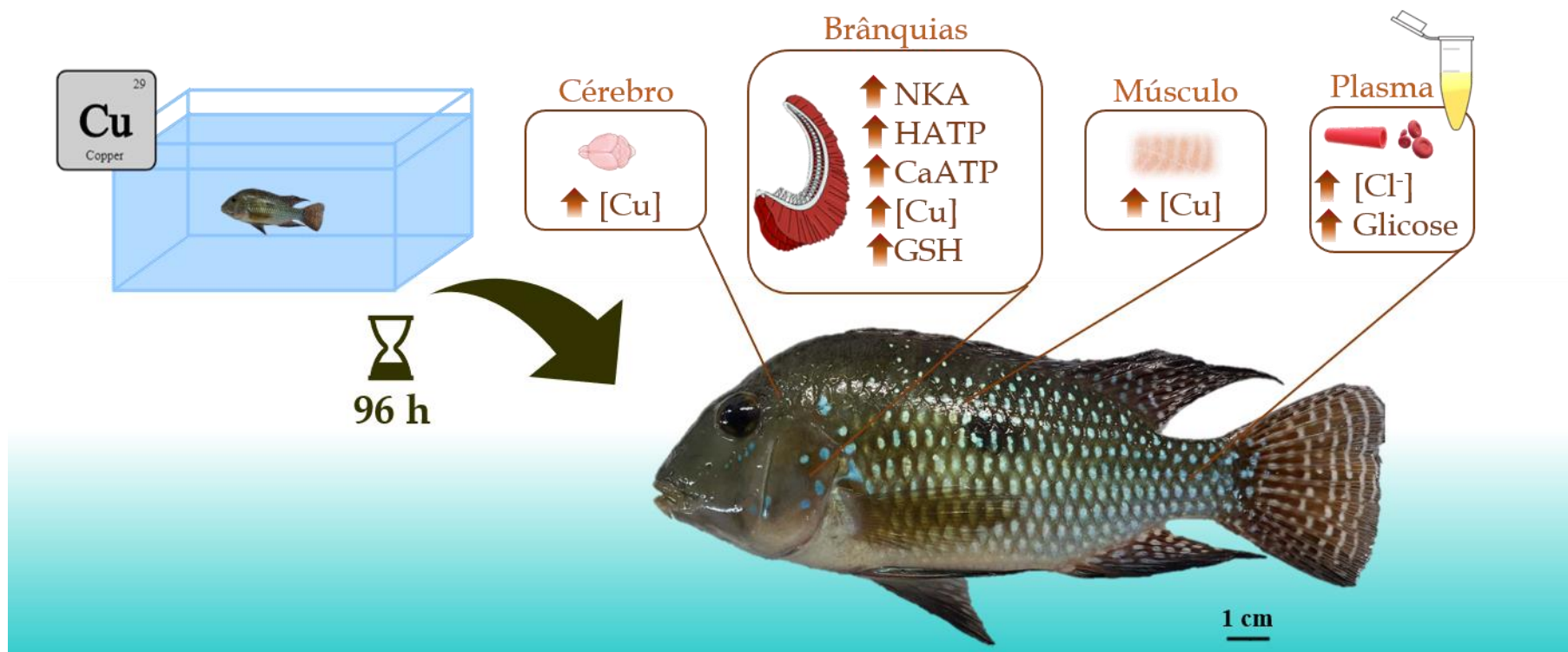
¹Laboratório de Ecofisiologia Animal – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380. C.P. 10011, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil

*Autor correspondente. Tel: +55 43 99994-9275. E-mail: claudiabrmartinez@gmail.com (C. B. R. Martinez)

Highlights

- As brânquias foram o órgão alvo da toxicidade do cobre
- O cobre promoveu aumento da atividade das ATPases branquiais (NKA, HATP e CaATP)
- A exposição ao cobre causou aumento da GSH
- Não houve desequilíbrio do Na⁺ plasmático

Resumo gráfico



Resumo

Os efeitos do cobre em peixes dulcícolas incluem desequilíbrios osmoiológicos, principalmente diminuição do Na^+ e do Cl^- plasmático, e estresse oxidativo, atribuído ao potencial redox deste metal. Uma vez que as características fisiológicas intrínsecas das espécies podem estar associadas a sensibilidade frente a um composto tóxico, no presente estudo, nós avaliamos os efeitos do cobre em *Geophagus brasiliensis*, um peixe eurialino, com elevada capacidade osmorregulatória. O ensaio foi conduzido em água pobre em íons, onde os animais foram mantidos (96 h) em água desclorada (CTR) ou em diferentes concentrações de cobre: $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5), $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 10) e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 20). Após, foram avaliados biomarcadores fisiológicos e de estresse oxidativo. As respostas mais representativas foram constatadas nas brânquias, houve aumento da concentração de cobre neste tecido (grupo Cu 10 e Cu 20) e nos peixes do grupo Cu 20 foi observado um aumento das ATPases branquiais, Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase, as quais parecem ter sido responsáveis pela manutenção dos níveis plasmáticos de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Ao invés da diminuição do Cl^- esperada no plasma, houve aumento da concentração deste íon (grupo Cu 20). Não foram observados danos oxidativos tanto nas brânquias como no fígado, sendo que nas brânquias, um aumento da glutathiona em todos os grupos de exposição ao cobre pode ter sido importante na defesa antioxidante. O metal acumulou no cérebro (Cu 10) e, também, no músculo (Cu 20) dos animais. Os resultados indicam uma baixa sensibilidade de *G. brasiliensis* a toxicidade do cobre e ressalta a importância das características fisiológicas espécie-específicas.

Palavras chave: ionorregulação, glutathiona, peixe eurialino, Na^+/K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase

1. Introdução

Por viverem em um ambiente hiposmótico, os peixes de água doce ganham água por osmose e perdem íons por difusão. Para compensar o ganho de água, estes animais apresentam alta taxa de filtração glomerular, fluxo urinário e reabsorção tubular iônica. Além disso, a perda dos íons é também compensada por mecanismos de captação com gasto de energia nas brânquias, fazendo deste um órgão importantíssimo na manutenção da homeostase desses animais (Evans et al., 2005; Hwang et al., 2011).

Uma vez que estão em contato íntimo com o meio externo, as brânquias acabam sendo alvo de toxicidade de diversos contaminantes. Os metais, por exemplo, podem mimetizar íons essenciais para os peixes, como o Na^+ , Cl^- , K^+ e o Ca^{2+} , e interferir na tomada destes íons ao competir por canais de entrada ou ainda inibir a atividade de bombas iônicas nas células branquiais causando prejuízos a osmorregulação (Wood, 2012).

O cobre é um dos metais mais amplamente encontrado nos ecossistemas aquáticos e seus efeitos na osmorregulação têm sido objeto de estudos em peixes de água doce, visto que este metal pode interferir principalmente na homeostase do Na^+ inibindo a tomada ou aumentando o efluxo deste íon, ou ainda, pela inibição da Na^+/K^+ -ATPase, além de outras enzimas também associadas a tomada do Na^+ como a H^+ -ATPase e a anidrase carbônica (Grosell, 2012; Chowdhury et al., 2016).

No entanto, a sensibilidade a este metal pode depender de habilidades fisiológicas espécie específicas. Duarte et al. (2009) ao estudarem a CL_{50} de dez espécies de peixes amazônicos destacaram as espécies da família Cichlidae como menos sensíveis a toxicidade do cobre e atribuíram esta baixa sensibilidade a características fisiológicas específicas e a composição química da água.

Geophagus brasiliensis (Quoy e Gaimard, 1824) é uma espécie da família Cichlidae conhecida popularmente como Acará e amplamente distribuída nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (CESP, 2006). Essa espécie tem sido amplamente utilizada em estudos ecotoxicológicos, os quais a validam como bom modelo biológico (Land et al., 2018; Calado et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Venturoti et al., 2019; Calado et al., 2020). Os ciclídeos são animais de água doce, mas várias espécies habitam águas salobras e são consideradas eurialinas; o Acará, por exemplo, pode tolerar variações de salinidade sendo apontado até mesmo como um potencial bioinvasor de ambiente marinho (Freire et al., 2008; De Graaf e Coutts, 2010).

Nos peixes eurialinos, os eventos moleculares e bioquímicos que acompanham a mudança de salinidade são espécie específicos, mas, geralmente envolvem regulação da expressão e atividade de transportadores iônicos nas células branquiais como a Na^+/K^+ -ATPase, o cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, canais de cloreto, a H^+ -ATPase e o trocador Na^+/H^+ (Evans et al., 2005; Evans, 2011).

Uma vez que *G. brasiliensis* é uma espécie eurialina e, portanto, pode ter uma alta capacidade de regulação dos transportadores branquiais e que, por outro lado, o cobre afeta a ionorregulação, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do cobre em *G. brasiliensis* por meio de biomarcadores fisiológicos como as ATP-ases brânquias, concentração iônica, parâmetros hematológicos, glicose e glicogênio, além de investigar o aumento da concentração de cobre nos tecidos e a capacidade deste metal de causar estresse oxidativo nesta espécie.

2. Material e Métodos

2.1. Aclimação

Adultos de *G. brasiliensis* ($n = 64$; $11,26 \pm 0,31$ cm; $29,39 \pm 2,80$ g; média \pm EP) foram adquiridos de pisciculturas da região (Paraná, Brasil). No laboratório os peixes foram aclimatados durante 15 dias em tanques de 500 L, contendo água limpa e desclorada, aeração constante (> 75 % de saturação), fotoperíodo e 12 h claro: 12 h escuro, pH (~ 7) e temperatura controlada (~ 25 °C). Durante este período, os peixes foram alimentados a cada 24 h com ração comercial (Pirá Mirim QS 1,7 mm, Guabi), sendo a alimentação suspensa 48 h antes do início dos experimentos.

2.2. Desenho experimental e amostragem

Após aclimação, os animais foram submetidos a testes semiestáticos (renovação de 75% em 48h) agudos (96h), em aquários individuais, contendo apenas água desclorada (CTR; $n = 8$) ou cobre nas concentrações nominais de: $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5; $n = 8$), $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 10; $n = 8$) e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 20; $n = 8$). As concentrações foram escolhidas por abrangerem os limites estabelecidos pela legislação brasileira para água doce (9 e $13 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu dissolvido – CONAMA 357/2005).

Foram feitos dois experimentos com réplicas independentes, cada uma com o seu respectivo controle, a fim de obter a quantidade de tecido necessária para todas as análises. No experimento 1 (EXP 1) os tecidos foram processados para análise da concentração de Cu e de metalotioneínas e no experimento 2 (EXP 2) foram analisados os demais biomarcadores.

