

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**DAIANE DA SILVA ACOSTA**

**DEFESAS ANTIOXIDANTES EM OSTRAS *CRASSOSTREA*  
*BRASILIANA* E COMPORTAMENTO E DEFESAS  
ANTIOXIDANTES EM PAULISTINHA *DANIO RERIO* COMO  
BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL**

**FLORIANÓPOLIS  
2016**



Daiane da Silva Acosta

**DEFESAS ANTIOXIDANTES EM OSTRAS *CRASSOSTREA*  
*BRASILIANA* E COMPORTAMENTO E DEFESAS  
ANTIOXIDANTES EM PAULISTINHA *DANIO RERIO* COMO  
BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica do Centro  
de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Bioquímica  
Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre

**FLORIANÓPOLIS**  
**2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Acosta, Daiane da Silva

Defesas antioxidantes em ostras crassostrea brasiliana e comportamento e defesas antioxidantes em paulistinha danio rerio como biomarcadores de contaminação ambiental / Daiane da Silva Acosta ; orientador, Alcir Luiz Dafre - Florianópolis, SC, 2016.  
120 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

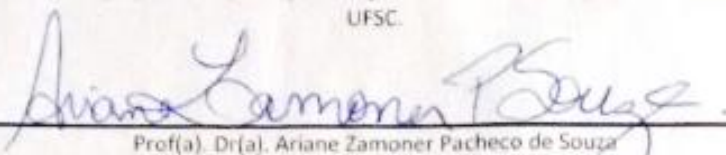
1. Bioquímica. 2. Crassostrea brasiliana. 3. Defesas antioxidantes. 4. Memória inibitória. 5. Danio rerio. I. Dafre, Alcir Luiz . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

**"Defesas antioxidantes em ostras *Crassostrea brasiliana* e comportamento e defesas antioxidantes em paulistinha *Danio rerio* como biomarcadores de contaminação ambiental"**

Por

**Daiane da Silva Acosta**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (12/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.



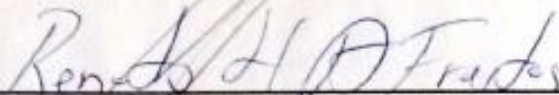
Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:



Dr(a) Alcir Luiz Dafre (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)


Dr(a) Maria Risoleta Freire Marques (Universidade Federal de Santa Catarina)



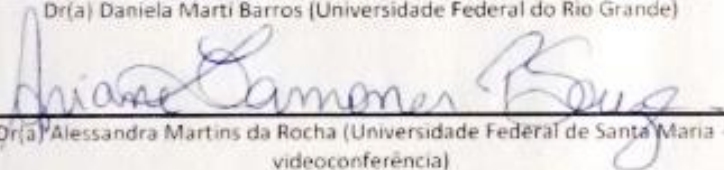
Dr(a) Renato Hajenius Ache de Freitas (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Karin Hahn Luchmann (Universidade do Estado de Santa Catarina)



Dr(a) Daniela Marti Barros (Universidade Federal do Rio Grande)



Dr(a) Alessandra Martins da Rocha (Universidade Federal de Santa Maria -  
videoconferência)



Dedico este trabalho ao meu filho Antônio.





## AGRADECIMENTOS

Ao longo desse período do doutorado, acredito que muitas mudanças ocorreram. Mudanças positivas, outras nem tanto, porém todas com muitos aprendizados. Gostaria de agradecer primeiramente ao Alcir. Muita obrigada pela confiança e insistência na conclusão dessa etapa. Certamente, seu apoio foi fundamental para o fechamento deste ciclo.

Gostaria de agradecer aos meus amigos, alguns moram longe, mas sempre presente. São visitas curtas, telefonemas longos, viagens ao acaso, muitas mensagens que me faz próxima de vocês sempre! Porém tenho que agradecer aos novos e bons amigos adquiridos nessa fase. Lila, Cinara, Dani, Ari, Samira - são pessoas fundamentais, que fazem sempre acreditar que amigos são extremamente importantes na nossa vida. Ari, mas você em especial - já dividimos aluguel, choros, risos, muitas histórias. Mas a você confiei o meu bem mais precioso, Antônio! Madrinha dedicada, atenciosa, muito obrigada por todo amor conosco!

Fica registrado o meu amor incondicional a minha mãe, apesar de maneira física não se fazer mais presente, tenho a certeza que lá de cima me ilumina e está comigo em todos os momentos. Para ti “papito”, ficam as minhas palavras de sempre, obrigada por me fazer extremamente teimosa! E digo novamente, se existe alma gêmea, certamente és a minha! Com certeza, encerro essa fase, por vocês!

Claro, não poderia falta, Kleber. Você é o que mais valeu a pena nesse ciclo. Obrigada por ser meu amigo, companheiro, marido, amante. Sou infinitamente feliz por ter você ao meu lado. Obrigada por me fazer ver a vida de forma mais leve, mais livre. Obrigada por me dar a dádiva de ser mãe, mas principalmente por ser esse paião maravilhoso! Tenho sorte, tenho você ao meu lado. Brigamos, discutimos, mas buscamos sempre estar unidos e a cada dia mais próximos! Sem tua insistência para o fechamento dessa fase, com certeza eu teria desistido, obrigada pela paciência, pelo companheirismo!

Obrigada LABDEF! Trevisan, Dani, Marcela, Myrna, Gabriel, Naíssa, Luiz – muito obrigada por me receberem tão bem; e por fazer os experimentos de campos, dias de diversão!

Muito do que eu tinha planejado e almejado no meu caminho acadêmico, ficou no caminho. Outras prioridades surgiram, outros acontecimentos bons e decisivos aconteceram. Então um muito obrigado “ao cara” lá de cima, por estar sempre me orientando apesar da minha cabeça dura.

Também gostaria de agradecer aos professores Dr. Daniela Barros, Dr. Alessandra Martins, Dr. Risoleta Marques, Dr. Renato Hajenius e Dr. Karim Lüchmann que atenciosamente aceitaram a participação na banca, na qual suas sugestões certamente enriquecerão muito o trabalho.

Agradeço todo o apoio financeiro recebido: Bolsa de doutorado do CNPq (557092/2010-8), financiamento pelo CNPq (406426/2012-0; 577253/2008-5) e pela FAPESC (1348/2010-0; 7033/2010-5). Este doutorado faz parte do INCT Toxicologia Aquática, cujo apoio foi indispensável ao desenvolvimento do presente trabalho.

“Junte um daqui com um de lá, temos tanta gente para encontrar. Mestres, filhos, pais, juntos viram mais E isso vai durar a vida inteira E o melhor que tem, é viver assim”.



## RESUMO

Biomarcadores são respostas rápidas podendo ser avaliados nos menores níveis de organização biológica, os quais podem detectar sinais precoces de danos a biomoléculas, tecidos, ou órgão, avaliando um determinado processo biológico. O impacto de contaminantes sobre os indivíduos podem ser avaliados, oferecendo, assim, oportunidade para a aplicação de medidas corretivas. Extensas áreas de manguezais em todo o mundo já foram perdidas, particularmente aquelas localizadas em áreas urbanas, as quais estão sob pressão devido a contaminação por efluentes domésticos. Estão presentes no esgoto sanitário metais, cosméticos, hormônios, detergentes, matéria orgânica, entre outros. Em uma primeira etapa desta tese foi estudado o efeito da exposição de ostras nativas *Crassostrea brasiliana* junto ao Mangue do Itacorubi, Florianópolis, SC, o qual é conhecido por estar moderadamente contaminado com esgoto sanitário. Dessa forma foi avaliada a presença de contaminantes, tais como HPAs, PCBs e LABs. As ostras da espécie *C. brasiliana* foram transplantadas para o Mangue do Itacorubi, apresentando várias alterações bioquímicas nas brânquias, quando comparadas a ostras transplantadas por 24 ou 96 h para um sítio de referência (Mangue de Ratonas). As defesas antioxidantes (catalase, glutatona peroxidase e glutatona) foram diminuídas, apresentando um efeito mais expressivo em 96 h (primavera e outono). Os dados estão de acordo com a ideia de que as brânquias de ostras são especialmente responsivas após uma exposição aguda, neste caso a um mangue contaminado com esgoto sanitário. A contaminação de águas superficiais por cobre ocorre em todo o mundo, usualmente originado de mineração, atividades agrícolas, industriais, comerciais e residenciais. A contaminação de águas superficiais por cobre ocorre em todo o mundo, usualmente originado de mineração, atividades agrícolas, industriais, comerciais e residenciais. Os limites permitidos de cobre são variáveis entre os países, mas geralmente estão na faixa de  $\mu\text{g/L}$ . Estes níveis já são capazes de perturbar várias funções de peixes em seus estágios iniciais de desenvolvimento. Em uma segunda etapa da tese foram estudados os efeitos da exposição ao cobre sobre o comportamento de larvas e de indivíduos adultos do peixe paulistinha *Danio rerio*, além de respostas antioxidantes no peixe adulto. Indivíduos adultos e larvas do peixe paulistinha foram expostos por 96 h ao cobre (concentração nominal: 0, 5, 9, 20 e 60  $\mu\text{g/L}$ ; medida: 0.4, 5.7, 7.2 16.6 e 42.3  $\mu\text{g/L}$ ). Na concentração de cobre de 60  $\mu\text{g/L}$ , as

larvas tiveram uma redução de 5% no comprimento do corpo, e nos adultos prejuízo na memória espacial, decréscimo na atividade glutatona S-transferase. Exposição ao cobre não afetou o comportamento social (agressividade e interação conespecífica), nem a atividade da enzima glutatona redutase. Interessantemente, na concentração nominal de cobre de 9  $\mu\text{g/L}$  a distância e a velocidade de natação das larvas foram aumentadas, e nos adultos a memória de longa duração foi abolida e a atividade da enzima glutatona S-transferase das brânquias foi diminuída. A exposição a concentrações de cobre próximas aos limites permitidos no Brasil foi capaz de alterar o desempenho natatório e perturbar o comportamento dos peixes adultos. Estes dados indicam que, os limites nacionais para o cobre em água doce podem afetar significativamente o desenvolvimento e o comportamento de peixes. Nosso trabalho indica que novos trabalhos precisam ser realizados a fim de confirmar que os níveis de cobre permitidos pela legislação brasileira não são totalmente seguros para peixes de água doce.

**Palavras-chave:** *Crassostrea brasiliiana*. Bivalves. Biomarcadores. Defesas antioxidantes. Cobre. Memória inibitória. Toxicologia. *Danio rerio*.

## ABSTRACT

*Biomarkers are quick responses that can be evaluated at lower levels of biological organization, which can detect early signs of damage to biomolecules, tissue, or organ, evaluating a particular biological process. The impact of contaminants on individuals can be evaluated, thus, offering the opportunity for the application of corrective measures. Extensive mangrove areas have been lost around the world, particularly those located in urban areas, which are under pressure due to contamination with domestic effluents. The sewage contains metals, cosmetics, hormones, detergents, organic matter, among others. Sanitary sewage typically contains metals, cosmetic products, hormones, detergents, organic matter, among others*

*first part of this study investigated the effect of the exposure of native oyster *Crassostrea brasiliana* on the Itacorubi mangrove, Florianópolis, SC, which is known to be moderately contaminated with sewage. The presence of contaminants such as HPAs, PCBs e LABs was investigated. The *Crassostrea brasiliana* oysters transplanted to the Itacorubi mangrove presented several biochemical changes in the gills when compared to oysters transplanted for 24 or 96 h to a reference site (Ratones mangrove). Antioxidant defenses (catalase, glutathione peroxidase and glutathione) were decreased, showing a more significant effect in 96 h (spring and fall). The data are consistent with the idea that the oyster gills are especially responsive after acute exposure in a mangrove contaminated with sewage. Contamination of surface waters by copper occurs throughout the world, usually originated from mining, agricultural and industrial activities, as well as commercial and residential activities. Copper limits vary between countries, but generally are in  $\mu\text{g/L}$  range. These levels are already able to disrupt several fish functions in its early stages of development. In a second part of this work the effects of copper exposure on the behavior of larvae and adult individuals of zebrafish *Danio rerio* were investigated, in addition to the antioxidant responses in adult fish. Adult fish and larvae were exposed for 96 h to copper (nominal concentration: 0, 5, 9, 20 and 60  $\mu\text{g/L}$ ; measured: 0.4, 5.7, 16.6 7.2 and 42.3  $\mu\text{g/L}$ ). At the copper concentration of 60  $\mu\text{g/L}$ , the larvae had a 5% reduction in the body length, and the adult fish had impaired spatial memory and activity of the enzyme glutathione S-transferase decreased. Social behavior (aggression and conspecific interaction) and the activity of the enzyme glutathione reductase were not affected. Interestingly, at the nominal*

*concentration of 9 µg/L of copper, the distance traveled and the swim speed were increased in the larvae, and in the adults the long-term memory was abolished, and the enzymic activity of glutathione S-transferase was decreased in the gills. Exposure to concentrations of copper close to the allowed limits was able to change the swimming performance and disrupt the behavior of adult fish. These data indicate that the national limits allowed for copper on water can significantly affect the development and the behavior of fish. This study indicates that further work are necessary in order to confirm that allowed copper levels in Brazil totally safy to fishes living in inland waters.*

**keywords:** *Crassostrea brasiliana. Bivalves. Biomarkers. Mangrove. Antioxidant defenses. Behavior. Copper. Inhibitory memory. Toxicology. Danio rerio.*



**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Formação de Espécies Ativas de Oxigênio .....	28
Figura 2- Demonstra efeitos de contaminantes podem comprometer os sistemas biológicos, até suas consequências a nível de ecossistemas ....	31
Figura 3 - Esquema representando a atuação do sistema antioxidante na degradação de espécies ativas de oxigênio .....	32
Figura 4 - Comprimento do corpo de larvas do peixe paulistinha (72 hpf) expostos ao cobre dissolvido por 96h.....	43
Figura 5 - Desempenho natatório de larvas do peixe paulistinha (72 hpf) expostos ao cobre dissolvido por 96h.....	45
Figura 6 - Memória espacial do peixe paulista adulto exposto a cobre dissolvido por 96 h .....	47
Figura 7 - Esquiva inibitória em peixe paulistinha adulto exposto a cobre dissolvido por 96 h .....	48
Figura 8 - O comportamento agressivo e interação social do peixe paulistinha adulto exposto a cobre dissolvido por 96 h .....	49
Figura 9 - Atividades de enzimas relacionados com a glutatona nos tecidos de peixe paulistinha adultos expostos ao cobre dissolvido durante 96 h.....	51
Figura 10 - Mapa da área de estudo.....	58



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos nos locais de estudo e número mais provável como um índice de coliformes fecais e totais.....	60
Tabela 2 - Bifenilos policlorados (PCBs), alquilbenzenos lineares (Labs), e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) da área de estudo amostrados no final do experimento (96 h).....	65
Tabela 3 - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) em tecidos moles de ostras <i>C. brasiliiana</i> .....	66
Tabela 4 - Alquilbenzenos lineares (LABs) nos tecidos moles de <i>C. brasiliiana</i> .....	67
Tabela 5 - Antioxidantes nas brânquias de ostras expostas no Itacorubi mangue.....	68
Tabela 6 - Antioxidantes nas glândulas digestivas de ostras expostas no Itacorubi mangue.....	69



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CASAN	Companhia Catarinense de Águas e Saneamento
CAT	Catalase
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
ERO	Espécies ativas de oxigênio
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GST	Glutaciona S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
INCT-TA	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática
LABs	Alquilbenzenos lineares
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxila
PCBs	Bifenilos policlorados
POPs	Poluentes orgânicos persistente
-SH	Grupo sulfidril
TrxR	Tioredoxina redutase