Decorrido uma hora da adição do metal na água os peixes foram transferidos para aquários individuais de 40 L, onde permaneceram por 96 h. Durante os experimentos, dureza, temperatura, pH, oxigênio e condutividade se mantiveram constantes ($26,71 \pm 0,34 \text{ CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$; $24,00 \pm 0,04 \text{ }^\circ\text{C}$; $8,42 \pm 0,01$; $6,46 \pm 0,05 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$; $94,31 \pm 0,43 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$; média \pm EP) e não houve diferença para esses parâmetros entre as réplicas experimentais e tampouco entre os grupos experimentais de cada réplica.

Após o período experimental, os animais foram anestesiados em benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e tiveram o sangue retirado pela veia caudal. Em seguida, foram mortos por secção medular para remoção de brânquias, fígado, trato gastrointestinal, rim, cérebro, músculo e osso, os quais foram armazenados a $-72 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das análises de biomarcadores.

Todos os procedimentos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 4547.2018.48).

2.3. Cobre na água dos aquários

Amostras de água foram coletadas todos os dias em tubos de 15 ml para análise da concentração do Cu total (não filtrada) e dissolvido (filtrada em poro $0,45 \text{ } \mu\text{m}$). Após a coleta, as amostras foram prontamente acidificadas (HNO_3 1%) e refrigeradas até a análise em espectrofotômetro de absorção atômica com atomizador de forno de grafite (Perkin Elmer, AAnalyst 700, EUA). Os resultados obtidos foram comparados com soluções padrão de referência (SpcoSol, Brazil) (limite de detecção de $0,014 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$).

2.4. Metais nos tecidos de *G. brasiliensis*

A determinação da concentração de Cu em brânquias, fígado, trato gastrointestinal, rim, cérebro, músculo e osso seguiu o protocolo de Alves e Wood (2006). Os tecidos foram completamente secos a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e posteriormente, na mesma temperatura, submetidos a digestão em ácido nítrico suprapuro (5N) por 48h. Após digestão, a concentração de Cu foi medida em espectrofotômetro de absorção atômica equipado com forno de grafite (Perkin Elmer, AAnalyst 700, EUA).

2.5. Biomarcadores

➤ *Parâmetros hematológicos*

A dosagem de hemoglobina (Hb) no sangue total foi feita em espectrofotômetro (540 nm) com auxílio de kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil). O hematócrito (Hct) foi lido em cartão padronizado após centrifugação de alíquotas de sangue em microcapilares de vidro e a contagem das células sanguíneas (RBC) foi feita em câmara de Neubauer sob microscópio de luz.

➤ *Íons plasmáticos*

Os íons Na^+ e K^+ foram medidos em fotômetro de chama (Digimed DM-62, Brasil), enquanto a concentração de Ca^{2+} e Mg^{2+} foram mensuradas em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer, A700, EUA) com atomizador de chama. O Cl^- plasmático foi quantificado com auxílio de kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil).

➤ *ATPases branquiais*

Conforme proposto por Gibbs e Somero (1989), a atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e H^+ -ATPase (HATP) foram determinadas pela quebra do ATP, em extratos de brânquias incubados em meios de reação com ou sem inibidores (ouabaína e N-etilamida), em presença da piruvato quinase e da lactato desidrogenase. A atividade da Ca^{2+} -ATPase (CaATP) foi determinada pela liberação de fosfato inorgânico em amostras incubadas em solução com ou sem ATP, segundo Vijayavel et al. (2007). A atividade da anidrase carbônica (AC) foi monitorada pelo decaimento do pH resultante da liberação de H^+ fornecido pela catálise de uma solução saturada de CO_2 segundo Vitale et al. (1999).

➤ *Glicose plasmática, glicogênio muscular e hepático*

A glicose plasmática foi determinada com utilização de kit comercial (Doles Reagentes Ltda, Brasil). Para determinação do glicogênio muscular e hepático os tecidos seguiram as etapas de digestão, hidrólise e precipitação de acordo com Bidinotto et al. (1998) e posterior ressuspensão do precipitado em água para avaliação do teor de açúcares redutores segundo Dubois et al. (1956).

➤ *Defesas antioxidantes*

As enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST) foram avaliadas em brânquias e fígado, assim como a concentração de tióis não proteicos (GSH). As proteínas semelhantes a metalotioneínas (MT) foram avaliadas apenas no fígado.

A atividade da CuZn-SOD foi determinada pela inibição da redução do citocromo c pelo radical superóxido a 550 nm (McCord e Fridovich, 1969). A atividade da CAT foi monitorada pelo decaimento da absorvância (240 nm) decorrente da quebra do H₂O₂ (Beutler, 1975). A atividade da GPx foi estimada indiretamente pelo decaimento da absorvância (340 nm) do NADPH em presença da glutathione redutase (GR), GSH e H₂O₂ conforme Hopkins e Tudhope (1973). A determinação da atividade da GST seguiu protocolo de Keen et al. (1976), pelo qual a complexação da GSH com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) foi monitorada em espectrofotômetro (340 nm). A concentração de GSH foi avaliada em espectrofotômetro (412 nm) pela quantificação de tiolatos formados pela reação entre os grupamentos tióis e o reagente de Ellman's após tratamento ácido (Beutler et al., 1963). O conteúdo MT foi medido de acordo com Viarengo et al. (1997) pela quantificação dos grupos tióis, em espectrofotômetro (412 nm), após fracionamento com etanol e clorofórmio.

➤ *Danos oxidativos*

Os danos oxidativos foram avaliados por meio da lipoperoxidação (LPO) e da concentração de proteínas carboniladas (PCO) em brânquias e fígado.

A LPO foi determinada pelo ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo Camejo et al (1998). Para tanto, após incubação do sobrenadante com o ácido tiobarbitúrico (1,3%) foi realizada leitura de fluorescência em espectrofotômetro (ex/em: 535/590 nm). A concentração de PCO foi quantificada (360 nm) pela formação de dinitrofenil hidrazonas em presença de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) segundo Levine et al. (1994).

➤ *Acetilcolinesterase*

A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) muscular e cerebral foi determinada de acordo com Ellman et al. (1961) a partir da quebra do iodeto de acetilcolina na presença de reagente de 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e leitura em espectrofotômetro (415 nm).

➤ Proteínas totais

Com exceção do glicogênio, todos os biomarcadores medidos no fígado e no músculo e, também, brânquias e cérebro foram expressos em relação ao conteúdo total de proteínas, determinado a 595 nm pelo protocolo proposto por Bradford (1979).

2.6. Análises estatísticas

As premissas de normalidade (Shapiro Wilk) e homocedasticidade (Levene's) foram verificadas e, após, os valores médios de cada parâmetro, para cada órgão, foram comparados entre os quatro grupos (CTR, Cu 5, Cu 10 e Cu 20) por meio de análise de variância paramétrica (ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Para todos os testes, foram consideradas significativas diferenças com valor de $p < 0,05$. Os resultados apresentados em gráficos e tabelas representam média \pm EP.

A fim de observar se houve correlação entre as concentrações nominais de cobre e os valores da atividade das ATPases, foi calculado o coeficiente de determinação (r^2).

3. Resultados

3.1. Concentração de cobre na água

As concentrações de cobre total dos grupos Cu 5 e Cu 10 ficaram muito próximas as concentrações nominais, diferindo apenas 7% do valor esperado. No grupo Cu 20 essa variação foi um pouco mais alta, sendo a concentração obtida 20% menor do que a concentração nominal. No entanto, vale destacar que a concentração de cobre dissolvido de $12,79 \mu\text{g L}^{-1}$ obtida para o grupo Cu 20 é muito relevante, uma vez que o valor estabelecido pela legislação brasileira (CONAMA/357) é de $13 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas destinadas ao consumo humano, após tratamento convencional e avançado, e à pesca amadora (Tabela 4.1). Vale ainda destacar que houve um gradiente de concentração nos grupos experimentais (Cu 20 > Cu 10 > Cu 5 > CTR). Para simplificar, ao longo do texto, as concentrações de cobre serão referidas pelos valores das concentrações nominais.

Tabela 4.1. Concentração de cobre total (Cu T) e dissolvido (Cu D) (média \pm EP; n = 21-22) mensuradas nas águas do grupo controle (CTR) e dos grupos expostos ao cobre nas concentrações nominais de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5), 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 10) e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 20) onde os peixes foram mantidos por 96 h.

CTR		Cu 5		Cu 10		Cu 20	
Cu T	Cu D	Cu T	Cu D	Cu T	Cu D	Cu T	Cu D
1,46	1,01	5,37	3,55	9,28	7,23	15,86	12,79
$\pm 0,09$	$\pm 0,11$	$\pm 0,46$	$\pm 0,23$	$\pm 0,50$	$\pm 0,73$	$\pm 0,53$	$\pm 0,70$

3.2. Acúmulo de cobre nos tecidos de *G. brasiliensis*

A concentração de cobre aumentou nas brânquias de *G. brasiliensis* expostos as concentrações nominais de 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, no músculo dos animais expostos a maior concentração do metal e no cérebro dos acarás do grupo Cu 10 (Fig. 4.1).