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Poluentes Orgânicos .....	25
1.2 Metais-Traço.....	28
<b>1.2.1 Cobre.....</b>	<b>29</b>
1.3 Biomarcadores .....	30
1.4 Biomarcadores bioquímicos e comportamentais .....	31
1.5 Vias de detoxificação .....	33
1.6 Bivalves como modelo .....	34
1.7 Paulistinha como modelo .....	34
2 OBJETIVO GERAL .....	36
2.1 Objetivos Específicos .....	36
CAPÍTULO 1 – BAIXOS NÍVEIS DE COBRE COMPROMETEM A MEMÓRIA DO PEIXE PAULISTINHA ( <i>DANIO RERIO</i> ) ADULTO E AFETAM O DESEMPENHO NATATÓRIO DE LARVAS.....	37
3 APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO .....	37
3.1 Metodologia .....	38
<b>3.1.1 Animais.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1.2 Água de manutenção e exposição ao cobre.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1.3 Avaliação do comprimento do corpo das larvas .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.4 Atividade locomotora de larvas de paulistinha.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.5 Memória espacial em paulistinha adulto .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1.6 Esquiva inibitória no paulistinha adulto .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1.7 Comportamento agressivo em paulistinha adulto.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1.8 Interação Social no paulistinha adulto.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1.9 Análises Bioquímica .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1.10 Análises Estatística .....</b>	<b>42</b>
3.2 Resultados .....	43
<b>3.2.1 A exposição ao cobre em larvas de paulistinha (<i>Danio rerio</i>).....</b>	<b>43</b>
<b>3.2.2 Respostas comportamentais de paulistinha adultos expostos ao cobre .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.3 Enzimas relacionadas a glutathione .....</b>	<b>49</b>
3.3 Discussão.....	52
CAPÍTULO 2 - RESPOSTAS ENZIMÁTICAS DE <i>CRASSOSTREA BRASILIANA</i> , EXPOSTAS AO MANGUE DO ITACORUBI .....	57
4 APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO .....	57
4.1 Metodologia .....	57
<b>4.1.1 Área de estudo.....</b>	<b>57</b>

4.1.2 Aclimação e exposição in situ de ostras .....	59
4.1.3 Análise química e físico-química da água .....	60
4.1.4 Defesas antioxidantes .....	60
4.1.5 Análise estatística .....	61
4.2 Resultados .....	62
4.2.1 Parâmetros físico-químicos .....	62
4.2.2 PAH, PCBs e LABs .....	64
4.2.3 Defesas Antioxidantes .....	67
3.3 Discussão .....	70
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES .....	75
REFERÊNCIAS .....	77
APÊNDICE A - ARTIGO .....	91



## 1 INTRODUÇÃO

Ações antropogênicas e o crescimento da população, principalmente em áreas urbanas, causam impacto ambiental, podendo levar a um desequilíbrio de distintos ecossistemas por diferentes contaminantes (ROSSETTO et al, 2006). O uso sustentável dos recursos naturais tem sido um desafio em âmbito mundial, principalmente no que se refere a recursos hídricos. A descarga de esgoto sanitário é a principal fonte de poluição no que se refere a águas superficiais (PESSATTI et al, 2016).

A cidade de Florianópolis sofre considerável impacto de contaminantes em seus ecossistemas aquáticos (praias, baías e manguezais) devido à expansão imobiliária desordenada nos espaços urbanos (AGUIAR, 2015). Conhecidamente, o ambiente aquático, é um dos ecossistemas que mais sofre em consequência de ações antropogênicas (ROSSETTO et al., 2006).

Na cidade de Florianópolis, a contaminação se dá principalmente por esgoto sanitário, sofrendo descarga de maneira direta ou indireta. Por vezes, os efluentes não passam por tratamento sanitário adequado, sendo despejados ao ambiente sem qualquer tipo de tratamento preliminar, levando a contaminação química e bacteriana de corpos d'água (EGANHOUSE; SHERBLUM, 2001).

### 1.1 Poluentes Orgânicos

O despejo de esgoto sanitário é um grande problema de saúde pública, além de ser um agravante da contaminação aquática. Segundo a Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN), o índice de atendimento urbano de esgoto é de apenas 55% no município de Florianópolis, o restante é liberado diretamente no ambiente ou acondicionado em fossas sépticas (CASAN, 2016).

Os efluentes contêm matéria orgânica e as mais diversas substâncias, como medicamentos (antibióticos, anti-inflamatórios, antidepressivos), surfactantes, metais e produtos químicos de limpeza (PETROVIC et al., 2003). O termo efluente pode ser utilizado para o despejo de resíduos de distintas atividades, logo sua composição é muito variada, conforme sua origem.

Os contaminantes orgânicos, como bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e alquilbenzenos lineares (LABs), também são avaliados como contaminantes aquáticos,

muitas vezes provenientes de efluentes domésticos. Algumas categorias destes compostos são conhecidas como poluentes orgânicos persistentes (POPs), e apresentam uma variedade de subprodutos com fórmulas químicas distintas (MIRA PETROVIĆ, 2003). Esses compostos são altamente estáveis, lipofílicos e podem bioacumular em diversos organismos, podendo a contaminação dar-se ao longo da cadeia alimentar.

Dentre os POPs, os PCBs são contaminantes lançados para o ambiente oriundos de processos de produção e tratamento industrial. Os PCBs são empregados como dielétricos, em laboratório de hidráulica, fluidos de lubrificação, agentes plastificantes, tintas de impressão e adesivos (RODRIGUEZ-ARIZA et al., 2003). Sua ampla aplicação se dá por suas características físico-químicas: estabilidade química, ponto de ebulição elevado e as propriedades de bons isolantes elétricos (DODOO et al., 2013). Dessa forma, PCBs originam-se de fontes antropogênicas, geralmente em áreas industrializadas e/ou em grandes centros urbanos (SOLAUN et al., 2015).

As misturas comerciais de PCBs tornaram-se o grande vilão para ambientes aquáticos. Suas características de insolubilidade em água, solúveis em gordura animal e solventes orgânicos, conferem resistência à degradação e, uma vez no ambiente, bioacumulam-se (BORJA et al., 2005). Estudos apontam que os PCB's podem ser biomagnificados de 200-70.000 vezes ao longo da cadeia alimentar (LAVANDIER et al., 2013). Esta biomagnificação é capaz de provocar mudanças na capacidade de defesa do sistema imunológico, enzimas ribossomais e levar a produção de espécies ativas de oxigênio (ERO) (PARK et al., 2009). Altos níveis de PCBs estão relacionados negativamente com a taxa de reprodução de mamíferos marinhos (HAULER et al., 2014). Os PCBs são tóxicos para peixes e bivalves, mesmo em pequenas concentrações (SINGH; GUPTA, 2010; PALIWODA et al., 2016).

De maneira geral, organismos aquáticos, como os bivalves, podem refletir a concentração de PCBs em seu ambiente, uma vez que esses animais são filtradores. Por estas características, são amplamente utilizados como bioindicadores. Além disto, possuem baixa atividade do sistema enzimático de degradação de xenobióticos de fase I, principal via de metabolização de PCBs (DODOO et al., 2013).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são uma grande família de compostos tóxicos encontrados no ambiente aquático. Devido à grande utilização de petróleo e seus derivados, combustão de carvão e madeira, são lançados no ambiente em grandes quantidades

(GDULA-ARGASIŃSKA et al., 2016). A hidrofobicidade faz com que os HPAs sejam facilmente acumulados por diferentes organismos aquáticos, pois tendem a associar-se a matéria particulada suspensa (HANNAM et al., 2010). Esta característica está associada a natureza tóxica, cancerígena, mutagênica de HPAs. A avaliação de HPAs permite inferir sobre as possíveis consequências ambientais, dependendo do nível de contaminação (DAUNER et al, 2016).

A toxicidade dos HPAs ocorre por interferir na fluidez das membranas celulares, e com as proteínas/enzimas associadas à membrana (ZIYAADINI et al., 2016). Interligado ao fato dos HPAs serem lipofílicos, frequentemente se acumulam em tecidos adiposos dos animais (ZIYAADINI ET AL., 2016). Devido ao grande número de derivados, gerando misturas de HPAs, seus efeitos biológicos são complexos (BORSKA et al., 2016).

Em bivalves, por exemplo, os efeitos adversos da HPAs podem resultar em alterações subletais, interferindo em mecanismos de homeostase, tais como no sistema imunológico, sendo uma condição importante para avaliar os efeitos de exposição a contaminantes (PIPE, 1999). Se compararmos a peixes, os bivalves possuem menor atividade enzimática, e, portanto, menor capacidade em metabolizar hidrocarbonetos aromáticos e outros compostos orgânicos poluentes. A bioacumulação favorece estudos de monitoramento de contaminantes em ecossistemas aquáticos (OROS; ROSS, 2005). A exposição de *Crassostrea gigas* a HPAs foi capaz de influenciar os parâmetros de hemócitos e hemolinfa, visto que a atividade da fagocitose foi reduzida, comprometendo o sistema imunológico (RENAULT, 2015).

Os LABs também são encontrados em diferentes efluentes, pois são empregados em distintas aplicações industriais como agroquímicos, fármacos, ou detergentes biodegradáveis. A produção de LABs no Brasil começou por volta de 1981, abrangendo 220 mil toneladas em 2008, representando cerca de 10% da produção mundial (MARTINS et al., 2010). Os LABs são resistentes à degradação, especialmente os de cadeias longas, por isso são considerados como indicadores de atividades humanas, em particular, têm sido amplamente utilizados como marcadores de descarga de esgoto sanitário (EGANHOUSE; PONTOLILLO, 2000).

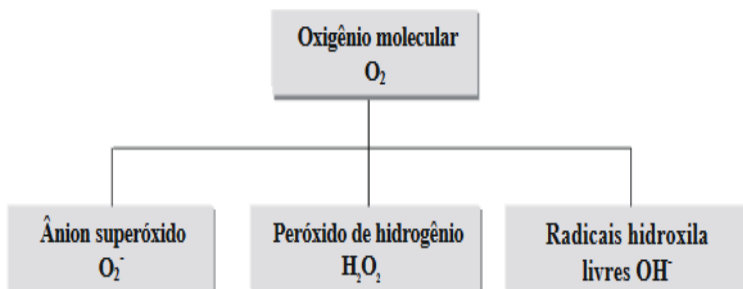
Além disso, os LABs podem persistir por mais de 20 anos no ambiente quando em meios anaeróbicos. Portanto, a distribuição composicional de LABs é importante para avaliar o grau de biodegradação e, conseqüentemente, o grau de tratamento de esgoto

(EICHHORN et al., 2002). LABs são a base de emulsionantes e detergentes biodegradável, várias são as tecnologias desenvolvidas para a produção de alquilbenzenos lineares, entretando a desidrogenação catalítica de parafinas de alto peso molecular representa 89% da produção mundial de LABs (LIRA; TAILLEUR, 2012). Cabe destaque ao isomero 2-fenilo, este produz detergentes de melhor emulsibilidade e biodegradabilidade para inúmeras aplicações, por isso, está entre o alquilbenzenos lineares mais utilizados (BX LUONG, 2004). A relação da bioacumulação de LABs em peixes e invertebrados com a sua toxicidade, ainda é pouco caracterizada na literatura (DWIYITNO et al., 2016).

## 1.2 Metais-Traço

Os metais-traço induzem a produção de ERO (Figura 1), as quais são altamente tóxicas e mutagênicas (QU et al., 2014a). Os metais-traço são capazes de catalisar a reação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), levando a formação do radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ). O radical hidroxila pode danificar diferentes biomoléculas e induzir ao aparecimento de processos geradores de estresse oxidativo (WINSTON; DI GIULIO, 1991).

Figura 1 - Formação de Espécies Ativas de Oxigênio



Fonte: Resende et al (2003).

Dessa forma, os metais-traço podem promover insulto oxidativo, aumentando diretamente a concentração celular de ERO, tais como peroxidação lipídica, e levando a danos de membrana e/ou inatividade de enzimas, permitindo que a célula produza uma resposta através da

indução de defesas antioxidantes (WILCZEK et al., 2004).

Um dos principais mecanismos de toxicidade celular por metais está relacionado a propriedade destes em se ligar ao grupo sulfidril (-SH), ou induzir a oxidação de tióis. A oxidação de tióis pode levar a formação de pontes de disulfeto em proteínas, perturbar a atividade de enzimas com tióis em seus sítios ativos, os quais, quando oxidados geralmente perdem a sua funcionalidade (GUILHERME et al., 2008).

### **1.2.1 Cobre**

O cobre é um elemento que ocorre no ambiente, e está presente no sítio ativo de várias enzimas, participando, assim, do metabolismo celular. O cobre faz parte de aproximadamente 30 enzimas e glicoproteínas, sendo elemento importante também no trato gastrointestinal (SINGH; GUPTA, 2010). O cobre atua como um cofator de muitas enzimas intracelulares, desde enzimas da respiração celular até mesmo do metabolismo e detoxificação ERO (URIU-ADAMS; KEEN, 2005). Porém, com a desregulação de seus níveis intracelulares pode tornar-se tóxico (JOHNSON et al., 2007a). A contaminação ambiental por cobre tem sido relacionada ao dano oxidativo, o que pode ser evidenciado quando certos organismos são expostos cronicamente a concentrações baixas de cobre ou agudamente a concentrações elevadas deste metal (LEITE et al., 2013).

Com o crescimento populacional, somado ao avanço tecnológico, o cobre é uma das principais fontes de contaminação do ecossistema aquático (HAVERROTH et al., 2015). Entre as diversas formas de contaminação ambiental com cobre, podemos destacar os componentes de geradores elétricos, aparelhos de rádio e televisão, tubulações de água e fiação (JOHNSON et al., 2007a). A fabricação de produtos químicos, bem como o uso de tais produtos na agricultura, faz do cobre um potente contaminante em águas de superfície em vários países (JOHNSON et al., 2007a). A agricultura também é fonte contaminadora de cobre, especialmente devido ao uso do cobre em em formulações de pesticidas e fungicidas (OLIVEIRA FILHO et al., 2004).

No sistema nervoso, o cobre também é um nutriente essencial para o seu funcionamento, pois sua deficiência pode originar convulsões (URIU-ADAMS; KEEN, 2005). Em concentrações elevadas, o cobre, pode induzir déficits motores em mamíferos, sendo neurotóxico, pois é capaz de inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase, além de causar insuficiência hepática em roedores (PERSONNEL et al., 2006).

Peixes expostos ao cobre, de maneira geral, apresentam danos em seu sistema sensorial (JOHNSON et al., 2007a), o qual é essencial para sobrevivência desses animais. Além disto, ocasionam prejuízo comportamentais, alterando comportamentos como a fuga de predadores ou até mesmo comprometendo o sucesso da reprodução, o que pode trazer prejuízos ao ecossistema (GROSELL et al., 2003). A toxicidade do cobre foi associada a perturbações no equilíbrio iônico. Por exemplo, na truta arco-íris (*Salmo gairdneri*), a exposição ao cobre inibiu o funcionamento do transportador de íons  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPase (MAES et al., 2016).