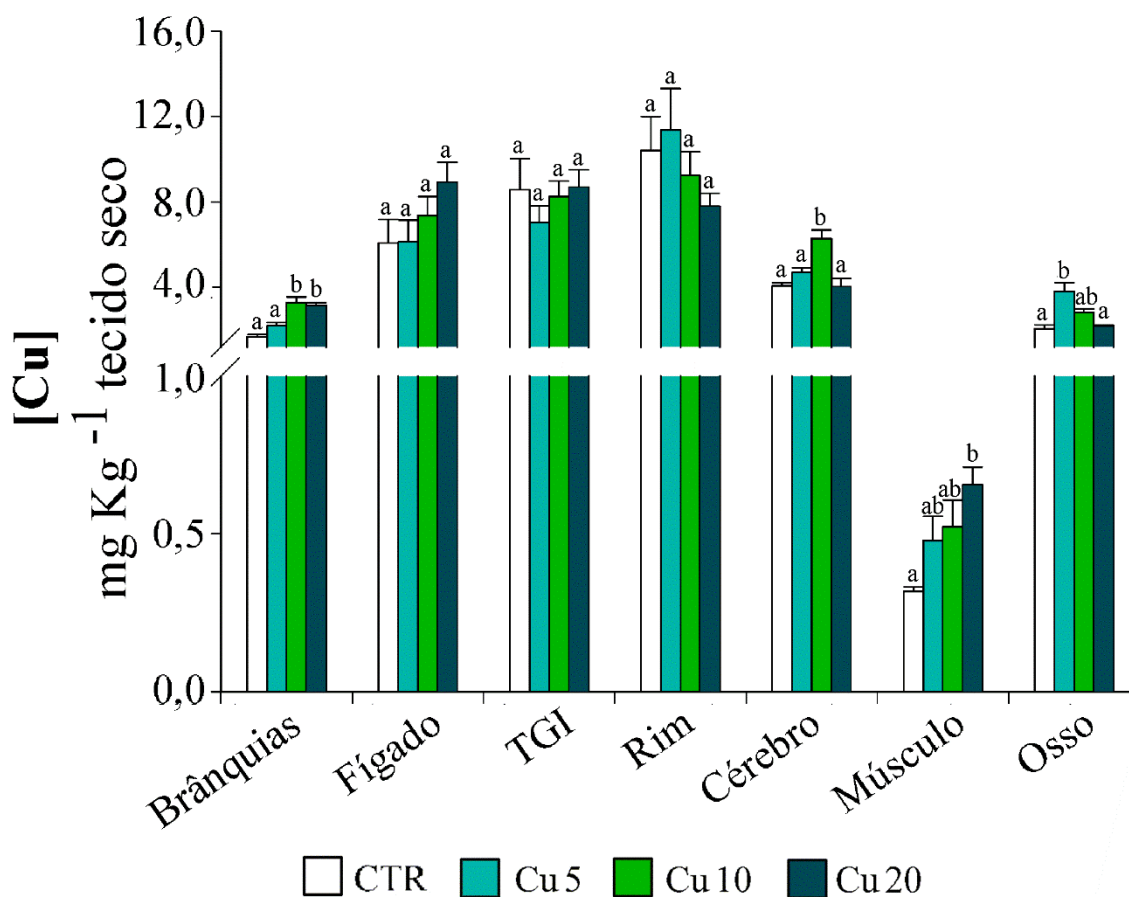


Figura 4.1. Concentração de cobre em diferentes tecidos de *G. brasiliensis* mantidos por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostos ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média \pm EP (n = 7-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Brânquias e cérebro ($p < 0,001$); músculo ($p = 0,009$).

3.3. Parâmetros fisiológicos

Ao longo dos experimentos, não foi registrada a morte de nenhum animal em nenhum dos grupos experimentais.

Quando comparados ao grupo CTR, não foram constatadas alterações significativas nos parâmetros hematológicos avaliados (Fig. 4.2A, 4.2B e 4.2C).

Em relação aos íons plasmáticos, a exposição ao cobre promoveu apenas um aumento na concentração de Cl^- nos peixes do grupo Cu 20 (Fig. 4.3C), não sendo observadas alterações nas concentrações de Na^+ (Fig. 4.3A), K^+ (4.3B) e Ca^{2+} (4.3D). Por outro lado, as ATPases branquiais, NKA, HATP e CaATP, dos acarás expostos a maior concentração de cobre, mostraram-se responsivas ao metal, apresentando um aumento da atividade quando comparadas aos respectivos grupos CTR (Fig. 4.4A, 4.4B e 4.4C). Embora o grupo Cu 10 não tenha apresentado aumento significativo das ATPases branquiais em relação ao grupo CTR, a atividade destas enzimas foi semelhante às do grupo Cu 20 (Fig. 4.4A, 4.4B e 4.4C). Vale ainda destacar que, nos grupos de exposição ao cobre, Cu 5, Cu 10 e Cu 20, foi observado um aumento dose dependente da NKA ($r^2 = 0,96$), da HATP ($r^2 = 0,99$) e da CaATP ($r^2 = 0,97$) (Fig. 4.4A, 4.4B e 4.4C). Nenhuma alteração foi verificada na atividade da AC (Fig. 4.4D).

Foi observado um aumento da glicemia dos animais expostos a concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 4.5A). No entanto, nenhuma alteração foi constatada na concentração de glicogênio, tanto no músculo quanto no fígado dos animais expostos ao cobre (Fig. 4.5B).

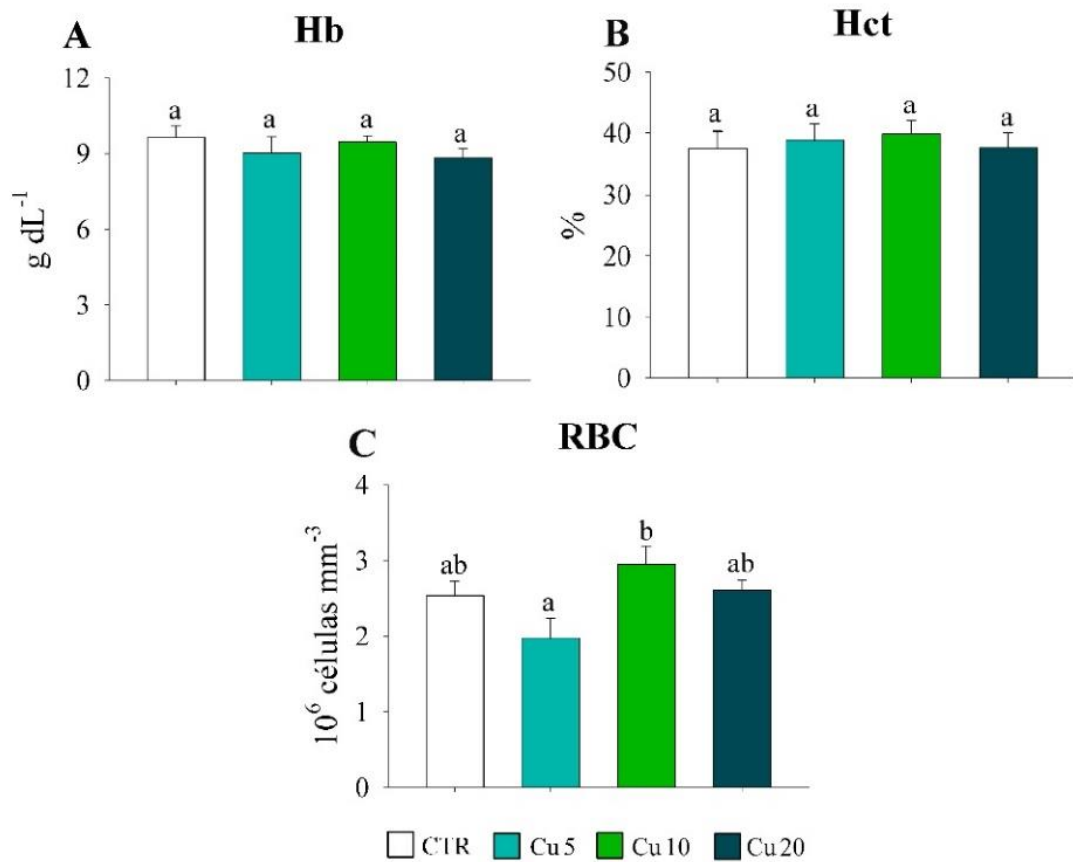


Figura 4.2. Concentração de hemoglobina (Hb) (A), hematócrito (Hct) (B) e número de células vermelhas (RBC) (C) no sangue de *G. brasiliensis* mantidos por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostos ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média \pm EP (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

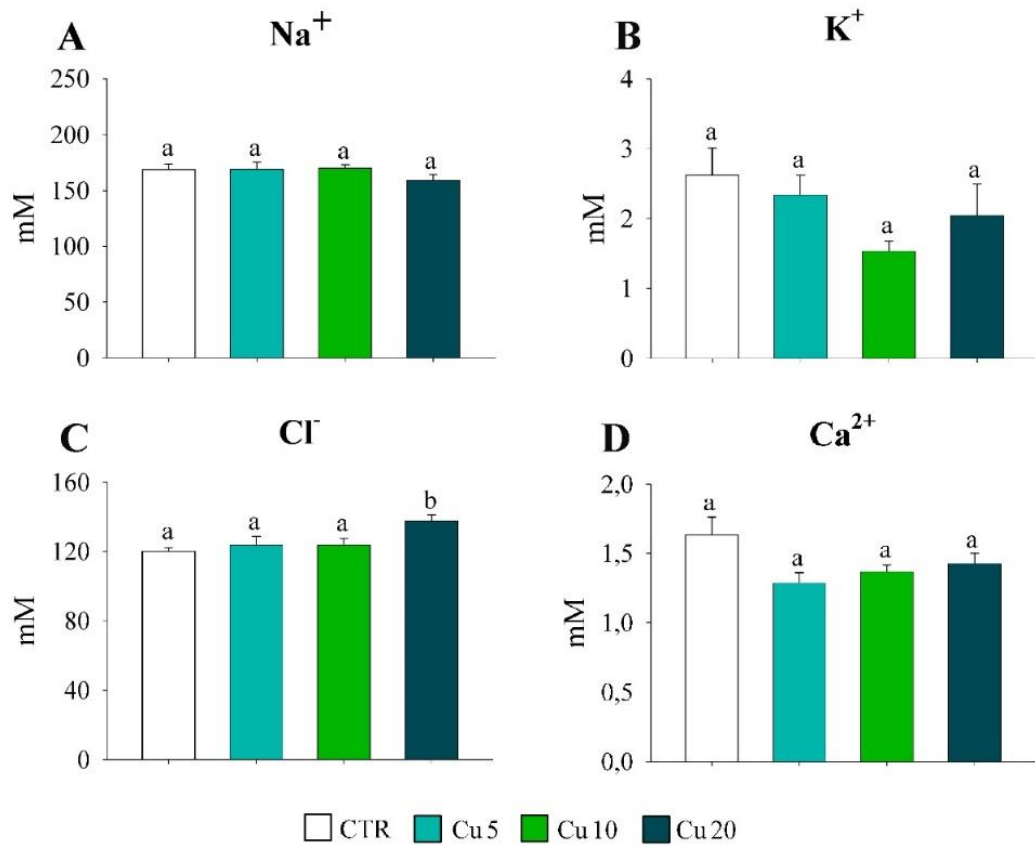


Figura 4.3. Concentração plasmática de Na⁺ (A), K⁺ (B), Cl⁻ (C) e Ca²⁺ de *G. brasiliensis* mantidos por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostos ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 µg L⁻¹ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média ± EP (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p < 0,05). Cloreto (p = 0,016).