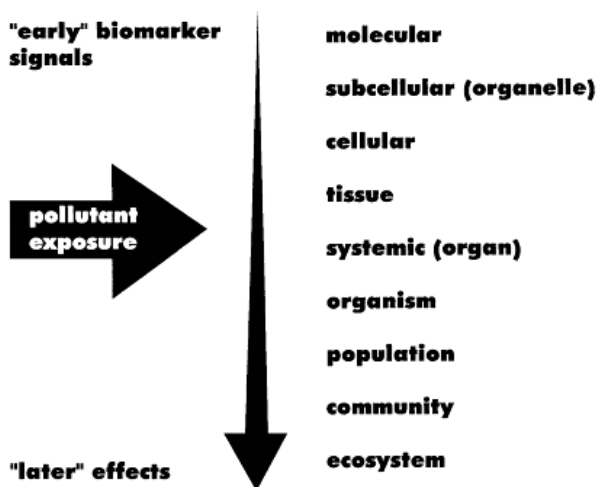
### 1.3 Biomarcadores

Há necessidade de estudos ecotoxicológicos, os quais buscam uma maneira de monitorar os efeitos causados por contaminantes naturais e/ou sintéticos, bem como seus efeitos sobre diferentes ambientes (SOUZA et al., 2012). O estudo de biomarcadores destaca-se neste contexto pelo fato de estarem ligados à capacidade detectar as diferentes respostas dos organismos aos contaminantes, em distintas perspectivas: toxicologia, fisiologia, molecular e/ou bioquímica (OGA et al., 2008). Numa perspectiva ecotoxicológica, os biomarcadores de contaminação aquática podem ser específicos para um determinado contaminante ou uma classe de contaminantes (por vezes não relacionados quimicamente). Estas conclusões são baseadas em mudanças em respostas bioquímicas e/ou fisiológicas (ELLIOTT, 2003).

Na Figura 2, a representação clássica enfatizando os vários níveis biológicos de organização (VAN DER OOST et al., 2003), ilustra as respostas provocadas por distintos poluentes dentro de um sistema biológico. A detecção de alterações pode ocorrer ao nível molecular, subcelular e celular, as quais são passíveis de detecção nos primeiros momentos de exposição, podendo ser detectados em questão de horas a dias. À medida que o tempo passa os efeitos teciduais e sistêmicos podem ser detectados, levando, mais tardiamente, a consequências para a população, comunidade e ecossistema. Estes efeitos ao nível de população e a ecossistemas necessitam de muito mais tempo para serem detectados, muitas vezes com consequências graves e de difícil recuperação. Então, em estudos ecotoxicológicos, os biomarcadores moleculares e bioquímicos, ou em níveis organizacionais menores, são os melhores candidatos a identificar respostas precoces frente a exposição a contaminantes. Isto pode ser feito antes que efeitos

irreversíveis tenham sido gerados, e ao mesmo tempo, permitir ações corretivas em tempo de evitar consequências irreversíveis.

Figura 2- Demonstra efeitos de contaminantes podem comprometer os sistemas biológicos, até suas consequências a nível de ecossistemas



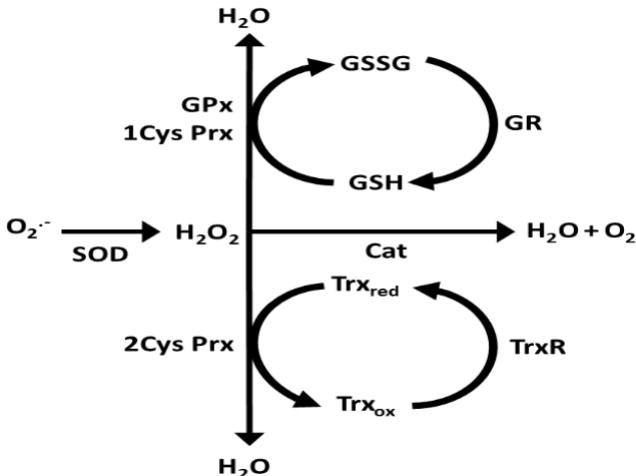
Fonte: Van der Oost et al (2003).

#### 1.4 Biomarcadores bioquímicos e comportamentais

Existem inúmeros biomarcadores, entretanto a avaliação das defesas antioxidantes e outros biomarcadores relacionados tem ganhado atenção nas últimas décadas. Os organismos aeróbicos utilizam oxigênio, e como consequência, parte deste oxigênio não é reduzida à água pelo metabolismo mitocondrial. A redução parcial do oxigênio gera ERO, as quais podem servir de sinais ou, quando produzidas em excesso, podem levar ao dano oxidativo à biomoléculas, organelas e células, os quais podem servir de biomarcadores de exposição (Liemburg-Apers et al., 2015). Algumas ERO das mais estudadas são o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), e o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (GILL; TUTEJA, 2010). O peróxido de hidrogênio tem baixa reatividade e alta permeabilidade em membranas biológicas, podendo servir como uma molécula sinalizadora. A alta reatividade do radical hidroxila impede sua difusão e faz com que reaja com a primeira molécula a interagir, produzindo dano no local onde foi formado. Se

por um lado, o peróxido de hidrogênio e ânion superóxido podem ser eliminados por reações enzimáticas, a grande reatividade do radical hidroxila não permitiu o aparecimento de defesas antioxidantes enzimáticas. A presença de antioxidantes não enzimáticos, tais como as vitaminas C e E e o tripeptídeo glutationa (GSH) confere proteção por serem capazes de reagir com ERO, gerando moléculas menos tóxicas, as quais podem ser eliminadas mais facilmente (COSSU et al., 2000). Dessa forma, níveis baixos de ERO são fundamentais, pois atuam no processo de sinalização, tendo relação direta em funções celulares. Entretanto, quando em níveis elevados, as ERO podem gerar danos oxidativos ao ponto de gerar o que é conhecido como estresse oxidativo (LIEMBURG-APERS et al., 2015). Este é definido como o desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e produção de ERO, em favor do aumento relativo nos níveis de ERO (AKERBOOM; SIES, 1981). Uma vez estabelecido insulto oxidativo por um poluente, os organismos de maneira compensatória, ativam mecanismos que induzem a respostas, geralmente levando ao aumento nas defesas antioxidantes (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010), as quais podem ser utilizadas como biomarcadores. As mudanças do estado redox podem ocasionar desde mudanças na expressão gênica, e nas vias de transdução de sinal.

Figura 3 - Esquema representando a atuação do sistema antioxidante na degradação de espécies ativas de oxigênio



Fonte: Trevisan (2014).



As células desenvolvem estratégias para usar essas mudanças como estímulos biológicos, levando a modificações na citotoxicidade, nos danos mutagênicos e até mesmo em respostas comportamentais (COVARRUBIAS et al., 2008). Os organismos que habitam ambientes poluídos desenvolvem capacidade compensatória para eliminação de poluentes, através de estratégias bioquímicas (CAZENAVE et al., 2006). Por exemplo, em peixes, invertebrados marinhos, incluindo moluscos, a estratégia de detoxificação observada é a ligação de metais à metalotioneína, uma proteína de baixo peso molecular e com abundante número de resíduos de cisteína. A metalotioneína pode ser induzida, aumentando a capacidade de captura de íons metálicos livres pela ligação destes aos seus grupos tióis (-SH) de resíduos de suas cisteínas (KOJADINOVIC et al., 2007).

Alterações em processos fisiológicos (ventilação, excreção, osmorregulação, regulação iônica, crescimento e reprodução) têm uma relevância não menos importante que respostas bioquímicas. Respostas ao nível fisiológico, em conjunto a alterações genéticas e bioquímicas, podem ser associadas a biomarcadores comportamentais (DEPLEDGE et al., 1995). Apesar das alterações observadas em função da exposição a um determinado poluente são mais sensíveis em nível molecular e celular, é possível utilizar como biomarcadores respostas em níveis de maior de organização biológica, como respostas reprodutivas e comportamentais (RON VAN DER OOST, 2003).

## **1.5 Vias de detoxificação**

O processo de detoxificação de xenobióticos visa lidar com os distintos compostos químicos, envolvendo processos de oxi-redução, conjugação e sistemas de exportação, os quais se dividem em reações de biotransformação de Fase I (oxidação, redução ou hidrólise), reações de conjugação de Fase II, e bombas que exportam xenobióticos ou seus metabólitos para o meio extracelular, chamada de fase III (BONILLA-VALVERDE et al., 2004; ZHANG et al., 2013).

Em estudos realizados com mamíferos, as reações da fase I de detoxificação são catalisadas por sistemas de monooxigenases dependentes de citocromo P-450, no qual as moléculas hidrofóbicas podem ser oxidadas, reduzidas ou hidrolisadas obtendo substrato apropriado para as reações de conjugação de fase II (FÖRLIN et al., 1995). As enzimas de fase II catalisam a conjugação de metabolitos com

vários substratos endógenos polares, tais como o ácido glucorónico, sulfatos e GSH. A conjugação torna os produtos mais solúveis e, em geral, menos tóxicos (SEM; SEMIZ, 2007).

A glutathione S-transferase (GST) é uma enzima de fase II, a qual catalisa a conjugação de xenobióticos a glutathione (DOWD; SHEEHAN, 1999). A GST está entre as mais abundantes enzimas citossólicas de hepatócitos de mamíferos. Já as enzimas de fase III são constituídas por proteínas da família contendo em sua estrutura o motivo “ATP-binding cassette”, ou seja, proteínas ABC (ZHANG et al., 2013).

## 1.6 Bivalves como modelo

Mexilhões e ostras estão entre os bivalves mais utilizados em estudos ecotoxicológicos devido à sua ampla distribuição, sua capacidade de bioacumulação, e vida sésil. Além destes, a sua habilidade de concentrar poluentes os faz bons indicadores de contaminação dos ecossistemas em que habitam (SOLÉ et al., 1994). Estudos com bivalves, devido a sua alta capacidade de bioacumulação por filtração, permitem a detecção de poluentes indetectáveis em outras espécies (O’CONNOR, 2002).

No Brasil, ainda tem muito que avançar em cultivo de bivalves, no entanto os dados do IBGE 2013 mostram que foram produzidas aproximadamente 19.000 toneladas. Podemos destacar o potencial do cultivo desses animais no Estado de Santa Catarina, sendo o maior produtor de bivalves do país, com cerca de 90% da produção (EPAGRI, 2015), permitindo a subsistência de inúmeros maricultores que dependem exclusivamente do cultivo de bivalves.

## 1.7 Paulistinha como modelo

O peixe paulistinha (*Danio rerio*) vem rapidamente se tornando um modelo animal popular em diferentes áreas de pesquisa, como biomedicina, genética, e toxicologia (KALUEFF et al., 2013). Também chamado por peixe-zebra (“zebrafish”), esta espécie possui várias vantagens, tais como o fato de o seu genoma ter sido completamente sequenciado, além de serem bons modelos para vários processos que também são encontrados em seres humanos (HAWLICZEK et al., 2012).

Assim como o paulistinha, peixes de água doce são facilmente mantidos em laboratório (SPEEDIE; GERLAI, 2008). Existem muitos

estudos que abordam a exposição do paulistinha a agentes químicos mutagênicos e/ou metais pesados, o que os tornam bons modelos para estudos ecotoxicológicos envolvendo biomarcadores (BARBOSA et al., 2005). Numa perspectiva toxicológica, repostas de peixes ao nível bioquímico e comportamental têm sido propostas como abordagem recomendada para a avaliação da qualidade de ambientes aquáticos (VAN DER OOST et al., 2003).

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações bioquímicas em bivalves (*Crassostrea brasiliiana*) e bioquímicas e comportamentais em peixes (*Danio rerio*) como biomarcadores de contaminação ambiental.

### 2.1 Objetivos Específicos

- a) Avaliar os níveis de contaminantes nos tecidos das ostras *Crassostrea brasiliiana* e no sedimento encontrado nos pontos de coleta: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), alquilbenzenos lineares (LABs), bifenilas policloradas (PCBs).
- b) Determinar os níveis de GSH, e a atividade das enzimas GST, CAT, GPx, GR, TrxR em brânquias e glândulas digestivas de ostras *Crassostrea brasiliiana*;
- c) Avaliar a atividade das enzimas GST, GPx e GR em brânquias, músculos e cérebro como biomarcadores de exposição ao cobre no peixe paulistinha *Danio rerio*.
- d) Analisar o uso de testes comportamentais como biomarcadores de exposição ao cobre usando o peixe paulistinha *Danio rerio* como modelo.

## **CAPÍTULO 1 – BAIXOS NÍVEIS DE COBRE COMPROMETEM A MEMÓRIA DO PEIXE PAULISTINHA (*DANIO RERIO*) ADULTO E AFETAM O DESEMPENHO NATATÓRIO DE LARVAS**

### **3 APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO**

O trabalho desenvolvido neste capítulo faz parte da pesquisa desenvolvida pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática (INCT-TA), o qual tem entre seus objetivos realizar estudos avançados em toxicologia aquática e atividades de vanguarda relacionadas ao desenvolvimento e aplicação de ferramentas químicas, biológicas e de modelagem ecotoxicológica, com vistas à conservação dos recursos hídricos brasileiros (<http://www.inct-ta.furg.br/objetivos.html>), acesso em Março de 2016).

No âmbito do INCT-TA, contaminantes modelos foram escolhidos, sendo o cobre selecionado como um metal-traço modelo, a atrazina como um pesticida modelo, e o fenantreno como um HPA modelo. Além destes, o esgoto doméstico foi selecionado devido a sua relevância exotoxicológica. Para os experimentos, foram escolhidos níveis de cobre abaixo (5 ug/L), no limite (9 ug/L) e acima (20 e 60 ug/L) dos níveis permitidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005).

Sendo assim, foram realizados estudos sobre os efeitos do cobre sobre o comprimento e desempenho natatório de larvas do peixe paulistinha (*Danio rerio*), bem como sobre o comportamento de indivíduos adultos e defesas antioxidantes teciduais após exposição ao cobre (5, 9, 20 e 60 ug/L) por 96 h. Os resultados deste trabalho já foram publicados (ACOSTA et al., 2016). Este trabalho foi realizado em colaboração com as professoras Rosane Souza da Silva e Carla Bonan, tendo a participação dos alunos de pós-graduação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) Stefani Altenhofen e Milene Luzardo, especialmente com relação à realização dos experimentos compostamentais com o peixe paulistinha. As análises quantitativas dos níveis de cobre foram realizadas pelo Prof. Adalto Bianchini, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) com a colaboração da doutoranda Patrícia Gomes da Costa. Ao final da exposição foram realizados os testes comportamentais, ou a coleta dos tecidos para as análises bioquímicas, estas realizadas no Departamento de Bioquímica da UFSC.

### 3.1 Metodologia

#### 3.1.1 Animais

Indivíduos adultos selvagens do peixe paulistinha (*Danio rerio*) com “background” genético de Tübingen, de ambos os sexos, foram obtidos a partir da colônia mantida pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS). Os peixes foram mantidos em sistema de tanque de recirculação automática (ZEBTEC, Tecniplast, Buguggiate, Varese, Italy). Os peixes foram mantidos sob fotoperíodo de 14h de luz: 10h de escuro a uma densidade de até cinco animais por litro de água. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia com TetraMin Tropical Flake Fish®, suplementado com larvas de camarão de água salgada. As larvas do peixe foram obtidas por meio de cruzamento entre matrizes da colônia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Apenas após a fertilização, os ovos foram recolhidos e mantidos a  $26 \pm 2$  ° C e sob uma 14 h de luz: 10h escuro de fotoperíodo por 72 hpf. Após os experimentos, adultos e larvas de peixes-zebra foram sacrificados por hipotermia. Todos os protocolos foram feitos em conformidade com a regulamentação local, diretrizes internacionais e aprovados pelo Comitê Institucional de Ética Animal (autorizações # 12/00319 e 10/00196 CEUA PUCRS).

#### 3.1.2 Água de manutenção e exposição ao cobre

A água utilizada nos experimentos foi obtida a partir de um aparelho de osmose reversa (18 mohm / cm) e reconstituído com sal marinho Cristalsea™, Marinemix, Baltimore, USA) em 0.4 ppt, originando a seguinte composição em mmol/L (Atkinson and Bingman, 1999):  $\text{Na}^+$  5,34,  $\text{K}^+$  0,115,  $\text{Ca}^{2+}$  0,115,  $\text{Mg}^{2+}$  0,605,  $\text{Cl}^-$  6,15 e  $\text{SO}_4^{2-}$  0,32. A concentração de carbono orgânico total foi de 0,33 mg /L. A alcalinidade total, como  $\text{CO}_3^{2-}$  correspondeu a 0,030 mEq/L. O pH da água foi de 7,4. Durante a manutenção dos peixes, os parâmetros da água foram monitorados diariamente e mantidos nos seguintes intervalos: pH: 6,5 a 7,5, condutividade: 400 a 600  $\mu\text{S}$ , concentração de amônia: <0,004 ppm, e temperatura: 25 a 28 ° C.

A concentração de cobre foi medida antes e após a adição do mesmo (concentração nominal: 5, 9, 20, e 60  $\mu\text{g/L}$ ) na água de manutenção. As amostras de água foram filtradas (filtro de 0,45  $\mu$ ) e

acidificadas com  $\text{HNO}_3$  (Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany) a 1%, concentração final. A concentração de cobre foi determinada utilizando espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução (HR-CS-AAS; ContrAA 700 Analytik Jena, Germany). Controles da qualidade das análises foram realizados. Uma solução-padrão de cobre (SpecSol<sup>®</sup>, QuimLab, Jacareí, SP, Brazil) foi usado para construir uma curva padrão e verificar a precisão da medição. Percentagem de recuperação de metal correspondeu  $103,5 \pm 0.7\%$ .

Paulistinha adulto (5 peixes/L) foram expostos a diferentes concentrações de cobre (nominalmente: 0, 5, 9, 20 e 60  $\mu\text{g} / \text{L}$  de cobre) durante 96 h. Cobre como  $\text{CuCl}_2$ , foi adicionado na água de manutenção. Durante a exposição ao cobre, os peixes não foram alimentados com larvas de *Artemia salina* e água foi substituída a cada dois dias. Os peixes foram mantidos em um aquário de 5-L (27 cm de largura x 17 cm de altura x 12 cm de profundidade) com água de manutenção, que foi mantida sob aeração, filtração biológica e mecânica (7,2 mg  $\text{O}_2 / \text{L}$ ), e controle de temperatura ( $28 \pm 2^\circ \text{C}$ ). As larvas (72 hpf) também foram expostas a diferentes concentrações de cobre dissolvido (nominalmente: 0, 5, 9, 20 e 60  $\mu\text{g} / \text{L}$  de cobre) durante 96 h. Cobre como  $\text{CuCl}_2$ , foi adicionado na água de manutenção, e as larvas foram colocadas individualmente e com bastante cuidado em numa placa de 12 poços ( $n = 10$  por tratamento). As larvas foram mantidas sob as mesmas condições descritas acima para peixes adultos. Peixes do grupo controle foram mantidos sob as mesmas condições utilizadas para os peixes expostos ao cobre, mas sem adição de cobre na água de manutenção.

### 3.1.3 Avaliação do comprimento do corpo das larvas

O comprimento do corpo das larvas de *Danio rerio* foi medido usando-se imagens obtidas a partir de microscópio estereoscópico Nikon usando o software NIS-Elements D 3.2 fornecida pelo fabricante (Nikon Instruments Inc., Japão). O comprimento do corpo foi normalizado como a distância desde o centro do olho até a extremidade de cauda (CAPIOTTI et al., 2013).

### 3.1.4 Atividade locomotora de larvas de paulistinha

Após 96 h de exposição ao cobre, larvas foram colocadas em solução de meio fresco e transferidas para uma placa de 96 poços.

Atividade locomotora foi gravada durante 5 min por uma câmera (QuickCam Pro 9000 - Logitech™, Califórnia, EUA). As imagens foram analisadas pelo software de monitoramento de vídeo ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, EUA). A distância total (m), velocidade média de natação (m/s) e a velocidade máxima (m / s) foram obtidas como descrito anteriormente (CAPIOTTI et al., 2013).

### **3.1.5 Memória espacial em paulistinha adulto**

A memória espacial de peixes adultos foi avaliada usando a tarefa do labirinto em Y. Neste contexto, os peixes foram treinados e testados individualmente em aquários de vidro em forma de Y, com três braços (altura 25 cm de altura x 8 cm de comprimento x 15 cm de largura): “braço inicial”; o braço adjacente (sempre aberto) foi nomeado "outro braço", e o “novo braço” (foi aberto apenas durante o teste). Nas proximidades das paredes externas do labirinto, pistas visuais estavam presentes. Durante a sessão de treino (5 min), o peixe foi colocado individualmente no braço inicial com o novo braço fechado. Após uma hora, o peixe foi colocado novamente no braço inicial e submetidos a uma sessão adicional de teste (5 min). No entanto, neste caso, o novo braço foi aberto (COGNATO et al., 2012). As sessões de treino e de teste foram gravados utilizando a QuickCam Pro 9000 câmera (Logitech™, Califórnia, EUA). A determinação do tempo permanecido em cada braço foi realizada utilizando-se o software QUALQUER-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA). O centro do labirinto (zona neutra) não foi calculado nas análises (DELLU et al., 1997).

### **3.1.6 Esquiva inibitória no paulistinha adulto**

De forma análoga ao teste de esquiva inibitória realizado com roedores, este teste foi adaptado para o ensaio de peixe (Blank et al, 2009;. McGaugh, 2000). Foi utilizado um aparelho que mede 18 cm de comprimento x 9 cm de largura x 7 cm de altura, feitos de vidro, conforme relatado anteriormente (Branco et al., 2009). O aparelho foi separado por uma divisória móvel do tipo guilhotina (9 cm de altura x 7 cm de largura) em dois compartimentos de tamanho igual, sendo um branco e o outro escuro. Na sessão de treinamento, os peixes adultos foram colocados individualmente no lado branco com a partição fechada. Depois de 1 min de habituação, a partição foi levantada a 1 cm do fundo, permitindo que os peixes atravessassem para o lado escuro do



tanque. Apenas depois de que o peixe entrou no compartimento escuro, a partição corredeira foi fechada e um choque elétrico pulsado de  $3 \pm 0,2$  V (intensidade medida entre os elétrodos e o centro do compartimento escuro) foi administrado durante 5 s. Os peixes foram removidos do aparelho e colocados num tanque temporário; e mais tarde devolvidos ao seu tanque de manutenção. Vinte e quatro horas depois de uma sessão de treino, a sessão-teste foi realizada, seguindo o mesmo procedimento, exceto que o estímulo aversivo (choque) não foi aplicado. A latência para entrar no compartimento escuro foi medida como um indicativo de retenção de memória, ou seja, se houve associação entre o estímulo aversivo e a entrada ambiente escuro.

### **3.1.7 Comportamento agressivo em paulistinha adulto**

O comportamento agressivo foi avaliado em peixes adultos pelo teste do espelho (GERLAI et al, 2000;. Moretz et al., 2006) em um aquário de teste (36 de comprimento x 25 cm de largura e 18 cm de altura) cheio com 6 L de água, onde um espelho (45 x 38 cm) foi colocado no lado do tanque segundo um ângulo de  $22,5^\circ$ . Após 60s da introdução dos peixes nos aquários, interações agressivas (mordidas, displays e ataques rápidos da natação) foram registrados por um período de 5 min. Este protocolo foi previamente validado por opositores de peixes reais (ARIYOMO et al, 2013;. ARIYOMO; WATT, 2015). O comportamento agressivo (ousadia e agressividade) do paulistinha pode ser influenciado pelo “*background*” genético (ARIYOMO et al., 2013), mas a agressividade foi semelhante entre machos e fêmeas (DAHLBOM et al., 2011), indicando a adequação do uso de ambos os sexos neste experimento.

### **3.1.8 Interação Social no paulistinha adulto**

O paulistinha é um animal social, e para testar a interação social, peixes obtidos do mesmo cardume foram utilizados em cada experimento. Cinco peixes foram colocados num pequeno aquário experimental (30 cm de largura x 15 cm de altura x 10 cm comprimento). De um lado do aquário experimental, foi colocado um tanque vazio; e no lado oposto do aquário, foi introduzido um "tanque-estímulo" de tamanho idêntico contendo 15 indivíduos adultos. Depois de 30 segundos de habituação, o comportamento dos peixes foi registrado durante 5 min. De forma a quantificar qualquer preferência

intrínseca para o lado "estímulo", o tanque foi "virtualmente" separado em duas partes iguais. Foi medido o tempo em que os peixes se mantiveram na metade adjacente ao aquário contendo indivíduos da mesma espécie (GERLAI, 2003).

### **3.1.9 Análises Bioquímica**

Após a exposição ao cobre por 96 h, os tecidos (brânquias, músculo e cérebro) foram dissecados e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  antes da análise. As atividades enzimáticas foram expressas em relação ao teor de proteína, tal como determinado usando albumina sérica bovina como padrão (BRADFORD, 1976). Para as medições de atividade enzimática, tecidos congelados foram homogeneizados (1:4, peso: volume) numa solução tampão contendo 50 mM tris (hidroximetil) aminometano, 0,15 M de KCl, e 0,1 mM de fluoreto de fenil-metano-sulfonilo (pH 7,4). Os homogenatos foram centrifugados a 9.000 g durante 30 minutos ( $4^{\circ}\text{C}$ ) e o sobrenadante foi utilizado como uma fração citosólica para as análises enzimáticas. As atividades enzimáticas foram determinadas espectrofotometricamente utilizando um leitor de placas de UV/Vis. A atividade GST foi ensaiada considerando a taxa de conjugação de glutationa com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno a 340 nm e a reação espontânea foi subtraída das leituras (Habig e Jakoby, 1981). Atividade GR foi medida a 340 nm, considerando a taxa de consumo de NADPH na presença de glutationa oxidada (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). Atividade da GPx foi medida a 340 nm por meio da taxa de consumo de NADPH na presença de GR, glutationa e hidroperóxido de cumeno (WENDEL, 1981).

### **3.1.10 Análises Estatística**

Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Homogeneidade da variância foi verificada através do teste de Bartlett's e os "outliers" foram excluídos quando detectados pelo teste de Grubb. A atividade enzimática e comportamento social (agressividade e os comportamentos conespecíficos) foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Dunnett's, sempre que apropriado. A variação de dados sobre a resposta a novidade, o comprimento do corpo e comportamento de natação mostraram variâncias significativamente diferentes. Portanto, ANOVA não paramétrica com ranqueamento foi usada, e as diferenças entre os

grupos foram detectadas pelo teste de Dunn. A tarefa de esquivar inibitória foi testada usando-se o teste “t” de Student para dados não pareados (sessão treino vs sessão de teste). Em todos os casos, o nível de significância foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

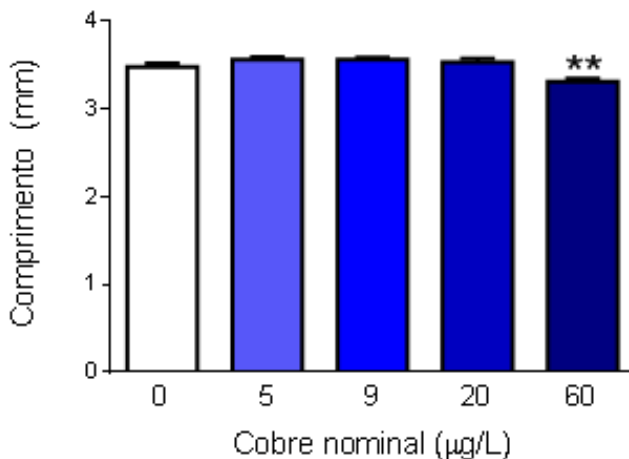
Os dados sobre as concentrações de cobre foram calculados com base nos valores medidos antes e 48 h após a adição na água de manutenção. Concentrações livres de cobre foram calculadas com base nos valores médios das concentrações de cobre calculadas como descrito acima e os parâmetros físico-químicos da água observadas durante o período experimental. Os cálculos foram realizados utilizando-se o Modelo do Ligante Biótico versão 2.2.3. (HYDROQUAL, MAHWAH, NJ, EUA).

### 3.2 Resultados

#### 3.2.1 A exposição ao cobre em larvas de paulistinha (*Danio rerio*)

A exposição ao cobre reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) em 5% o comprimento do corpo das larvas expostas à concentração mais alta de cobre testada (60  $\mu\text{g/L}$ ) (Fig. 4).

Figura 4 - Comprimento do corpo de larvas do peixe paulistinha (72 hpf) expostos ao cobre dissolvido por 96h

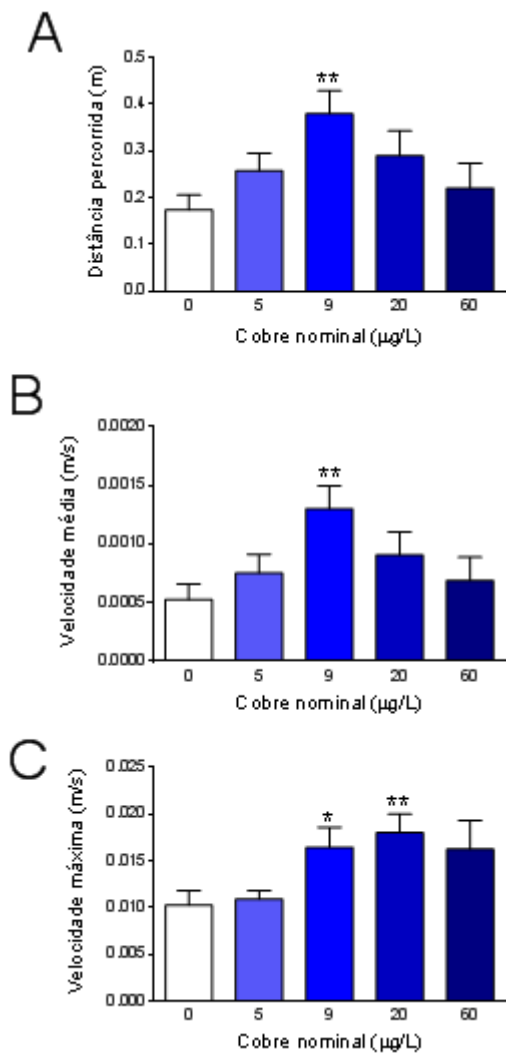


Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

De acordo com a Figura 4, os valores são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (N=19-21) Os valores médios tem diferença significativa do grupo controle (0) e são indicados por \*\*  $P < 0,01$ .

A distância média percorrida foi aumentada. ( $P < 0,01$ ) a partir de  $0,17 \pm 0,03$  m para  $0,38 \pm 0,05$  m em larvas expostas a  $9 \mu\text{g} / \text{L}$  de cobre (Fig 5 A). Este corresponde a um aumento de 2,2 vezes na distância percorrida por larvas expostas ao cobre, em comparação com àquelas do grupo de controle. A média da velocidade de natação também foi aumentada pelo tratamento com cobre ( $p < 0,01$ ). Os valores do grupo controle de  $0,00052 \pm 0,00013$  m/s aumentou para  $0,0013 \pm 0,00019$  m/s, nas larvas expostas a  $9 \mu\text{g} / \text{L}$  de cobre (Fig. 5B), o que correspondeu a um aumento de 2,5 vezes em relação ao grupo de controle. A velocidade máxima (Fig. 5C) foi aumentada em 1,4 vezes em larvas expostas a  $9 \mu\text{g} / \text{L}$  de cobre ( $p < 0,01$ ) e 1,8 vezes quando expostas a  $20 \mu\text{g} / \text{L}$  de cobre ( $p < 0,01$ ), em comparação ao grupo controle.