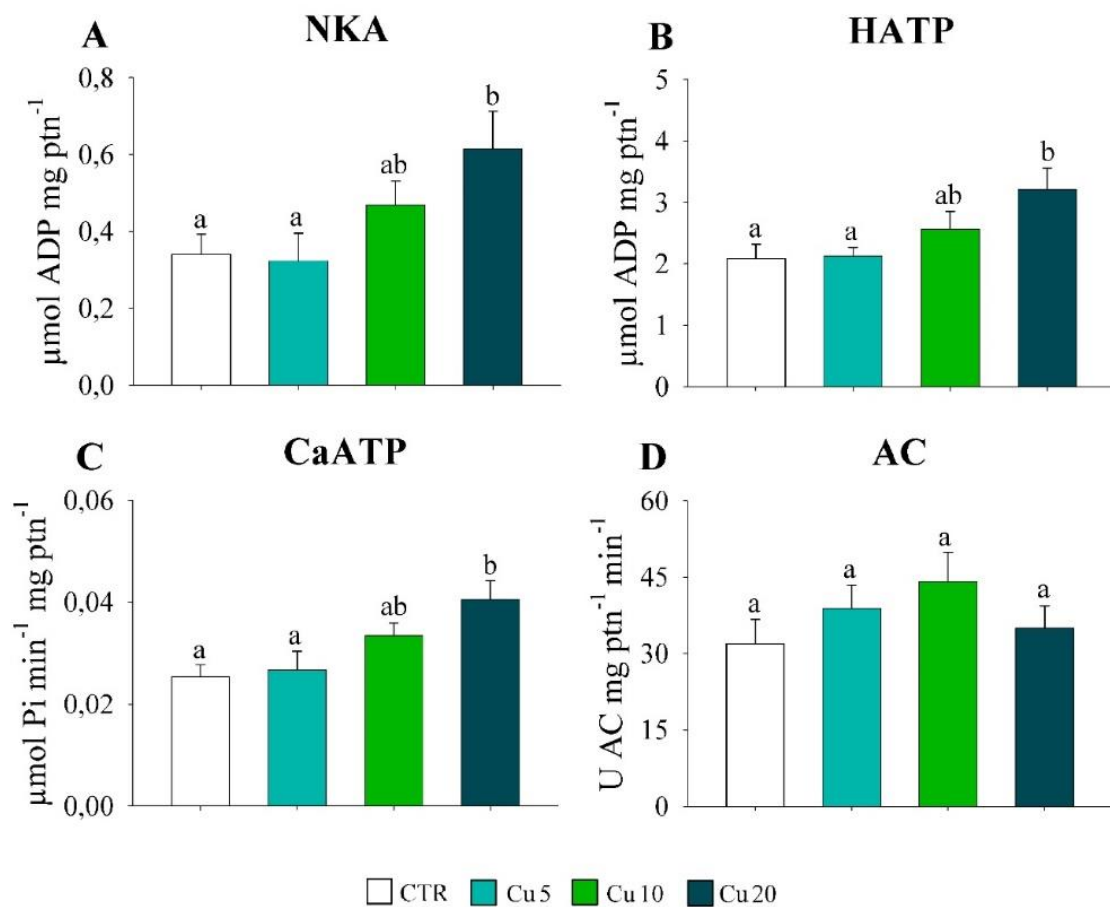


Figura 4.4. Atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) (A), H^+ -ATPase (HATP) (B), Ca^{2+} -ATPase (C) e Anidrase Carbônica (AC) no tecido branquial de *G. brasiliensis* mantidos por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostos ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média \pm EP (n = 7-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). NKA ($p = 0,032$); HATP ($p = 0,024$); CaATP ($p = 0,006$).

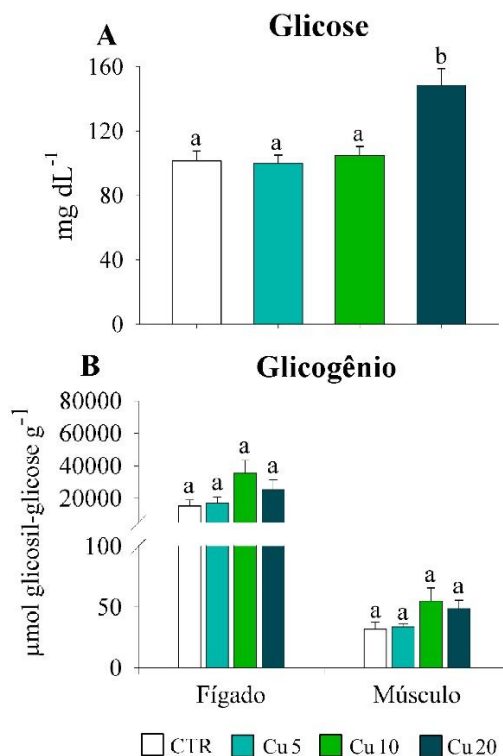


Figura 4.5. Concentração da glicose plasmática (A) e do glicogênio hepático e muscular de *G. brasiliensis* mantidos por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostos ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média \pm EP (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Glicose ($p < 0,001$).

3.4. Defesas antioxidantes e danos em biomoléculas

De todas as defesas antioxidantes avaliadas cabe destacar a GSH, uma vez que foi observado um aumento da concentração deste tripeptídeo nas brânquias dos acarás dos três grupos de exposição ao cobre (Cu 5, Cu 10 e Cu 20) (Fig. 4.6E). Por outro lado, o cobre não promoveu alterações na atividade das enzimas antioxidantes primárias, SOD, CAT e GPx e tampouco da GST, tanto nas brânquias quanto no fígado de *G. brasiliensis* (Fig. 4.6A, 4.6B, 4.6C e 4.6D), assim como não houve diferença na concentração de GSH do fígado dos animais expostos ao metal (Fig. 4.6E).

Não foi observada alteração significativa na concentração hepática de MT (Fig. 4.7). Assim como não foi verificada carbonilação de proteínas no fígado de *G. brasiliensis* exposto ao cobre (Fig. 4.8A) e lipoperoxidação nas brânquias e no fígado dos animais expostos ao metal (Fig. 4.8B).

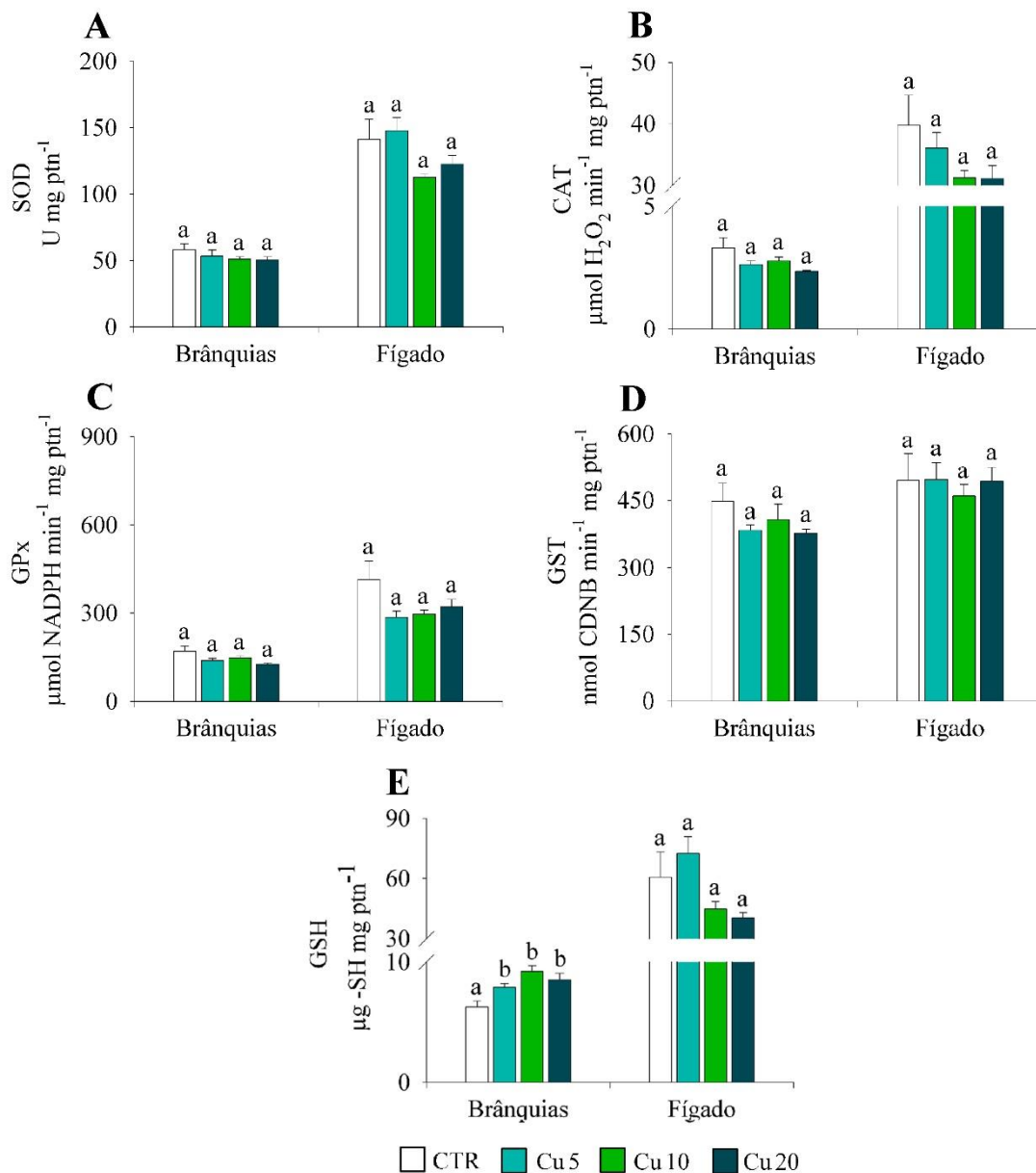


Figura 4.6. Atividade das enzimas: superóxido dismutase SOD (A), catalase (CAT) (B), glutaciona peroxidase (GPx) (C) e glutaciona S-transferase (GST) (D) e concentração de glutaciona (GSH) (E) em brânquias e fígado de *G. brasiliensis* mantidos por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostos ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 μg L⁻¹ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média ± EP (n = 6-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p < 0,05).

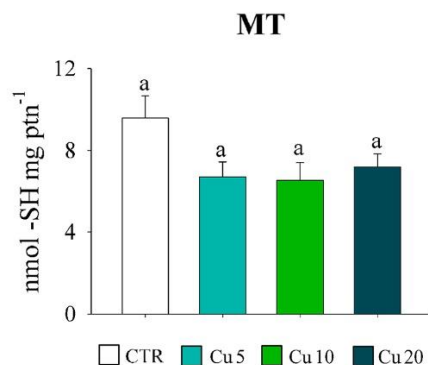


Figura 4.7. Concentração de proteínas semelhantes as metalotioneínas (MT) em fígado de *G. brasiliensis* mantidos por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostos ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média \pm EP (n = 6-8). As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

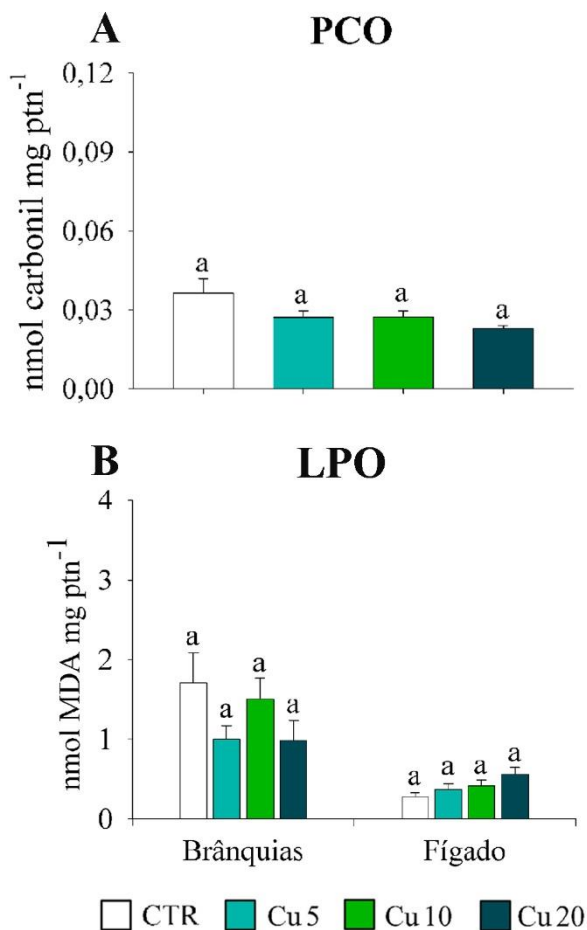


Figura 4.8. Concentração de proteínas carboniladas (PCO) em fígado (A) e lipoperoxidação (LPO) no tecido branquial e hepático (B) de *G. brasiliensis* mantidos por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostos ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média \pm EP (n = 7-8). As letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

3.5. Acetilcolinesterase

Não foram observadas diferenças significativas na atividade da AChE tanto cerebral, quanto muscular, dos grupos de acaráis expostos ao cobre quando em comparação ao grupo CTR (Fig. 4.9).

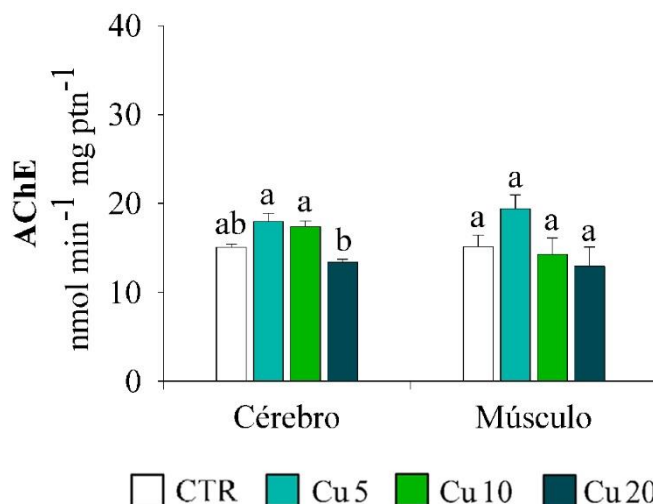


Figura 4.9 – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) cerebral e muscular em *G. brasiliensis* mantidos por 96 h em água desclorada (CTR) ou expostos ao cobre nas concentrações nominais de 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20). Os dados representam média \pm EP (n = 7-8). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

4. Discussão

4.1. Parâmetros fisiológicos nas brânquias e no plasma

A fisiologia dos animais tem um papel decisivo em determinar a sensibilidade de um organismo ao cobre (Blanchard e Grosell, 2006). Assim, as características fisiológicas apresentadas por *G. brasiliensis* podem estar estritamente relacionadas com os resultados obtidos no presente estudo. Esta espécie apresenta alta capacidade osmorregulatória e de manutenção da homeostase plasmática a qual pode ser atribuída ao histórico evolutivo deste grupo de peixes, uma vez que os Perciformes têm sua origem primária no ambiente marinho com grupos, como os Cichlideos, tendo colonizado posteriormente ambientes de água doce (Chakrabarty, 2004; Sparks e Smith, 2004; Freire et al., 2008; Gutierre et al., 2014;). No presente estudo, os peixes do grupo Cu 20 apresentaram aumento das principais ATPases branquiais e manutenção da concentração dos íons plasmáticos (Na^+ e Ca^{2+}) ou até mesmo aumento (Cl^-) contrapondo os efeitos esperados para toxicidade do cobre.

Como já mencionado anteriormente, o cobre pode mimetizar o Na^+ reduzindo dessa forma a captação desse íon (Wood, 2012). Uma das vias de tomada de Na^+ nas brânquias envolve

canais dependentes de um gradiente eletroquímico, o qual é fornecido pela HATP ao bombear íons H^+ para superfície externa das células branquiais. Uma vez no interior da célula o Na^+ é transportado para o sangue por ação da NKA (Evans, 2011). Peixes estuarinos utilizam, em água salobra, um mecanismo neutro de captação iônica, o cotransportador Na^+/Cl^- (NCC), ou trocadores iônicos para captar Na^+ e Cl^- (Evans et al., 2005; Evans 2011) enquanto que em água pobre em íons o mecanismo de alta afinidade na tomada de NaCl envolvendo HATP (tipo V) é requerido, embora muitos peixes estuarinos não o utilizem, limitando o acesso desses animais à água doce (Marshall, 2012). Dessa forma, é possível inferir que uma maior atividade da NKA e da HATP observada pode ter sido decisiva na manutenção dos níveis normais de Na^+ no plasma de *G. brasiliensis* do grupo Cu 20 e que este mecanismo de captação do Na^+ possa representar um papel crucial na fisiologia dessa espécie quando em ambiente de água doce.

Os prejuízos na tomada do Na^+ e do Cl^- ocasionados pela exposição ao cobre podem ser apontados como a causa da mortalidade em teleósteos dulcícolas (Grosell et al., 2002). A diminuição de Cl^- plasmático, em estudos com peixes de água doce expostos ao cobre, sugere a interferência na tomada deste íon (revisado por Grosell, 2012). Além disso, ao interferir nas junções paracelulares, por causar o deslocamento do Ca^{2+} , o cobre pode levar ao aumento da perda de Na^+ pela via paracelular e, também, do Cl^- (Lauren e McDonald, 1985). No entanto, a exposição ao cobre não promoveu prejuízos na concentração Cl^- e, contrariamente, foi constatado aumento da concentração plasmática desse íon nos acarás do grupo Cu 20, indicando que, possivelmente, os transportadores deste íon não foram comprometidos e tampouco a via paracelular foi prejudicada em *G. brasiliensis*. Além disso, Gonzalez et al. (2002) observaram que *Geophagus* apresenta uma baixa permeabilidade iônica branquial, o que pode ter contribuído para manutenção dos níveis de Na^+ no plasma.

O cobre pode interferir na regulação do Ca^{2+} promovendo hipocalcemia em peixes de água doce, que pode se dar em decorrência do efeito do metal sobre a atividade da CaATP (Atli e Canli, 2011). Redução no cálcio plasmático já foi observado em adultos de *Danio rerio* submetidos a concentrações de cobre maiores do que as utilizadas no presente estudo ($150 \mu g L^{-1}$ e $250 \mu g L^{-1}$) (Aslop e Wood, 2011). No entanto, a exposição de *H. malabaricus* a concentrações nominais de cobre iguais às deste estudo levou a uma hipocalcemia dose dependente, mesmo com um aumento na atividade da CaATP (de Paula et al., 2020 – capítulo 1). Estes autores sugeriram que cobre pode interferir na regulação do cálcio por outras vias, as quais ainda não são bem compreendidas. No presente estudo, a ativação da CaATP branquial

em *G. brasiliensis* do grupo Cu 20 pode ter se dado para proteger o peixe dos efeitos tóxicos do cobre, garantindo nesta espécie a manutenção do Ca^{2+} plasmático.

4.2. Acúmulo do metal

No presente estudo nós avaliamos a concentração de cobre em vários tecidos: brânquia, fígado, trato gastrointestinal, rim, cérebro, músculo e osso. O aumento da concentração do cobre foi observado apenas em brânquias (Cu 10 e Cu 20), músculo (Cu 20) e cérebro (Cu 10) de *G. brasiliensis*. Na exposição ao cobre via água a transferência do metal da água para o peixe se dá principalmente pelas brânquias, sendo este o órgão que primariamente acumula o metal. Com o aumento da concentração ou do tempo de exposição o cobre pode acumular no fígado, órgão responsável pela detoxificação e homeostase do metal e, então, é distribuído para outros tecidos (Grosell, 2012). Além da dependência do tempo e da dose, o acúmulo do cobre pode também ser espécie específico. Em *Astyanax altiparanae* exposto a concentração nominal de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ($13,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre dissolvido) por 96 h em condições similares de temperatura, pH, oxigênio e dureza as do presente estudo o cobre acumulou em brânquias, trato gastrointestinal e fígado dos animais (de Paula et al., 2020). Nesse mesmo estudo, o cobre acumulou na brânquia até mesmo na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ o que mostra uma maior sensibilidade dessa espécie ao acúmulo deste metal do que a encontrada para *G. brasiliensis*.

O musculo não costuma ser um órgão alvo para o acúmulo do cobre na exposição aguda na faixa de concentração testada neste estudo (5 a $20 \mu\text{g L}^{-1}$) (Mazon e Fernandes, 1999; de Paula et al., 2020; Roda et al., 2020; Tesser et al., 2020), sendo que o acúmulo do cobre neste tecido parece ser tempo dependente (Oss et al., 2013; Wong et al., 1999). Dessa forma o inesperado acúmulo no músculo de *G. brasiliensis* em apenas 96 h de exposição chama atenção e pode representar um risco para saúde humana uma vez que essa espécie apresenta importância na pesca artesanal (da Silva et al., 2009).