Figura 5 - Desempenho natatório de larvas do peixe paulistinha (72 hpf) expostas ao cobre dissolvido por 96h



Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

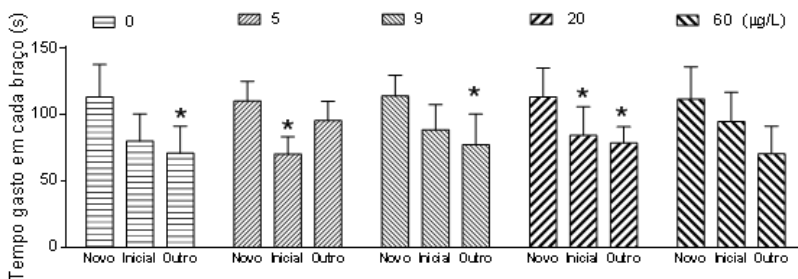
A Figura 5 apresenta a distância percorrida (A), Velocidade Média (B) e Velocidade Máxima (C). Os dados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (N=16-21). Os valores das médias com diferenças significativas do grupo controle (0) são indicados por \* ( $P < 0,05$ ) e \*\* ( $P < 0,01$ ).

O aumento observado na distância percorrida por larvas expostas a 9  $\mu\text{g/L}$  de cobre está de acordo com o aumento na velocidade média e na velocidade máxima observada neste grupo de larvas. Em 5 e 60  $\mu\text{g/L}$  de cobre, a distância percorrida, bem como a velocidade média e máxima exibida pelas larvas, não foi significativamente alterada pela exposição ao cobre.

### **3.2.2 Respostas comportamentais de paulistinha adultos expostos ao cobre**

Simultaneamente com a avaliação da memória espacial, a atividade locomotora de paulistinhas adulto foi avaliada considerando a distância percorrida e a velocidade média. Esses parâmetros não foram afetados por qualquer concentração de cobre testada (distância percorrida:  $p = 0,58$ ; velocidade média:  $p = 0,24$ , dados não mostrados), indicando que os efeitos observados em outros parâmetros analisados não estão relacionados com um possível aumento da atividade locomotora. A memória espacial e resposta ao novo, foram avaliadas pelo Y-maze, comparando a atividade na sessão treino com àquela da sessão-teste (Fig. 6). Os resultados mostraram que a exposição ao cobre não alterou o tempo gasto no braço novo, que foi homogêneo entre os grupos, com a média variando entre  $108 \pm 21$  e  $113 \pm 24$  s. O tempo gasto pelos peixes adultos no braço novo foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo gasto no braço inicial (média entre  $80 \pm 13$  s e  $88 \pm 21$  s), ou no outro braço (média entre  $71 \pm 12$  s e  $95 \pm 20$  s), exceto para o grupo de peixes expostos a 60  $\mu\text{g/L}$  cobre. Neste caso, não foram observadas diferenças significativas (Fig. 6).

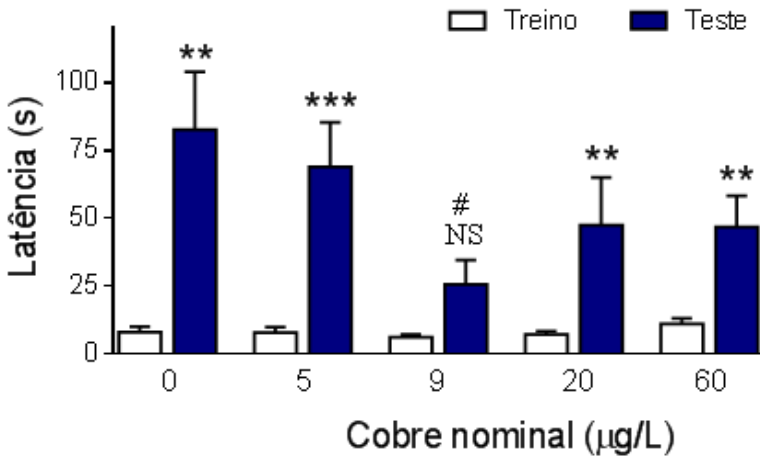
Figura 6 - Memória espacial do peixe paulista adulto exposto a cobre dissolvido por 96 h



Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

Após 24 horas depois de ser treinado, o tempo gasto por cada peixe em cada braço do Y maze foi gravado. Na sessão de teste, espera-se que os peixes passem mais tempo no “braço novo” ou no “outro braço” do labirinto (aquele que não tinha sido explorado anteriormente). A legenda indica concentrações nominais de cobre. Os valores são expressos como médias  $\pm$  E.P.M. (N=10-12). Valores médios com diferença significativa em relação ao braço novo são indicados com \*  $P < 0,05$ .

Figura 7 - Esquiva inibitória em peixe paulistinha adulto exposto a cobre dissolvido por 96 h



Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

Na sessão de treinamento, o peixe recebeu um choque elétrico quando entrou no compartimento escuro. A sessão-teste foi realizada 24 horas mais tarde, quando os peixes foram novamente submetidos ao mesmo procedimento, exceto pela ausência de choque. A latência para entrar no compartimento escuro foi medida. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 8-11). Os valores médios com diferenças significativas em relação ao grupo de controle (0) são indicados como “NS” (não significativo), \* (P < 0,05), \*\* (P < 0,01), e \*\*\* (P < 0,001). # Indica diferença significativa em relação à sessão-teste do grupo controle (p < 0,05).

Na avaliação de memória aversiva, os peixes que retiveram a memória depois de receber um choque elétrico na sessão de treino, passam mais tempo na sessão teste, antes de entrar no compartimento escuro, onde anteriormente recebeu o choque elétrico. No grupo controle (0), e nas outras concentrações de cobre (5, 20 e 60 µg/L), a latência para entrar no compartimento escuro aumentou significativamente de ~8 s na sessão-treino para 46-82 s na sessão teste (Fig. 7).

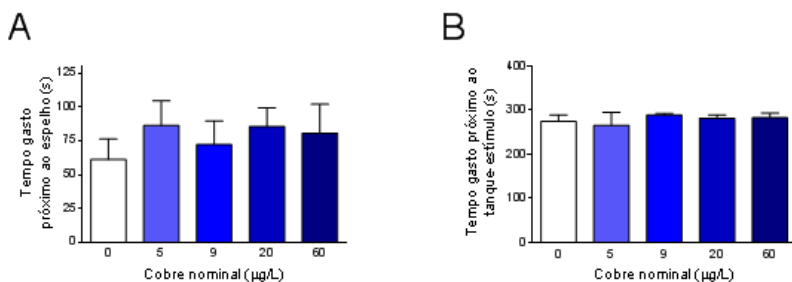
Somente os peixes expostos a 9 µg / L de cobre não tiveram suas memórias preservadas na tarefa de esquiva inibitória (p = 0,21), uma vez que a latência não aumentou (NS) na sessão de teste (Fig. 7). Ao



comparar o tempo de latência na sessão-teste entre os peixes mantidos sob condições controle ( $82,5 \pm 21,5$  s) e aqueles do grupo exposto a  $9 \mu\text{g/L}$  de cobre ( $25 \pm 9,0$  s), também foi observada um menor tempo de latência no grupo exposto a  $9 \mu\text{g/L}$  de cobre ( $p < 0,05$ ). Esta resposta indica que os peixes expostos a cobre ( $9 \mu\text{g} / \text{L}$ ) perderam sua capacidade de reter a memória.

O comportamento agressivo, avaliado por exposição de cada peixe individualmente a um espelho, não foi alterada pela exposição ao cobre, independentemente da concentração testada (Fig. 8A). Além disso, a interação social também não foi afetada pela exposição ao cobre (Fig. 8B).

Figura 8 - O comportamento agressivo e interação social do peixe paulistinha adulto exposto a cobre dissolvido por 96 h



Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

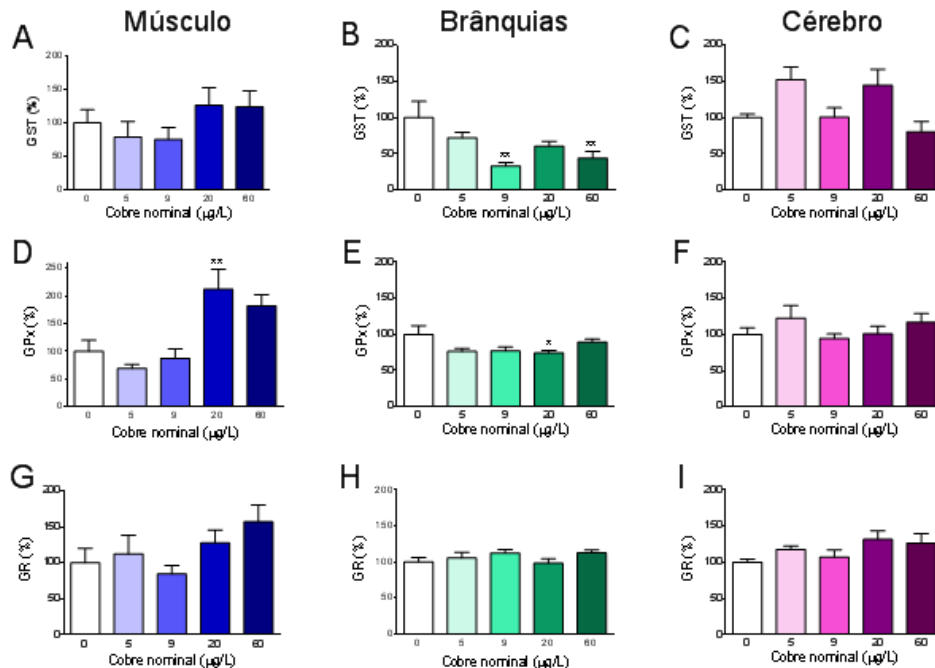
De acordo com a análise realizada, (A) O comportamento agressivo ( $n = 12-15$ ) foi avaliado pelo teste do espelho e o tempo próximo ao espelho foi registrado. (B) A interação social ( $n = 4-5$ ) foi avaliada quando os peixes foram colocados entre um tanque vazio, e um tanque-estímulo contendo 15 peixes paulistinhas adultos. O tempo gasto pelos peixes perto do tanque-estímulo foi gravado. Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos de cobre e o grupo controle (0)

### 3.2.3 Enzimas relacionadas à glutatona

As atividades de três enzimas relacionadas ao metabolismo da GSH (GST, GPx e GR) foram avaliadas em brânquias, músculos e cérebro de paulistinha adulto. A exposição ao cobre induziu alterações

na atividade GST nas brânquias (Fig. 9B), mas não no cérebro ou músculo (Fig. 9A e C). Atividade GST de brânquias foi 67 e 44% mais baixa em peixes expostos a 9 e 60  $\mu\text{g/L}$  de cobre, respectivamente. No entanto, não houve alterações significativas na atividade GST em brânquias em peixes expostos a 5 e 20  $\mu\text{g/L}$  de cobre em relação ao peixe do grupo controle (Fig. 9B). Atividade da GPx aumentou 2,1 vezes no músculo dos peixes expostos a 20  $\mu\text{g} / \text{L}$  de cobre (Fig. 9D), mas apresentou uma atividade mais baixa (75%) nas brânquias do peixe pulistinha (Fig. 9E). Atividade da GPx permaneceu inalterada no cérebro de peixes expostos ao cobre (Fig. 9F). Atividade GR permaneceu inalterada no músculo, cérebro e brânquias de peixes expostos ao cobre (5-60  $\mu\text{g} / \text{L}$ ) por 96 h (Fig. 9 G-I).

Figura 9 - Atividades de enzimas relacionadas com a glutatona nos tecidos de peixe paulistinha adultos expostos ao cobre dissolvido durante 96 h



Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

De acordo com as análises da Figura 9, destaca-se: (A-C) - glutathiona S-transferase (GST), (D-F) a glutathiona-peroxidase (GPx), e (G-I) de glutathiona redutase (GR) no músculo (A, D e G), brânquias (B, E e H) e cérebro (C, F e I). Os valores são expressos em percentagem do grupo de controle. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 5-6). Valores médios com diferenças significativas em relação ao grupo de controle (0) são indicados como \* (P < 0,05), e \*\* (P < 0,01)

### 3.3 Discussão

Parâmetros comportamentais, geralmente são bons indicativos de funções neurológicas alteradas e podem ser analisados em larvas de paulistinha 4 dias após a fertilização ou em indivíduos adultos (BLANK et al., 2009; IRONS et al., 2010; JIA et al., 2014). A atividade locomotora pode refletir componentes que modulam a taxa de disparo de neurônios, apresentando potencial para afetar a velocidade do nado e a distância percorrida (TIERNEY, 2011).

As larvas de paulistinha apresentaram um aumento na velocidade média e máxima de nado e na distância percorrida após serem expostos a concentração de 9  $\mu\text{g/L}$  de cobre. A velocidade máxima também foi aumentada na concentração de cobre de 20  $\mu\text{g/L}$  (Fig. 5C). As concentrações de 5 ou 60  $\mu\text{g/L}$  não apresentaram efeitos sobre estes parâmetros de nado em larvas de paulistinha. De forma interessante, o desempenho no nado de ciprinídeos e truta-arco-íris, foi diminuído após a exposição ao cobre (30  $\mu\text{g/L}$ ), apresentando uma tendência de recuperação com passar do tempo (DE BOECK et al., 2006). A exposição a concentrações de cobre de 105  $\mu\text{g/L}$  também diminuiu o desempenho de nado da truta-arco-íris (WASER et al., 2009). As alterações observadas após a exposição a concentrações baixas e médias de cobre (9 e 20  $\mu\text{g/L}$ ) podem ser resultado do comprometimento de circuitos neuroquímicos específicos, como a sinalização colinérgica, por exemplo, conforme proposto por autores em estudos utilizando indivíduos adultos de paulistinha (HAVERROTH et al., 2015; DE LIMA et al., 2013).

A exposição na concentração mais elevada de cobre testada (60  $\mu\text{g/L}$ ) promoveu uma diminuição de 5% no comprimento das larvas de paulistinha, indicando um impacto negativo do cobre sobre o crescimento destas (Fig.4). Em estudo similar, a exposição a 53  $\mu\text{g/L}$  de cobre em 72 hpf não afetou a mortalidade dos embriões, eclosão dos ovos e batimento cardíaco, tampouco afetou o comprimento das larvas

de *Danio rerio*, contudo o número de neuromastos visíveis diminuiu na concentração de 68  $\mu\text{g/L}$  de cobre (JOHNSON et al., 2007b). Mesmo sem tais efeitos, a mortalidade de neuromastos foi associada com marcadores de estresse oxidativo, o que foi sugerido como um mecanismo de toxicidade induzido por cobre nas larvas de *Danio rerio* (OLIVARI et al., 2008). Estes efeitos foram imediatos, sendo observados poucas horas após a exposição a 30  $\mu\text{g/L}$  de cobre. Em estudo realizado por Johnson et al (2007) os mesmos parâmetros foram comprometidos por concentrações maiores de cobre, indicando a toxicidade do cobre quando presente em altas concentrações. Em relação a isto, a diminuição de 5% no comprimento das larvas de paulistinha na concentração de 60 $\mu\text{g/L}$  de cobre, parece representar um efeito na área limítrofe entre toxicidade e não toxicidade do cobre.

A introdução a um ambiente não familiar (novo) induz ao comportamento exploratório, levando a formação de um mapa cognitivo, que é dependente de plasticidade neural. Interferências no comportamento exploratório podem ser usadas como um índice de comprometimento neurológico. Sabe-se que drogas ansiolíticas e ansiogênicas podem interferir com o comportamento exploratório, conforme descrito na literatura (TIERNEY, 2011). A memória espacial foi avaliada em peixes tratados com cobre através do teste do labirinto em Y (Fig. 6). A exposição de paulistinha as concentrações de 0, 5, 9 e 20  $\mu\text{g/L}$  de cobre não foi capaz de alterar o comportamento exploratório, uma vez que todos os grupos estudados passaram mais tempo no braço novo (ambiente não familiar). No entanto, este efeito não foi observado nos peixes tratados com a concentração de 60  $\mu\text{g/L}$  de cobre, uma vez que o tempo de exploração do ambiente não familiar foi estatisticamente similar aos demais braços. Este dado indica que o tratamento com cobre é capaz de prejudicar a aquisição e/ou a consolidação da memória espacial.

No presente estudo, foi utilizado um espelho inclinado para estimular um comportamento conespecífico e para avaliar a agressividade. Concentrações de cobre de até 60  $\mu\text{g/L}$  não tiveram efeito sobre o comportamento agressivo ou interação social (tempo de nado próximo ao espelho) do paulistinha (Fig. 8 A-B). Desta forma, estes dados sugerem que o tratamento com cobre não altera o comportamento de viver em grupo do paulistinha. Além disso, o comportamento dominante não foi alterado pela exposição a 30  $\mu\text{g/L}$  de cobre por 48 h na mesma espécie (SLOMAN et al., 2002).

O teste de esquiwa inibitória foi validado para paulistinha, e prevê

que os peixes devem aprender a permanecer no compartimento claro e evitar nadar para o compartimento escuro, no qual recebem um choque elétrico (BLANK et al., 2009; MOREIRA-SANTOS et al., 2008; NG et al., 2012). Um desempenho ruim neste teste foi recentemente associado com forte diminuição de genes relacionados à neuroplasticidade, bem como estresse do sistema endócrino (MANUEL et al., 2014). De modo interessante, a exposição a 9  $\mu\text{g/L}$  de cobre, mas não concentrações menores (5  $\mu\text{g/L}$ ) ou maiores (20 ou 60  $\mu\text{g/L}$ ), levou a uma perda acentuada na retenção de memória no teste de esQUIVA inibitória (Fig. 7). Este efeito é claramente negativo para o animal, uma vez que isto pode diminuir a aptidão para sobrevivência no ambiente. Dados da literatura sugerem que comportamentos defensivos de zebrafishes adultos são afetados por exposições agudas a cobre, o que tem por base os efeitos desse metal sobre a atividade locomotora e aversão a ambientes iluminados (HAVERROTH et al., 2015).

A exposição prolongada (28-30 dias) a cobre (4-700  $\mu\text{g/L}$ ) parece não ter grande efeito sobre as enzimas antioxidantes (NUNES et al., 2014; QU et al., 2014b). Paulistinha expostos por 24 h a concentrações baixas de cobre (6  $\mu\text{g/L}$ ) não tiveram alterações nas enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e níveis de tióis (HAVERROTH et al., 2015). No entanto, um trabalho recente da literatura demonstrou que a exposição de paulistinha a cobre (700  $\mu\text{g/L}$ , 96h) gera aumento de estresse oxidativo e diminuição das enzimas antioxidantes, dentre as quais GPx e GST (WANG et al., 2015). A exposição a 100  $\mu\text{g/L}$  de cobre por 3 dias causa diminuição na atividade da GPx hepática em linguados, o mesmo efeito também ocorreu com as defesas antioxidantes (QU et al., 2014b). No presente estudo, a atividade da GST (9 e 60  $\mu\text{g/L}$ ) e da GPx (20  $\mu\text{g/L}$ ) diminuíram em brânquias de paulistinha expostos ao cobre (Fig. 9B e E), concordando com dados prévios da literatura (QU et al., 2014b; WANG et al., 2015). Contudo, as brânquias demonstraram ser o tecido mais afetado, fato que precisa de investigações futuras para que o mecanismo envolvido nesta mudança possa ser esclarecido.

As enzimas relacionadas a glutathione (GST, GPx, GR) não sofreram alteração no cérebro de paulistinha expostos a cobre por 96h (Fig. 9 C, F e I). No entanto, na concentração de 20  $\mu\text{g/L}$  de cobre, a atividade GPx apresentou aumento no tempo de 96 h (Fig. 9E). Deve-se considerar que as brânquias são o tecido em contato direto com a água contendo o cobre, dessa forma, isto pode justificar o fato de o cérebro e os músculos serem menos afetados.

A definição dos limites permitidos no meio ambiente para o cobre e de outros compostos, é uma questão atual em debate no mundo. O efeito das substâncias químicas sobre os organismos vivos, em concentrações abaixo dos níveis recomendados ou ambientalmente relevantes em locais contaminados, pode contribuir para uma melhor avaliação dos riscos e segurança destes, ao mesmo tempo em que pode gerar conhecimento sobre possíveis efeitos adversos e também benéficos dos produtos químicos (RIETJENS; ALINK, 2006). Além disso, níveis baixos de químicos costumam gerar respostas do tipo bifásicas, as quais são fenômenos biologicamente reconhecidos (CALABRESE, 2013; HANEKAMP; CALABRESE, 2006). No entanto, respostas bifásicas podem não estar unicamente limitadas a respostas adaptativas, mas acompanhadas por uma ativação transcricional de diferentes vias, as quais podem interagir levando ao aumento do nível de complexidade em estudos toxicológicos (STEINBERG et al., 2008). A dose-resposta do cobre neste estudo se assemelha a uma curva em formato de U, indicando que alvos específicos podem ser afetados, claramente indicando a necessidade de estudos dos mecanismos associados a estas respostas.

Por outro lado, uma combinação de fatores pode levar a efeitos imprevisíveis, como por exemplo, uma interação entre hipóxia e toxicidade induzida por manganês tem sido proposta em tecidos de jundiás (DOLCI et al., 2013). Mudanças ambientais, como salinidade, podem afetar a resposta de *Fundulus heteroclitus* ao zinco, uma vez que aumentos na salinidade exercem efeitos protetores contra a toxicidade induzida por doses letais e não letais de zinco (LORO et al., 2014).

Agências regulatórias (EPA, 2007, 2012; European Union, 2015), estabeleceram uma gama ampla nas concentrações permitidas de cobre na água, indo de 1 a mais de 100 µg/L. O limite superior de cobre estabelecido pela Agência regulatória brasileira é de 9 µg/L em ecossistemas aquáticos para aquicultura (CONAMA, 2005b). No entanto, na grande maioria dos rios no Estado de São Paulo, a quantidade de cobre diluída na água excede este limite, variando de 10 a 20 µg/L (CETESB, 2009). Os peixes no início da vida são frequentemente afetados por concentrações de cobre em torno de 9 µg/L (EPA, 2007). Neste contexto, o presente estudo demonstrou que concentrações ambientalmente relevantes de cobre (9 e 20 µg/L) afetam enzimas antioxidantes como GST e GPx. Além disso, os critérios de uso de recursos hídricos brasileiros em relação aos níveis de cobre (9 µg/L), não podem evitar alterações comportamentais no desempenho natatório

de larvas de paulistinha, bem como não podem evitar o déficit de memória em paulistinha adultos.

Interações interespecíficas, como predação, e intraespecíficas, como formação de cardumes e acasalamento, são altamente relevantes para a vida dos peixes. A sobrevivência e reprodução dos peixes dependem de um desempenho comportamental apropriado. Evitar predadores, assim como comportamentos sociais e reprodutivos são interações sociais cruciais para uma estratégia de sobrevivência bem-sucedida. A exposição a poluentes pode alterar padrões de comportamento normais, levando ao aumento da chance de uma população de peixes ser malsucedida, o que normalmente ocorre em níveis bem abaixo dos necessários para causar mortalidade. Indicadores comportamentais de toxicidade podem detectar impactos subletais de poluentes. Neste sentido, níveis subletais de cobre foram capazes de prejudicar a resposta de condicionamento a ambientes não familiares e condicionamento ao medo, fatores que são claramente negativos para a sobrevivência dos peixes adultos. Com relação à resposta larval, o cobre tem um efeito potencial de aumentar o gasto energético, uma resposta potencialmente mal adaptativa. Os resultados do presente estudo são importantes considerando que alterações de comportamento podem afetar o desempenho adaptativo ou mesmo a sobrevivência dos animais afetados.



## **CAPÍTULO 2 - RESPOSTAS ENZIMÁTICAS DE *CRASSOSTREA BRASILIANA*, EXPOSTAS AO MANGUE DO ITACORUBI**

### **4 APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO**

Este trabalho foi realizado em colaboração com alunos de pós-graduação da UFSC, orientados pelos professores Afonso Celso Dias Bairy e Maria Risoleta Freire Marques, do Departamento de Bioquímica da UFSC. Uma parte significativa do trabalho, envolvendo análises moleculares deste trabalho, foi realizada pelos colaboradores da UFSC, enquanto que as análises químicas foram realizadas pelo Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

O trabalho desenvolvido neste capítulo faz parte da pesquisa desenvolvida pelo INCT-TA (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática), na qual tem entre seus objetivos realizar estudos avançados em toxicologia aquática e atividades de vanguarda relacionadas ao desenvolvimento e aplicação de ferramentas químicas, biológicas e de modelagem ecotoxicológica com vistas à conservação dos recursos hídricos brasileiros (<http://www.inct-ta.furg.br/objetivos.html>, acesso em Março de 2016). Um dos objetivos do INCT-TA, foi o de incluir espécies nativas, neste sentido, a espécie de ostra escolhida para este estudo foi a ostra *Crassostrea brasiliana*. Entre os contaminantes escolhidos pelo INCT-TA, está o esgoto sanitário. Desta forma, ostras nativas da espécie *C. brasiliana* foram expostas por 24 e 48 h em dois experimentos, um na primavera (novembro de 2011) e outro no verão (abril de 2012). Este trabalho foi submetido para publicação: Biomarkers in oyster, *Crassostrea brasiliana*, following in situ exposure at Itacourubi mangrove, Santa Catarina, Brazil). (BITENCOURT-ACOSTA, et al., 2016).

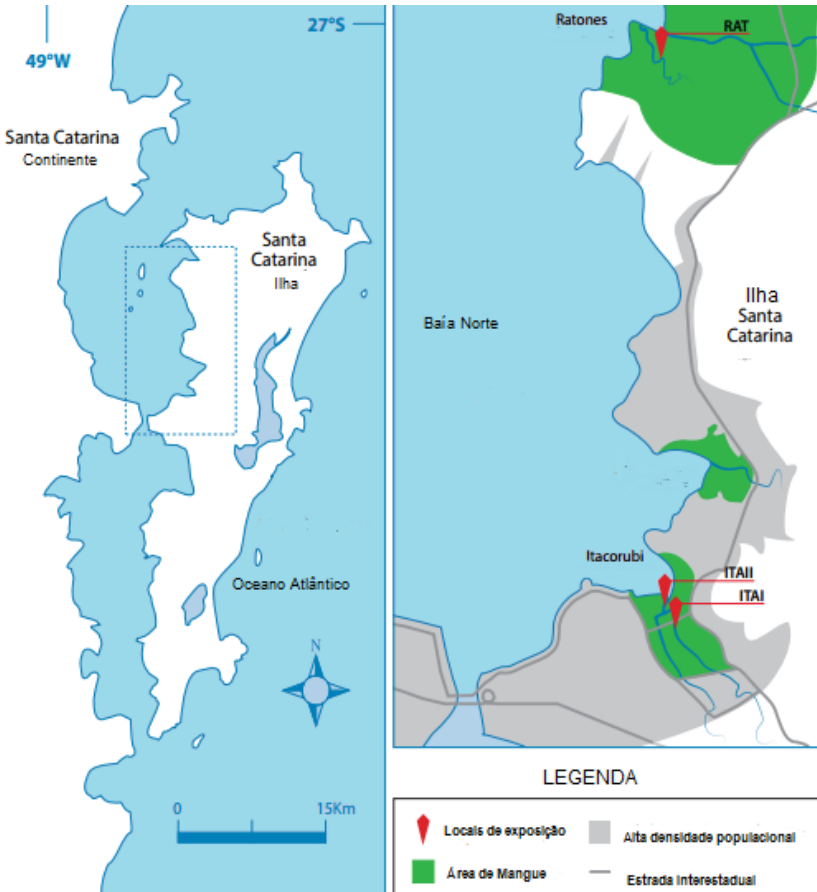
#### **4.1 Metodologia**

##### **4.1.1 Área de estudo**

O mangue do Itacorubi (ITA) é uma floresta mista dentro de uma bacia encontrada em zona de maré, com uma área de 2.845 ha (27 ° 34'14 " - 27 ° 35'31 " S e 48 ° 30'07 " - 48 ° 31'33 " W) (Figura 10), está localizado na ilha de Santa Catarina, onde se situa Florianópolis, a principal cidade do Estado de Santa Catarina, Brasil (Rovai et al 2012). ITA recebe águas residuais provenientes de bairros residenciais

circundantese é considerado como uma área impactada. O mapa da Figura 10 representa o local onde foram realizados os experimentos de campo.

Figura 10 - Mapa da área de estudo



Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

A população de Florianópolis triplica durante o verão, passando de cerca de 350.000 a 1 milhão. Como consequência, há um incremento significativo no despejo de esgoto sanitário. Uma análise prévia dos dados disponíveis (SILVA et al 1996;. MATER et al 2004;. VIEIRA

2007), indicaram níveis de metais traço acima dos limites permitidos pela legislação local. Vários relatórios indicam a influência antrópica negativa em terras ocupadas ilegalmente por residências (VIEIRA, 2007), incluindo uma redução da diversidade bentônica (PAGLIOSA; BARBOSA 2006) e contendo vestígios de estrogênio (Froehner et al. 2011).

A contaminação fecal tem sido documentada tanto como contagens de *Escherichia coli* ou de detecção de níveis elevados de coprostanol (MATER et al 2004; VIEIRA, 2007). A presença de agentes patogênicos humanos, tais como vírus e protozoários, tem sido demonstrado em alguns locais situados próximos aos pontos de exposição (ITA) (SOUZA et al. 2013).

#### **4.1.2 Aclimação e exposição in situ de ostras**

Com a clara indicação de contaminação de despejo de efluente domésticos no manguezal do Itacorubi, dois locais distintos foram escolhidos para este estudo de exposição *in situ*: ITA I (27 ° 34'40 "S - 48 ° 30'59" W) e ITA II (27 ° 34 ' 35 "S - 48 ° 31'9" W), localizadas respectivamente a montante e a jusante do Rio Itacorubi, rio que atravessa o manguezal do Itacorubi (Fig. 10). Esta região recebe águas residuais provenientes de bairros residenciais circundantes e é considerada como uma área contaminada por efluentes domésticos. No verão a população de Florianópolis triplica por ser um pólo turístico, trazendo como consequência, um aumento significativo no despejo de esgoto doméstico.

O Rio Ratonas, que atravessa o manguezal de Ratonas, foi escolhido como o local de referência (RAT, Fig. 10). RAT é encontrado em 27 ° 28'17 "S - 48 ° 31'17" W, no lado norte da ilha, dentro de uma área protegida chamada "Estação Ecológica de Carijós", mantidos sob a administração de uma FATMA. O manguezal de Ratonas contrasta com o manguezal do Itacorubi, apresentando poucos sinais de contaminação (NETTO; GALLUCCI 2003; BARTH et al 2005).