Assim como para o músculo, o acúmulo de cobre no cérebro nos animais (grupo Cu 10) também não era esperado. Ao estudar a exposição de *Colossoma macropomum* ao cobre por via trófica, Giacomini et al. (2018) não encontraram acúmulo do metal no cérebro. No entanto, os autores destacaram a elevada concentração de cobre nesse tecido nos animais CTR quando em comparação com outros tecidos avaliados (brânquia, estômago, intestino). Assim, ainda que pontual, o acúmulo no cérebro observado em *G. brasiliensis* pode indicar este órgão como importante na avaliação da toxicidade do cobre.

4.3. Outros efeitos

O efeito potencial de causar estresse oxidativo do cobre advém da formação de oxidantes via reação de Fenton. Importante na defesa antioxidante, a glutatona, por sua vez, atua na primeira linha de defesa celular contra os processos de oxidação. Esse tripeptídeo pode se ligar a espécies reativas de oxigênio neutralizando-as e prevenindo danos oxidativos em moléculas celulares (Lushchak, 2016). No presente estudo, pode-se inferir que a GSH tenha desempenhado papel importante na defesa antioxidante do tecido branquial, já que foi observado aumento na concentração branquial de GSH em todas as concentrações de cobre testadas sem que ocorresse lipoperoxidação e tampouco ativação da CAT, SOD ou GPx neste órgão.

Não foram observadas alterações nas defesas antioxidantes no fígado de *G. brasiliensis* e tampouco danos oxidativos. O fígado é o principal órgão envolvido na homeostase do cobre e, desta forma, pode ser também alvo da toxicidade deste metal (Mazon e Fernandes, 1999). Em *Prochilodus lineatus*, a exposição aguda (96 h) ao cobre a concentrações semelhantes as testadas em nosso trabalho (9 e 13 $\mu\text{g L}^{-1}$), ocasionaram aumento das MT e da SOD, as quais não foram suficientes para prevenir estresse oxidativo no fígado, constatado pelo aumento da LPO (Simonato et al., 2016). Em exposição semelhante ao cobre, o fígado de *A. altiparanae* demonstrou estresse oxidativo (LPO) a qual em conjunto com as respostas de distúrbios iônicos (hiponatremia) e danos em eritrócitos foi relacionada a alta sensibilidade desta espécie ao cobre (de Paula et al., 2020). Assim, as concentrações testadas não foram suficientes para causar estresse oxidativo tanto nas brânquias quanto no fígado de *G. brasiliensis*.

Apesar da concentração de glicogênio muscular e hepático dos acarás não ter sido alterada pela exposição ao cobre, um aumento da glicemia foi observado, demonstrando uma possível resposta de estresse neste animal. A resposta de estresse na exposição ao cobre pode colaborar para manutenção da homeostase do Na^+ em peixes expostos a este metal (De Boeck et al., 2001). Durante este período, o cortisol atua mantendo elevado os níveis de glicose no sangue, ocasionando a proliferação e diferenciação das células de cloreto, promovendo assim a tomada do Na^+ , principalmente pela ação da NKA branquial (Wendelaar Bonga, 2011). Apesar desse hormônio não ter sido avaliado no presente estudo, o aumento do cortisol já foi observado em trutas arco-íris expostas por três dias a concentração de 26,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre, em concomitância com o aumento da glicose plasmática (Dethloff et al., 1999). Desta forma pode-se inferir que o aumento da glicemia nos acarás do grupo Cu 20 esteja relacionada a uma maior atividade da NKA branquial e à manutenção dos níveis de Na^+ no plasma desta espécie.

5. Conclusão

Em comparação com outras espécies, nas concentrações e tempo de exposição testado, *G. brasiliensis* parece lidar muito bem com as adversidades impostas pelo cobre, uma vez que consegue manter o equilíbrio do Na^+ e do Ca^{2+} , além de não sofrer estresse oxidativo, contrapondo os efeitos tóxicos deste metal. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram a baixa sensibilidade ao cobre apresentada pelos Ciclídeos, discutida por Duarte et al. (2009) e apontam a osmorregulação e o histórico evolutivo da espécie como determinantes na sensibilidade deste grupo de peixes.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de Financiamento 001, em associação com a Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná. O presente trabalho é parte da tese de doutorado de A. A. de Paula. CBR Martinez é pesquisadora do CNPQ (Processo 307947/2015-7).

Referências

- Alves, L.C., Wood, C.M., 2006. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquat. Toxicol.* 78, 217–232.
- Alsop, D., Wood, C.M., 2011. Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: common mechanisms across multiple metals. *Aquat. Toxicol.* 105, 385–393.
- Atli, G., Canli, M., 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney, and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology* 20, 1861–1869.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882–890.
- Beutler, E. 1975. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Grune & Stratton, New York.
- Bidinotto, P.M., Moraes, G., Souza, R.H.S., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Bol. Téc. Cent. Pesqui. Treinamento Agric.* 10, 53–60.
- Blanchard, J., Grosell, M., 2006. Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish *Fundulus heteroclitus*: is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities? *Aquat. Toxicol.* 80, 131–139.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Calado, M., S.L., Vicentini, M., Santos, G.S., Pelanda, A., Santos, H., Coral, L.A., Magalhães, V.F., Mela, M., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2019. Sublethal effects of microcystin-

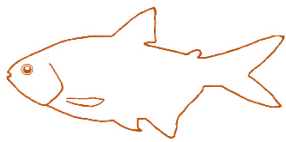
- LR in the exposure and depuration time in a neotropical fish: Multibiomarker approach. *Ecotox. Environ. Safe.* 183, 109527.
- Calado M., S.L., Santos, G.S., Vicentini, M., Bozza, D.C., Prodocimo, V., de Magalhães, V.F., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2020. Multiple biomarkers response in a Neotropical fish exposed to paralytic shellfish toxins (PSTs). *Chemosphere* 238, 124616.
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M., 1998. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: *Free radical and antioxidant protocols*, Humana Press. pp. 377–387
- Chakrabarty, P. 2004. Cichlid biogeography: comment and review. *Fish and fisheries* 5, 97–119.
- CESP - Companhia Energética de São Paulo. 2006. 40 peixes do Brasil: *CESP 40 anos*. Dolis. Rio de Janeiro, RJ, pp. 207.
- Chowdhury, M.J., Girgis, M., Wood, C.M., 2016. Revisiting the mechanisms of copper toxicity to rainbow trout: time course, influence of calcium, unidirectional Na⁺ fluxes, and branchial Na⁺, K⁺ ATPase and V-type H⁺ ATPase activities. *Aquat. Toxicol.* 177, 51–62.
- CONAMA 357. Resolução 357, 2005. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> (acesso 2020).
- Da Silva, M.E.P.A., de Castro, P.M.G., Maruyama, L.S., de Paiva, P., 2009. Levantamento da pesca e perfil sócio-econômico dos pescadores artesanais profissionais no reservatório Billings. *Bol. Inst. Pesca* 35, 531-543.
- De Boeck, G., Vlaeminck, A., Balm, P.H., Lock, R.A., De Wachter, B., Blust, R., 2001. Morphological and metabolic changes in common carp, *Cyprinus carpio*, during short-term copper exposure: interactions between Cu²⁺ and plasma cortisol elevation. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 374-381.
- De Graaf, M., Coutts, T., 2010. Invasive potential of a South-American fish species, *Geophagus brasiliensis*, in the Swan River, Western Australia: based on tolerance to instantaneous and gradual changes in salinity. *J. R. Soc. West. Aust.* 93, 147–151.
- Dethloff, G.M., Schlenk, D., Khan, S., Bailey, H.C., 1999. The effects of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Environ. Com. Tox.* 36, 415–423.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.T., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Duarte, R.M., Menezes, A.C.L., da Silveira Rodrigues, L., de Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., 2009. Copper sensitivity of wild ornamental fish of the Amazon. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 693–698.
- Ellman, G.L., Coutney, K.O., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- 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. *Physiol. Rev.* 85, 97-177.
- Evans, D. H. 2011. Freshwater fish gill ion transport: August Krogh to morpholinos and microprobes. *Acta Physiol.* 202, 349-359.
- Freire, C.A., Amado, E.M., Souza, L.R., Veiga, M.P., Vitule, J.R., Souza, M.M., Prodocimo, V., 2008. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comp. Biochem. Physiol. A* 149, 435–446.
- Giacomin, M., Vilarinho, G.C., Castro, K.F., Ferreira, M., Duarte, R.M., Wood, C.M., Val, A.L., 2018. Physiological impacts and bioaccumulation of dietary Cu and Cd in a model teleost: The Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquat. Toxicol.* 199, 30–45.

- Gibbs, A., Somero, G.N., 1989. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. *J. Exp. Biol.* 143, 475–492.
- Gonzalez, R.J., Wilson, R.W., Wood, C.M., Patrick, M.L., Val, A.L., 2002. Diverse strategies for ion regulation in fish collected from the ion-poor, acidic Rio Negro. *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 37–47.
- Grosell, M., Nielsen, C., Bianchini, A., 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133, 287–303.
- Grosell, M. 2012. Copper. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.) *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Academic Press/Elsevier, San Diego, CA, pp. 54–135.
- Gutierrez, S.M.M., Vitule, J.R.S., Freire, C.A., Prodocimo, V., 2014. Physiological tools to predict invasiveness and spread via estuarine bridges: tolerance of Brazilian native and worldwide introduced freshwater fishes to increased salinity. *Mar. Freshwater Res.* 65, 425–436.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Br. J. Haematol.* 25, 563–575.
- Hwang, P.P., Lee, T.H., Lin, L.Y., 2011. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *Am. J. Physiol-Reg. I.* 301, 28–47.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* 20, 6183–6188.
- Land, S.N., Rocha, R.C.C., Bordon, I.C., Saint’Pierre, T.D., Ziolli, R.L., Hauser-Davis, R.A., 2018. Biliary and hepatic metallothionein, metals and trace elements in environmentally exposed neotropical cichlids *Geophagus brasiliensis*. *J. Trace Elem. Med. Bio.* 50, 347–355.
- Lauren, D.J., McDonald, D.G., 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson – modulation by water hardness and pH. *J. Comp. Physiol. B* 155, 635–644.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Method Enzymol.* 233, 346–357.
- Lushchak, V.I. 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 711–747.
- Marshall, W.S. 2012. Osmoregulation in estuarine and intertidal fishes. In: McCormick, S.D., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.) *Fish physiology: Euryhaline Fishes*. Academic Press/Elsevier, Waltham, MA, pp. 395–434.
- Mazon, A.F., Fernandes, M.N., 1999. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *B. Environ. Contam. Tox.* 63, 797–804.
- McCord, J.E., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Oliveira, F.G., Lirola, J.R., Salgado, L.D., de Marchi, G.H., Mela, M., Padial, A. A., Guimarães, A.T.B., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2019. Toxicological effects of anthropogenic activities in *Geophagus brasiliensis* from a coastal river of southern Brazil: A biomarker approach. *Sci. Total Environ.* 667, 371–383.
- Oss, R.N., Baroni, V.D., Duarte, R.M., Val, A.L., Val, V.M.F.A., Gomes, L.C., 2013. Recovery of fat snook, *Centropomus parallelus* (Teleostei: Perciformes) after subchronic exposure to copper. *Comp. Biochem. Physiol. C* 157, 306–309.
- Roda, J.F.B., Lauer, M.M., Risso, W.E., Martinez, C.B.R., 2020. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction? *Comp. Biochem. Physiol. A* 110659.