Indivíduos da espécie *Crassostrea brasiliiana* (5-8 cm de comprimento) foram obtidas na praia de Sambaqui, como uma doação do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), da Universidade Federal de Santa Catarina. As ostras foram mantidas por 14 dias no laboratório para a aclimação, em tanques de 15 L com 1L / ostra. A água foi renovada diariamente e os animais alimentados com uma dieta comercial (Sera Liquid®) antes da mudança da água. A salinidade foi

reduzida para 18 ‰, através de decréscimo diário de 1-2 ‰, a partir da salinidade inicial de 35 ‰.

O experimento foi realizado em dois momentos distintos, um na primavera (novembro de 2011) e outro no outono (abril de 2012). Para o experimento, os animais foram transferidos do laboratório para o local de referência (RAT) e de exposição (ITA I e ITA II) em um mesmo dia. Estes foram mantidos em lanternas de cultivo localizadas ~30 cm abaixo da superfície da água. Estes dispositivos flutuantes estavam ancorados para evitar deriva. As ostras foram retiradas depois da exposição *in situ* por 24 e 96 horas, e as análises bioquímicas foram realizadas em brânquias e glândulas digestivas de ostras *C. brasiliana*. A presença de contaminantes foi investigada nos tecidos das ostras e também no sedimento.

#### **4.1.3 Análise química e físico-química da água**

O equipamento portátil multi-parâmetro (YSI; 556 MPS) foi utilizado para avaliar os parâmetros físico-químicos da água: temperatura, salinidade, condutividade, transparência e pH (Tabela 1). Demanda bioquímica de oxigênio, coliformes fecais e coliformes totais também foram medidos através de métodos convencionais, como apresentado na Tabela 1.

Sedimento (250 g) foi amostrado no último dia experimental para analisar a presença de poluentes potenciais, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilos policlorados (PCBs), e os alquilbenzenos lineares (LABs). As mesmas análises foram realizadas nos tecidos (carcaça) de ostras expostas *in situ* no Outono. As amostras foram tomadas antes da exposição (Tempo 0), e após 24 h e 96 h de exposição *in situ*.

As amostras de sedimento e de tecido foram liofilizadas (Thermo Savant lyophilizer – Modulyo D) durante 72 horas e, em seguida, triturados e homogeneizados com um pilão. A análise de PCBs, PAHs e LABs foram realizadas de acordo com os procedimentos previamente descritos (LÜCHMANN et al 2011; FLORES-NUNES 2013).

#### **4.1.4 Defesas antioxidantes**

Para determinar os níveis de GSH (soma de glutatona reduzida e oxidada, GSH + GSSG) em brânquias e glândulas digestivas, as amostras de ostra foram homogeneizadas em 900 mL de ácido

perclórico 0,5 M. Os homogenatos foram centrifugados a 15.000 g durante 2 min a 4 ° C. O extracto ácido foi neutralizado e diluído em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, 1 mM EDTA (pH 7,0). A medição de GSH foi baseada no ensaio de reciclagem de 5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico)/glutationa redutase (GR) (Akerboom e Sies 1981). Uma curva padrão utilizando quantidades conhecidas de glutatona foi usada para obter valores reais, e os dados normalizados para o peso do tecido.

Para as atividades das enzimas antioxidantes, o tecido congelado foi homogeneizado em tris (hidroximetil) aminometano 50 mM, 0,15 M de KCl, 0,1 mM de fluoreto de fenil-metano-sulfonilo (pH 7,4), na proporção de 1:4 (peso / vol.). O homogenato foi centrifugado a 9000 g durante 30 minutos (4 °C) e o sobrenadante foi tomado como uma fração citosólica para as análises enzimáticas.

As atividades enzimáticas foram determinadas espectrofotometricamente utilizando um leitor de placas de UV / Vis. Atividade da catalase (CAT) foi medida pela taxa de desaparecimento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm (Aebi 1984). A glutatona S-transferase (GST) foi ensaiada pela taxa de conjugação de glutatona com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno a 340 nm e a reação espontânea foi subtraída das leituras (HABIG; JAKOBY, 1981). Atividade de GR foi medida a 340 nm por meio da taxa de consumo de NADPH na presença de glutatona oxidada (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A atividade da tioredoxina redutase (TrxR) foi medida a 412 nm por meio da taxa de redução de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico), na presença de NADPH (ARNER et al., 1999). Atividade da glutatona peroxidase (GPx) foi medida a 340 nm por meio da taxa de consumo de NADPH na presença de GR, glutatona e hidroperóxido de cumeno (WENDEL, 1981).

#### **4.1.5 Análise estatística**

Dados das atividades enzimáticas foram analisados pela ANOVA de uma via e as diferenças entre os grupos referência (RAT) versus grupos expostos (ITA I e ITA II) foram realizadas pelo teste Tukey, quando apropriado. Homogeneidade de variância foi verificada com o teste de Bartlett's. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## 4.2 Resultados

### 4.2.1 Parâmetros físico-químicos

A análise de água revelou temperatura estável, valores médios de 23,5 e 25 °C e pH em torno de 7,6, enquanto as flutuações na salinidade 18-36 ‰ foram observadas, como esperado para uma zona de marés (Tabela 1). Os valores da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) no local de referência (RAT) estavam dentro dos valores esperados (<2-3 mg / mL) para a água de manguezal que normalmente contém pequenas quantidades de material orgânico (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos nos locais de estudo e número mais provável como um índice de coliformes fecais e totais

Parâmetros	Verão			Outono		
	RAT	ITAI	ITAI	RAT	ITAI	ITAI
Temperatura (°C)	24.6 ± 1.2	25.0 ± 1.4	24.8 ± 1.3	25.0 ± 0.7	23.5 ± 0.1	24.0 ± 0.3
pH	7.5 ± 1.2	7.6 ± 0.4	7.6 ± 0.5	7.8 ± 0.5	7.7 ± 0.3	7.8 ± 0.3
Salinidade (ppt)	26.2 ± 8.8	29.7 ± 5.4	27.2 ± 8.0	34.3 ± 2.4	25.1 ± 8.5	26.0 ± 8.3
Demanda Bioquímica de Oxigênio (mg/L)	<2.0	<2-2.9	<2-3.9	<2-3.0	6.0 ± 1.7	4.7 ± 0.6
Transparência (cm)	86.0 ± 15.1	55.0 22.5	60.7 ± 23.4	64.3 ± 9.3	55.7 ± 9.8	63.7 ± 10.0
Coliformes Termotolerantes <sup>1</sup>	0.26 ± 0.23	12.9 ± 10.0	13.3 ± 7.37	0.07 ± 0.03	30.0 ± 0.0	27.0 ± 5.2
Coliformes Total	1.40 ± 1.47	27.0 ± 5.20	117 ± 15.8	0.16 ± 0.12	50.0 ± 0.0	50.0 ± 0.0

<sup>1</sup> – Índice de coliformes são apresentados como 1000 x MPN/100 mL.

Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

Percebe-se na Tabela 1 que, em 0, 24 e 96 h de água foi amostrado e analisado, e os dados apresentados como a média  $\pm$  D.P.

As áreas contaminadas (ITA I e ITA II) apresentaram valores de DBO superiores, em comparação com o local de referência (RAT), especialmente durante o outono, atingindo valores até 8 mg / mL. Os níveis de coliforme variaram em RAT foram de 40-500 NMP / 100 mL de água (Tabela 1). Na primavera, os níveis de coliformes termotolerantes em ITA I e II foram ~50 vezes mais elevado em comparação com o local de referência (RAT). Este valor foi ainda maior durante o outono, apresentando valores aproximadamente 400 vezes mais elevados do que as observadas em RAT.

#### **4.2.2 PAH, PCBs e LABs**

Níveis de HPAs, PCBs e LABs foram avaliados no sedimento (Tabela 2) e em todo o tecido mole de ostras expostas e não expostas (Tabela 3 e 4). Os níveis de PCBs estiveram abaixo do limite de detecção no sedimento (Tabela 2), bem como nos tecidos moles de ostras (dados não mostrados). HPAs e LABs foram mais abundantes no sedimento coletado nos locais contaminados (ITA I e ITA II); em comparação com o local de referência (RAT).



Tabela 2 - Bifenilos policlorados (PCBs), alquilbenzenos lineares (LABs) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) da área de estudo amostrados no final do experimento (96 h)

Contaminantes	Verão			Outono		
	RAT	ITAI	ITAI	RAT	ITAI	ITAI
<b>PCBs</b>						
Total	<0.51 <sup>a</sup>	<0.51	<0.51	<0.51	<0.51	<0.51
<b>HPAs</b>						
Leve <sup>b</sup>	<1.10	30.8	57.7	<1.10	23.1	3.60
Pesado	<1.00	76.1	95.7	<1.00	91.7	55.5
Total	<1.00	108	155	<1.00	142	76.2
Relação Leve/Pesado	n.c.	0.41	0.60	n.c.	0.30	0.10
<b>LABs</b>						
∑C10 LAB	<1.68	25.3	16.7	<1.68	20.2	21.9
∑C11 LAB	<0.85	88.4	64.1	<0.85	82.9	76.4
∑C12 LAB	<0.99	156	120	<0.99	157	130
∑C13 LAB	<1.31	220	173	<1.31	231	177
∑C14 LAB	<0.85	6.67	5.31	<0.85	9.64	4.28
∑Total LABs	<0.85	497	379	<0.85	501	409
Relação I/E <sup>d</sup>	n.c.	2.19	2.75	n.c.	2.23	1.95

Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

Ao final do experimento foram coletados sedimentos para análise.<sup>a</sup> Os valores são expressos em ng / g de matéria seca e "<" indica os valores limites de detecção; <sup>b</sup> HPAs leves = 2 e 3 anéis aromáticos; <sup>c</sup> HPAs pesados = 4, 5 e 6 anéis aromáticos; <sup>d</sup> Proporção de isômeros interno para externo de C<sub>12</sub> LABs; N. C. = Não calculada.

Os níveis de HPAs foram abaixo dos níveis detectáveis (<1 ng/g de peso seco) no local de referência (RAT). Estes valores atingiram 108/142 no ITA I, e 76/155 ng/g de peso seco em ITAI, na primavera e outono, respectivamente. HPAs totais, em tecidos moles de *C. brasiliensis* foram mais do que o dobro (24 horas) em ITAI e II (12,6 e 20,4), quando comparados com animais expostos no local de referência

(RAT) (6,9 ng/g).

Tabela 3 - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) em tecidos moles de ostras *C. brasiliana*

HPAs	0 h	24 h			96 h		
		RAT	ITAI	ITAI	RAT	ITAI	ITAI
Trimetilnaftaleno	<7.2 <sup>b</sup>	<7.27	<7.27	<7.27	<7.27	36.7	33.1
Fenantreno	3.69	6.93	12.6	11.6	<3.48	18.0	21.6
Dimetildibenzotiofeno	<2.81	<2.81	<2.81	<2.81	<2.81	18.9	<2.81
Metilfenantreno	<5.85	<5.85	<5.85	<5.85	<5.85	17.0	<5.85
Dimetilfenantreno	<5.85	<5.85	<5.85	<5.85	<5.85	6.78	<5.85
Fluoranteno	3.39	<2.63	<2.63	4.49	<2.63	4.22	16.14
Pireno	<2.45	<2.45	<2.45	4.38	<2.45	2.77	7.77
Criseno	<3.52	<3.52	<3.52	<3.52	<3.52	<3.52	8.82
Total	7.08	6.93	12.6	20.4	<1.14	104	87.0
Leve <sup>c</sup>	3.69	6.93	12.6	15.9	<1.41	100	62.5
Pesado <sup>d</sup>	3.39	<1.14	<1.14	4.49	<1.14	4.22	25.0
Relação leve/pesado	1.09	>6.08	>11.1	3.55	n.c.	23.7	2.50

Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

As medições de HPAs foram realizadas em condições de laboratório (0 h), ou após 24 e 96 h de exposição nos locais indicados durante o verão. Onde: <sup>a</sup> níveis de HPAs foram limites de detecção em amostras obtidas durante o outono; <sup>b</sup>Valores são expressos em ng/g de tecido seco e "<" indica os valores limites de detecção de Outono; <sup>c</sup> HPAs leves = 2 e 3 anéis aromáticos; <sup>d</sup> pesado HPAs = 4, 5 e 6 anéis aromáticos; N. C. = Não calculado.

Em 96 horas, os HPAs não foram detectáveis em tecidos moles de ostras expostas no RAT (<1,14 ng/g), mas altamente acumulados em animais expostos a ITA I (104 ng/g) e ITA I (87 ng/g). HPAs leves foram predominantemente aumentados em ITA I (96h), onde trimetilnaftaleno (36,7), fenantreno (18), metildibenzotiofeno (18,9) e metilfenantreno (17 ng/g) foram responsáveis por mais de 85% do total de HPAs detectados.

Tabela 4 - Alquilbenzenos lineares (LABs) nos tecidos moles de *C.brasiliiana*

	Verão									Outono								
	0 h			24 h			96 h			0 h			24 h			96 h		
	RAT	ITA I	ITA II	RAT	ITA I	ITA II	RAT	ITA I	ITA II	RAT	ITA I	ITA II	RAT	ITA I	ITA II	RAT	ITA I	ITA II
Σ C10 LAB	34,6 <sup>a</sup>	30,2	20,6	10,0	22,2	14,9	9,0	35,0	22,7	40,7	35,4	23,8	55,0	103				
Σ C11 LAB	68,0	60,2	42,0	28,3	76,2	45,5	36,7	84,0	56,8	77,9	86,8	39,1	76,2	136				
Σ C12 LAB	81,0	59,7	40,6	25,0	123	65,8	53,9	46,1	46,7	66,7	66,0	36,2	62,7	121				
Σ C13 LAB	53,1	53,9	49,4	22,3	233	165	100	80,9	63,5	74,5	58,8	40,5	61,3	112				
Σ C14 LAB	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05	<1.05				
Σ 7Cn LAB	15,9	11,6	11,6	5,94	57,0	39,8	26,8	10,3	12,7	14,9	11,6	9,2	12,4	26,9				
Σ 6Cn LAB	51,9	39,0	30,6	19,0	113	64,8	47,5	48,5	38,6	50,8	56,3	28,0	50,2	117				
Σ 5Cn LAB	61,3	48,5	35,1	20,2	94,8	44,3	35,3	87,0	68,5	58,1	60,8	33,9	68,0	160				
Σ 4Cn LAB	46,4	37,8	23,2	15,8	57,6	29,8	24,1	40,6	37,4	42,3	47,7	22,6	52,1	77,1				
Σ 3Cn LAB	32,1	29,9	23,4	12,0	64,4	65,3	36,3	28,3	15,1	43,5	27,6	19,5	34,4	38,9				
Σ 2Cn LAB	29,1	37,2	28,7	12,5	68,3	47,3	29,8	31,3	17,4	50,2	43,3	26,6	38,1	52,6				
Σ Interno	129	99,2	77,3	45,2	265	149	110	146	120	124	129	71,1	131	304				
Σ Externo	108	105	75,3	40,3	190	142	90,2	100	69,9	136	119	68,6	125	169				
Relação I/E **	0,82	0,86	0,95	0,75	1,33	1,01	1,04	1,98	1,13	0,96	1,27	1,02	0,98	1,95				
Σ Total LABs	237	204	153	85,5	455	291	200	246	190	260	247	140	255	472				

Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

As medições de LABs foram realizadas em condições de laboratório (0 h), ou após 24 e 96 h de exposição nos locais indicados.<sup>a</sup> Os valores são expressos em ng/g de tecido seco e "<" indicam valores abaixo dos limites de detecção.