- Simonato, J.D., Mela, M., Doria, H.B., Guiloski, I.C., Randi, M.A.F., Carvalho, P.S.M., Meletti, P.C., Silva de Assis, H.C., Bianchini, A., Martinez, C.B.R., 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 170, 31–41.
- Sparks, J. S., Smith, W.L., 2004. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Cladistics*, 20, 501–517.
- Tesser, M.E., de Paula, A.A., Risso, W.E., Monteiro, R.A., Pereira, A.E.S., Fraceto, L.F., Martinez, C.B.R., 2020. Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: a comparative approach. *Sci. Total Environ.* 704, 135332
- Venturoti, G.P., Boldrini-França, J., Gomes, A.S., Chisté, B., Gomes, L.C., 2019. *Geophagus brasiliensis* (Teleostei: Cichlidae) as an indicator of toxicity of ornamental stone processing wastes. *Comp. Biochem. Physiol. C* 226, 108639.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, F., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Mar. Environ. Res.* 44, 69–84.
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Balasubramanian, M.P., 2007. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere* 69, 979–986.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* 122, 121–129.
- Wendelaar Bonga, S.E. 2011. Hormone Response to Stress. In: Farrell A.P., Cech J.J., Richards, J.G., Stevens, E.D. (Eds) *Encyclopedia of Fish Physiology: from genome to environment*. Academic Press/Elsevier Inc., UK, pp. 1515–1523.
- Wong, P.P.K., Chu, L.M., Wong, C.K., 1999. Study of toxicity and bioaccumulation of copper in the silver sea bream *Sparus sarba*. *Environ. Int.* 25, 417–422.
- Wood, C.M., 2012. An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Academic Press/Elsevier, San Diego, CA, pp. 1–51.

Capítulo V

Considerações finais



CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho utilizou vias de exposição distintas e três modelos biológicos para verificar a bioacumulação do cobre e o efeito deste metal em parâmetros fisiológicos e bioquímicos. Este trabalho gerou três manuscritos (Capítulo II, III e IV) 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.

As concentrações nominais (5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$) nos experimentos via água foram escolhidas no presente estudo por abrangerem as concentrações estabelecidas pela legislação brasileira (CONAMA/357). A CONAMA/357 estabelece para águas de classe 1 e 2, 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre dissolvido, e classe de água 3 e 4, 13 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre dissolvido. As águas de classe 1 e 2 são destinadas ao consumo humano e, também, à proteção das comunidades aquáticas. Já as classes 3 e 4 podem ser destinadas ao consumo humano após tratamento convencional ou avançado, a pesca amadora e harmonia paisagística. Para todos os experimentos, foram obtidas concentrações médias de cobre dissolvido parecidas, o que nos possibilita comparar os efeitos do cobre entre as espécies (Tabela 5.1). Além disso, as concentrações de cobre dissolvido nos grupos Cu 20 ficaram muito próximas a permitida pela legislação brasileira (CONAMA/357) para águas de classe 3 e 4 (Tabela 5.1). Já as obtidas para o cobre 10 ficaram um pouco abaixo da permitida pela legislação para águas de classe 1 e 2.

Tabela 5.1 – Concentração de cobre dissolvido obtidas nos aquários onde foram mantidas *A. altiparanae*, *H. malabaricus* e *G. brasiliensis* em exposição aguda (96 h) ao cobre (Cu 5, Cu 10, Cu 20) (média \pm EP; n = 21-92).

	Cu 5	Cu 10	Cu 20
<i>A. altiparanae</i>	4,25 \pm 0,12	7,24 \pm 0,22	13,66 \pm 0,30
<i>H. malabaricus</i>	4,86 \pm 0,09	7,49 \pm 0,16	12,71 \pm 0,27
<i>G. brasiliensis</i>	3,55 \pm 0,23	7,23 \pm 0,73	12,79 \pm 0,70

Um dos nossos objetivos era verificar a validade protetiva da legislação brasileira em relação ao cobre para as três espécies de peixe. Mesmo a menor concentração avaliada (Cu 5) já ocasionou distúrbios iônicos (Fig. 5.1) em *A. altiparanae* e *H. malabaricus* e na maior

concentração de exposição (Cu 20), as três espécies foram afetadas (Fig. 5.1). No entanto, a sensibilidade e as respostas diferiram (Fig. 5.1). *Astyanax altiparanae* mostrou ser a espécie mais sensível ao cobre, apresentando hiponatremia em todas as concentrações e sendo a única a apresentar danos em biomoléculas (lipídeos e DNA) e mortalidade na exposição via água (Cu 20) (Fig. 5.1). *Hoplias malabaricus* apresentou alterações nos parâmetros fisiológicos, mas não apresentou danos. Aparentemente, essa espécie foi capaz de lidar com o efeito do cobre de causar desequilíbrio do Na⁺ (Aumento da NKA e HATP -Fig. 5.1). Por outro lado, *H. malabaricus* apresentou uma hipocalcemia dose dependente, a qual o aumento da atividade da CaATP não foi capaz de compensar (Fig. 5.1). *Geophagus brasiliensis* não demonstrou redução de nenhum íon plasmático e tampouco lipoperoxidação e carbonilação de proteínas.

Assim, os resultados confirmaram a nossa primeira hipótese de que as espécies apresentariam sensibilidade diferente ao cobre e que *A. altiparanae* seria a espécie mais sensível e *G. brasiliensis* a espécie que apresentaria menor sensibilidade.

Baseado na premissa da origem marinha recente de *G. brasiliensis* e a tolerância dessa espécie a mudanças de salinidade do meio, nós criamos a hipótese 4, a qual menciona que apenas *G. brasiliensis* conseguiria lidar com os desequilíbrios do Na⁺ causados pelo cobre. No entanto, essa hipótese se confirmou apenas parcialmente. De fato, *G. brasiliensis* mostrou alta capacidade osmorregulatória para lidar com os efeitos do cobre e *A. altiparanae* parece ter perdido sua capacidade de osmorregulação em 96 h de exposição. Por outro lado, surpreendentemente, um aumento da atividade das ATPases branquiais foi observado também em *H. malabaricus*, a qual parece ter compensado os efeitos do cobre em relação ao Na⁺, mas não em relação ao Ca²⁺ (Fig. 5.1).

Ainda com relação a exposição via água, nós criamos a hipótese 3, na qual inferimos que o cobre causaria mobilização das defesas antioxidantes e danos oxidativos nas três espécies, devido ao seu alto poder redox. Quando a concentração de cobre ultrapassa a quantidade de sítios de ligação celular disponíveis para esse metal, o cobre pode causar estresse oxidativo. Assim, no presente estudo, é possível traçar um paralelo entre a bioacumulação do cobre e as respostas de estresse oxidativo em brânquias e fígado. Em *H. malabaricus* não houve acúmulo do metal em nenhum dos tecidos avaliados e concomitantemente não foram observadas alterações consistentes nas defesas antioxidantes e tampouco danos oxidativos. Já em *A. altiparanae*, espécie mais prejudicada pelo metal, houve acúmulo de cobre nas brânquias e no fígado. Nas brânquias dessa espécie foram observadas uma diminuição da PCO e nenhuma resposta das defesas antioxidantes, ao passo que no fígado houve um aumento expressivo das

metalotioneínas, porém também foi constatado um aumento da LPO (Fig. 5.1). Desta forma, em *A. altiparanae* as defesas antioxidantes parecem não ter sido suficientes para combater o estresse oxidativo nos tecidos em que o metal acumulou. Por outro lado, em *G. brasiliensis* houve acúmulo nas brânquias, mas houve também mobilização das defesas antioxidantes (GSH). Ainda que proteínas carboniladas não tenham sido avaliadas nas brânquias dessa espécie, não foi observado LPO nesse tecido, indicando que a GSH pode ter agido para evitar o estresse oxidativo (Fig. 5.1). Assim, foi observado que o cobre pode causar estresse oxidativo principalmente nos tecidos em que há um excesso do metal. No entanto, as respostas variaram entre as espécies sendo *A. altiparanae* a espécie mais sensível.

Para comparar os efeitos da via de exposição, nós submetemos a espécie *H. malabaricus* a exposição aguda (96 h) ao cobre e a exposição trófica com uso de dieta viva previamente exposta ao metal (10 doses). Nossa hipótese foi a de que a exposição por via trófica promoveria mais efeitos nessa espécie. Ambas as vias promoveram desequilíbrios iônicos e dentre eles o que mais nos chamou a atenção foi a hipocalcemia, observada nas duas formas de exposição. No entanto, acúmulo de cobre e indícios de estresse oxidativo foram observados apenas na exposição via trófica (Fig. 5.2). Deste modo, ainda que as doses/concentração do metal e o tempo de exposição não sejam comparáveis, esse estudo aponta a via trófica como importante na toxicidade do cobre.

Além de contribuir com o conhecimento sobre os efeitos do cobre na dieta em espécies de peixes neotropicais, cujos estudos são escassos, esse trabalho mostra que há muito o que se aprender sobre a toxicidade do cobre pela via trófica. No nosso conhecimento, nenhum estudo havia avaliado a toxicidade deste metal com dieta viva previamente exposta ao cobre em laboratório, as quais são naturalmente presa e predador. Esta abordagem pode ter trazido um novo olhar, uma vez que os resultados obtidos, principalmente no sangue, diferem dos comumente relatados na literatura na exposição trófica.

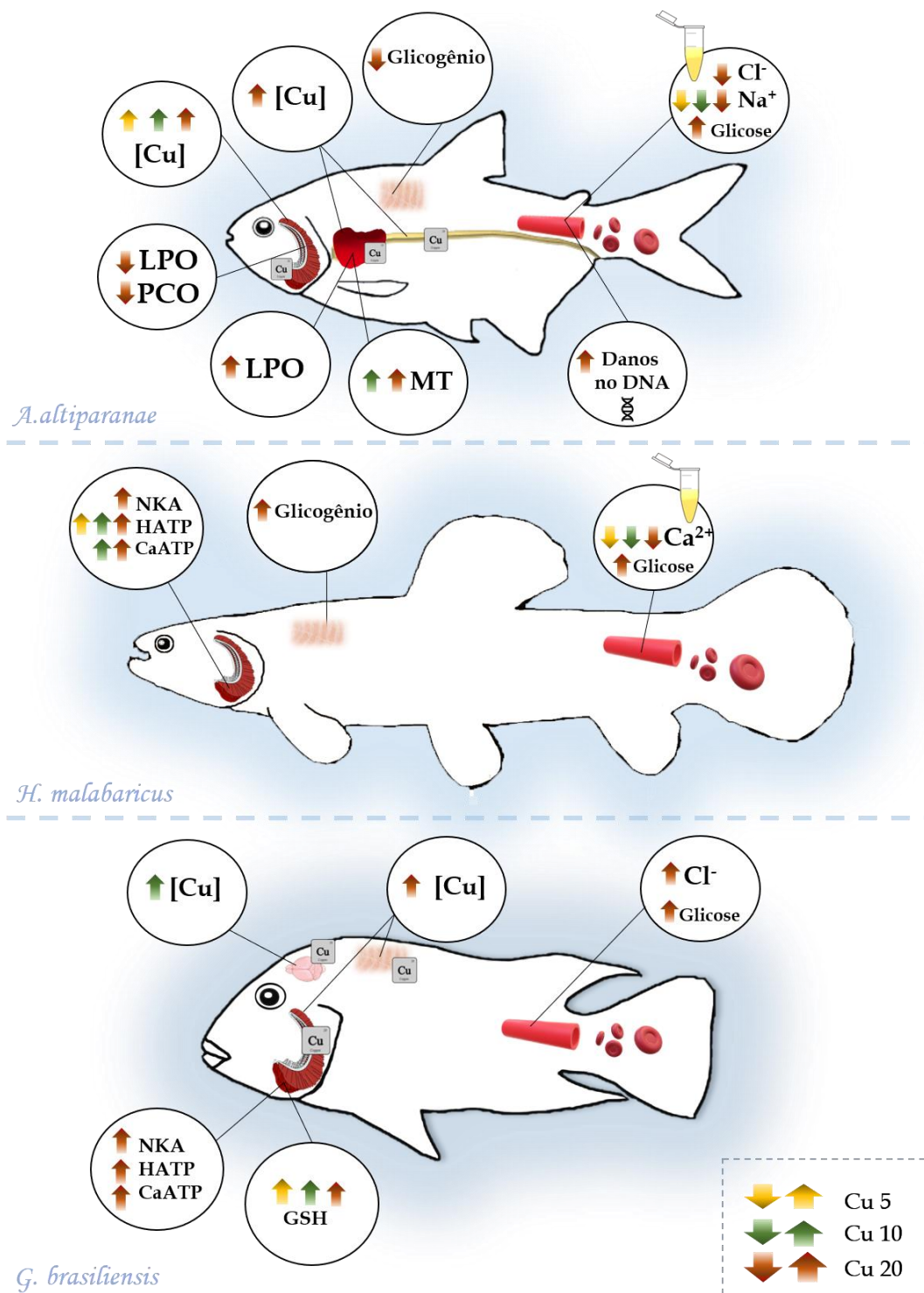


Figura 5.1. Efeitos do cobre nas espécies *A. altiparanae*, *H. malabaricus* e *G. brasiliensis* expostos por 96 h as concentrações nominais de 5 µg L⁻¹, 10 µg L⁻¹ e 20 µg L⁻¹ (Cu 5, Cu 10 e Cu 20).

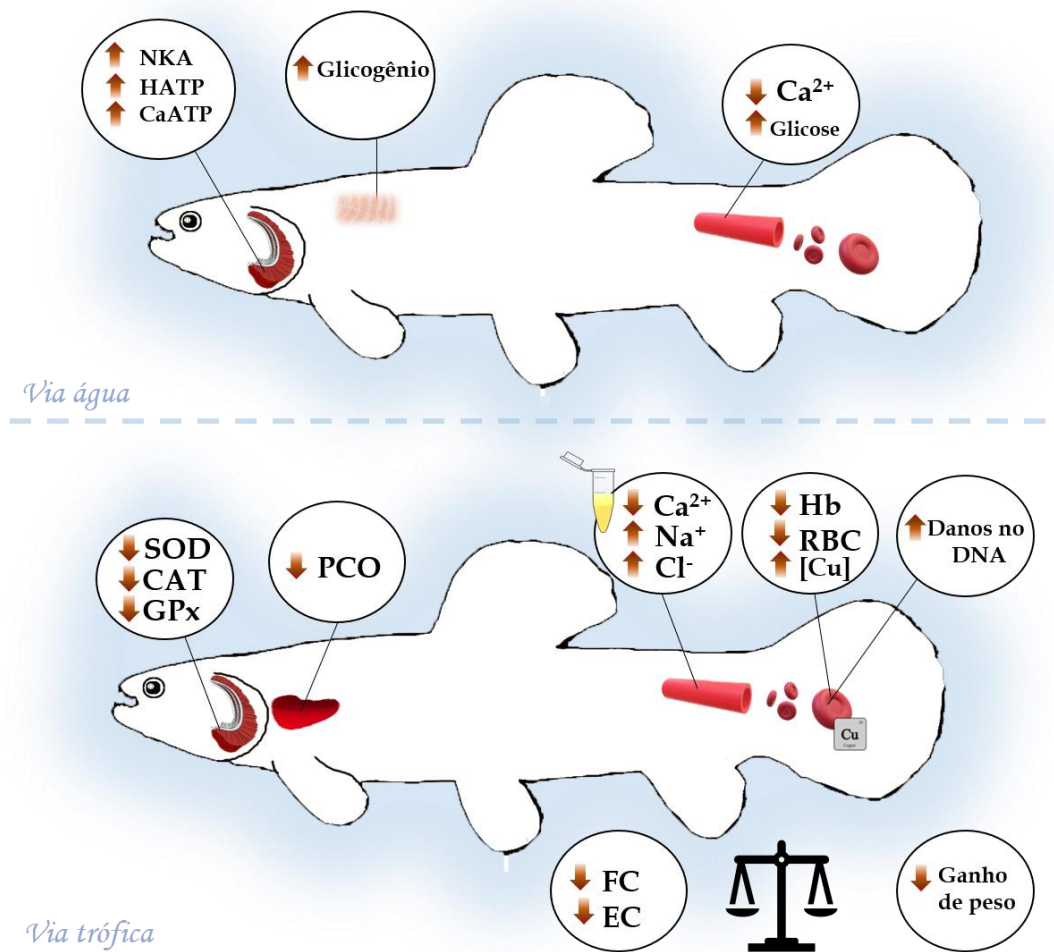
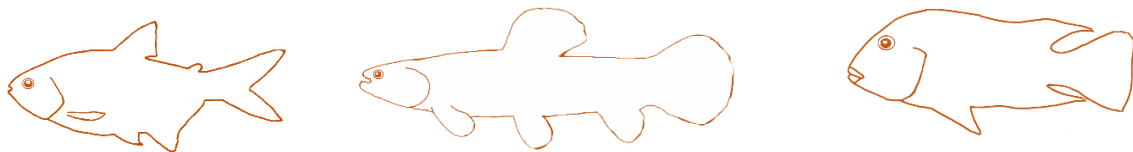


Figura 5.2. Efeitos do cobre na espécie *H. malabaricus* exposta ao metal na água (via água) ou por dieta viva previamente exposta ao cobre (via trófica).

Dessa forma, nós recomendamos novos estudos que possam avaliar a toxicidade dos metais incorporados à dieta viva, que considerem *H. malabaricus* para avaliação da interferência do cobre no metabolismo do cálcio e destacamos *A. altiparanae* como modelo biológico a ser utilizado no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos que sofram com a contaminação por metais.

ANEXO



ANEXO



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 70/2018

Londrina, 11 de Maio de 2018.

Prezado (a) professor (a)


Certificamos que o projeto intitulado: **“Bioacumulação e efeitos do cobre e do cádmio, isolados e em mistura, em três diferentes espécies de peixes neotropicais.”** protocolo nº4547.2018.48 sob a responsabilidade de **Cláudia 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, 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 **11/05/2018**.

O objetivo do projeto é avaliar os efeitos do cobre e do cádmio, isolados e em mistura, sobre a perspectiva de diferentes vias de exposição (via trófica e via água ou apenas via água) em três espécies de peixes neotropicais (*Hoplias malabaricus*, *Astyanax altiparanae* e *Geophagus brasiliensis*) por meio de múltiplos biomarcadores. Grau de invasividade (*Hoplias malabaricus*: GI2); (*Geophagus brasiliensis*: GI2); *Astyanax altiparanae*: GI2 (exposição via água) e: GI3 (exposição via trófica).

Vigência do Projeto	01/04/2018 a 31/12/2019
Espécie/linhagem	Peixe / <i>Hoplias malabaricus</i> ; <i>Astyanax altiparanae</i> ; <i>Geophagus brasiliensis</i> .
Nº de animais	<i>Hoplias malabaricus</i> : 40 e 80g, juvenis <i>Astyanax altiparanae</i> : 20g (adultos) e 5g (juvenis) <i>Geophagus brasiliensis</i> : 30g (adultos)
Peso/Idade	40g / 80g / 20g / 5g / 30g respectivamente e juvenis / juvenis / adultos / juvenis e adultos respectivamente
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina e Piscicultura Cambará Fish - BR 369, KM 24, Scandolo, Cambará (86390000), Paraná, Brasil.
Amostras a serem coletadas	Sangue, brânquias, fígado, cérebro, rim posterior, trato gastrointestinal, músculo e osso.

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.


Prof. Dr. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Imo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a). Cláudia 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 do CCB