LABs foram detectadas em todas as amostras de tecido do experimento, incluindo o tecido recolhido logo após aclimação laboratório (tempo zero, Tabela 4). Esta contaminação pode ser relacionada com o local de origem, do qual foram fornecidas as ostras. Exposição ao local de referência (RAT) diminui a concentração de LABs que já estavam presentes desde o início (246 ng/g tecido seco).

#### 4.2.3 Defesas Antioxidantes

Defesas antioxidantes foram avaliadas em brânquias (Tabela 5), bem como na glândula digestiva de *C. brasiliiana* exposta em locais ITA I, ITA II e local de referência, RAT (Tabela 6). Foram observadas diferenças significativas nos locais contaminados (ITA I, ITA II), em comparação com o local de referência (RAT), dados indicados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Antioxidantes nas brânquias de ostras expostas no Itacorubi mangue

Antioxidante		Verão				Outono			
		24h		96h		24h		96h	
		Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Catalase	RAT	99,8 ± 14,5 <sup>a</sup>		100,2 ± 11,9		99,8 ± 18,2		99,8 ± 17,3	
	ITAI	109,0 ± 11,7		60,2 ± 16,2**		97,2 ± 13,2		119,3 ± 15,4	
	ITAI	83,4 ± 36,7		109,2 ± 26,6		110,2 ± 22,7		123,2 ± 16,7	
Glutaciona Peroxidase	RAT	100,0 ± 12,0		99,8 ± 10,6		100,2 ± 22,7		100 ± 19,1	
	ITAI	84,0 ± 8,70*		62,3 ± 8,10*		103,3 ± 11,0		55,6 ± 3,78***	
	ITAI	113,4 ± 9,26		107,3 ± 27,2		108,7 ± 18,1		61,7 ± 5,54****	
Glutaciona Redutase	RAT	100,0 ± 27,7		99,8 ± 25,0		100,0 ± 7,0		100,0 ± 67,9	
	ITAI	88,7 ± 29,2		54,5 ± 17,8		107,8 ± 29,2		135,0 ± 35,0	
	ITAI	118,8 ± 20,3		102,7 ± 53,5		104,0 ± 15,5		147,8 ± 36,9	
Glutaciona S-Transferase	RAT	100,0 ± 36,7		95,2 ± 17,2		100,0 ± 15,3		100,0 ± 16,2	
	ITAI	118,3 ± 13,0		69,5 ± 18,7		110,7 ± 32,1		108,5 ± 11,4	
	ITAI	122,2 ± 7,73		142,3 ± 53,5		115,8 ± 20,3		130,2 ± 31,1*	
Tiorredoxina Redutase	RAT	99,8 ± 31,3		100,0 ± 25,1		100,0 ± 42,1		100,0 ± 24,5	
	ITAI	119,2 ± 32,8		159,7 ± 32,2*		91,7 ± 8,0		93,8 ± 16,8	
	ITAI	158,0 ± 66,2		151,4 ± 61,0		83,0 ± 17,0		76,5 ± 12,2	
Glutaciona	RAT	100,0 ± 42,6		100,2 ± 19,8		100,2 ± 25,1		99,8 ± 10,9	
	ITAI	132,8 ± 26,3		98,2 ± 16,8		106,5 ± 14,9		68,2 ± 17,1**	
	ITAI	165,3 ± 70,0		111,7 ± 17,0		89,7 ± 36,6		66,3 ± 9,20****	

Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

De acordo com as análises realizadas, <sup>a</sup> Valores foram normalizados para a média de local de referência (RAT). N = 5-6.

A atividade catalase foi ~40% menor nas brânquias em 96h de exposição na ITA I na primavera. Uma diminuição de ~15% da atividade da catalase também foi observada em ITA I e II na glândula digestiva, durante o outono, e em 96h. A atividade GPx foi 16-38% mais baixa nas brânquias dos animais expostos durante a primavera em 24 e 96 h, e em ITA I. Durante o outono, em 96 h, a diminuição de 38-44% na atividade GPx observada nas brânquias de animais expostos a ITA I e II.

Tabela 6 - Antioxidantes nas glândulas digestivas de ostras expostas no Itacorubi mangue

Antioxidante		Verão				Outono			
		24h		96h		24h		96h	
		Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Catalase	RAT	100,0 ± 18,7 <sup>a</sup>		100,2 ± 12,5		100,2 ± 63,9		100,0 ± 8,9	
	ITAI	117,8 ± 22,0		113,2 ± 6,7		80,3 ± 48,6		87,7 ± 3,8*	
	ITAI	87,0 ± 28,1		99,5 ± 18,7		155,3 ± 61,3		86,3 ± 11,4*	
Glutaciona Peroxidase	RAT	100,0 ± 19,6		100,0 ± 8,6		100,0 ± 21,9		100,0 ± 9,5	
	ITAI	77,6 ± 5,4**		114,3 ± 20,7		90,5 ± 14,2		101,5 ± 6,9	
	ITAI	69,2 ± 9,0**		158,6 ± 9,1*		115,0 ± 8,6		97,2 ± 13,0	
Glutaciona Redutase	RAT	99,8 ± 27,3		153,8 ± 31,3		100,2 ± 18,8		100,2 ± 17,8	
	ITAI	74,3 ± 16,4		157,0 ± 24,9		92,7 ± 27,8		85,7 ± 11,6	
	ITAI	100,5 ± 31,2		202,8 ± 55,0		71,6 ± 8,3		68,2 ± 11,3**	
Glutaciona S-Transferase	RAT	100,0 ± 44,8		100,0 ± 17,1		100,0 ± 14,8		100,1667 ± 17,1	
	ITAI	162,7 ± 43,9*		93,3 ± 31,1		97,2 ± 13,5		95,2 ± 13,5	
	ITAI	142,8 ± 28,1		132,7 ± 23,1		83,5 ± 27,5		73,3 ± 13,5	
Tiorredoxina Redutase	RAT	100,2 ± 27,3		100,0 ± 27,5		100,0 ± 38,4		100,0 ± 8,7	
	ITAI	127,5 ± 45,6		118,3 ± 41,5		66,8 ± 11,5		77,8 ± 13,4**	
	ITAI	152,3 ± 42,1		146,7 ± 42,1		66,7 ± 12,7		72,6 ± 4,3***	
Glutaciona	RAT	100,2 ± 15,7		100,0 ± 26,0		100,0 ± 23,9		100,0 ± 31,8	
	ITAI	147,7 ± 28,8		90,6 ± 22,3		81,8 ± 18,8		75,3 ± 11,1	
	ITAI	210,7 ± 77,0**		94,7 ± 28,3		70,0 ± 17,0*		78,3 ± 19,3	

Fonte: Elaborado pela Autora (2015).

De acordo com as análises realizadas,<sup>a</sup> Valores foram normalizados para a média de local de referência (RAT). N = 5-6. As diferenças significativas estão indicadas \* p <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001.

A atividade GPx na glândula digestiva mostrou um decréscimo de ~ 30% em ITA I e II, após exposição por 24 horas na primavera. A atividade GPx em ITA II mostrou aumento de ~60% na glândula digestiva após 96 h de exposição, durante a primavera. A atividade GST foi de ~30% maior nas brânquias, durante o outono em ITA II. Um aumento de 60% na atividade GST, também foi observado durante a primavera na glândula digestiva no ITA I, em 24h. Um aumento da atividade TrxR (60%) foi observada apenas nas brânquias de animais expostos a ITA I, em 96h, durante a primavera. Esta constatação contrasta com uma diminuição de 30% observada na glândula digestiva, em 96 horas, durante o outono, tanto no ITA I e ITA II.

Os níveis totais de glutaciona (GSH) foram ~30% inferiores nas brânquias, durante o outono em ITA I e ITA II, e em 96h, e na glândula

digestiva em 24 horas, e em ITA II. Por outro lado, durante a primavera, em ITA II, após 24 h, os níveis de GSH foram mais elevados (110%) na glândula digestiva, em comparação com o grupo mantido no local de referência (RAT).

### 3.3 Discussão

Sedimentos do local de referência (RAT) apresentaram níveis de PCBs, PAHs e LABs abaixo daqueles detectáveis conforme o esperado (Tab. 2). A presença e os níveis de determinados contaminantes podem delinear um quadro geral de quão impactada uma determinada área está. Com exceção dos níveis de PCBs, que estiveram abaixo dos níveis detectáveis (Tab. 2), ambos os sítios escolhidos para exposição *in situ* de *C. brasiliensis* no mangue do Itacorubi (ITA I e ITA II) apresentaram níveis totais de PAHs (76-155 ng/g de tecido seco) e LABs (379-501 ng/g de tecido seco) compatíveis com locais com contaminação moderada, de acordo com a literatura (HARTMANN et al., 2000; Scott and Jones, 2000). Todas as amostras de ITA I e ITA II (Tab. 1) apresentaram coliformes fecais acima dos limites aceitáveis (2500 MPN/100 mL) para o consumo humano (CONAMA, 2005a). Este cenário é compatível com uma elevada contaminação de esgoto sanitário na área de estudo, conforme sugerido pelos níveis elevados de coliformes fecais.

LABs são compostos orgânicos encontrados em águas residuais domésticas, e devido a sua hidrofobicidade relativamente alta, estes compostos são, na sua maioria, absorvidos pelos sedimentos ou pelo material particulado. Os níveis de LABs têm sido utilizados como indicadores confiáveis da contaminação de águas residuais domésticas (TAKADA et al., 1992; TSUTSUMI et al., 2002). Níveis totais de LABs em torno de 500 ng/g de matéria seca, são indicadores de áreas de contaminação moderada a alta (HARTMANN et al., 2000). Níveis consideráveis de LABs (246 ng/g de tecido seco) foram detectados no tempo zero (Tab. 4), indicando contaminação por LABs na área de cultivo (fonte das ostras para o estudo *in situ* no ITA I e ITA II). Os níveis totais de LABs diminuíram progressivamente para 190 em 24 h para 140 ng/g de tecido seco em 96 h (Tab. 4). Após 96 h, os níveis totais de LABs foram 3,4 e 1,8 vezes maiores em ITA I e ITA II, respectivamente, quando comparados a RAT (Tab. 4). A soma dos LABs C10 - C13 apresentou o mesmo padrão de aumento após exposição a ITA I / ITA II, visto que a relação de LABs internos para

externos foi de aproximadamente 1. A relação de isômeros de LABs internos para externos (I/E) em amostras de tecido pode ser interpretada como um indicativo de derivados mal ou diferencialmente metabolizados. Isômeros externos de LABs podem ter sido mais degradados em relação aos internos, talvez como uma consequência de uma maior facilidade em quebrar as cadeias de alquilas maiores. Por outro lado, deve-se levar em consideração que, ao contrário de interpretar achados em sedimentos em relação à razão I/E, a interpretação destes dados em organismos é mais complexa. Estes achados podem refletir metabolismo ao invés de acúmulo.

Além disso, de acordo com o indicado no presente estudo, uma situação similar foi observada com base nos dados obtidos dos sedimentos, uma vez que a relação I/E estava na faixa de 2 – 2,8 (Tab. 4). Estes dados podem ser considerados como evidências de descargas de águas residuais não tratadas ou mal tratadas (ISOBE et al., 2004). Esta suposição seria compatível com dados que indicam que apenas ~50% do esgoto sanitário recebe tratamento adequado na Florianópolis (Neri, 2008).

No Brasil não há legislação específica com relação aos níveis de PAHs na água, com exceção à água de beber, mas todas as amostras apresentaram valores abaixo desses limites (CONAMA, 2005a). A exposição na primavera no sítio de referência (RAT) fez os níveis de PAHs diminuírem de ~7 para níveis não detectáveis (<1.14 ng/g de tecido seco), enquanto que as amostras de animais expostos em ITA I e ITA II tiveram aumento de 13/20 em 24 h, para 100/63 ng/g de tecido seco em 96h, respectivamente (Tab. 3). Estes dados indicam uma contaminação significativa com PAHs na área de estudo (ITA I/II), em relação aos sítios de referência, os quais são compatíveis com os dados obtidos nos sedimentos.

Os níveis de PAHs em tecidos húmidos de *C. brasiliiana* aumentaram mais que o dobro em 24h em ITA I e ITA II (12.6 e 20.4 ng/g de tecido), quando comparados aos animais expostos no sítio de referência (6.93 ng/g) (Tab. 3). Em 96h, os níveis de PAHs estavam abaixo dos níveis detectáveis em tecidos húmidos de ostras expostas em RAT (<1.14 ng/g), mas altamente acumulados em animais expostos em ITA I (104 ng/g) e ITA II (87 ng/g) (Tab. 3). Pode-se sugerir que essa diferença se deva principalmente a presença de moléculas de PAHs de cadeia curta, as quais contêm dois ou três anéis em sua estrutura molecular. Dentre as moléculas de PAHs de cadeia curta que estavam predominantemente aumentadas em ITA I em 96 h (em ng/g de tecido

seco) predominam trimetilnaftaleno (36,7), fenantreno (18), metildibenzotiofeno (18,9) e metilfenantreno (17), sendo que estes compostos correspondem a mais de 85% dos PAHs totais detectados.

No que diz respeito às defesas antioxidantes, a atividade da GPx estava diminuída em 24h em glândulas digestivas de ostras expostas em ITA I/II na primavera, bem como nas brânquias de animais expostos em ITA I na primavera, e em ambos os sítios em 96h no experimento de outono (Tab. 5 e 6). Em contraste com essa diminuição na atividade, um aumento de 60% foi observado no tempo de 96h em ITA II. No entanto, os transcritos para GPx não apresentaram alteração (BITENCOURT, 2015). Aliado a isto, o número de transcritos para SOD também não mostrou alteração para a exposição em ITAI/II, enquanto que o número de transcritos para CAT aumentou nos tempos de 24h na primavera e no outono, em ambos os sítios, contrastando com a falta de alteração na atividade, exceto para uma diminuição de 15% no tempo de 96h no outono (BITENCOURT, 2105). A falta de ativação transcricional associada a diminuição na atividade são indicativos de exposição a inibidores ou a uma maior degradação da CAT e da GPx. A diminuição na capacidade antioxidante pode levar ao aumento na susceptibilidade ao estresse oxidativo (MYTILINEOU et al., 2002).

Também foram observadas diminuições em outros antioxidantes na glândula digestiva no tempo de 96h no experimento de outono, especialmente em ITA II (CAT, GR e TrxR), bem como uma diminuição de 30% nos níveis de GSH (Tab. 6). As brânquias também apresentaram diminuição dos níveis de GSH no outono, bem como diminuição na atividade da GPx (-55%) (Tab. 5). Nenhuma alteração foi encontrada em relação a GR e TrxR. As enzimas GR e TrxR são inibidas por diversos compostos, dentre os quais agentes alquilantes de tióis e alguns tipos de metais (FRANCO et al., 2006; PRAST-NIELSEN et al., 2011; WITTE et al., 2005), sendo que os mesmos também podem levar a depleção de GSH (AQUILANO et al., 2014). A presença de substratos da enzima GST ou agentes alquilantes pode levar a depleção de GSH, bem como a estresse oxidativo (AQUILANO et al., 2014; MYTILINEOU et al., 2002), o que pode também ser considerado uma possível causa para a diminuição da atividade da GR e TrxR (GUTIERREZ-CORREA; STOPPANI, 1997; PRAST-NIELSEN et al., 2011). Estas alterações só poderão ser confirmadas com experimentos adicionais, os quais estão fora do objetivo deste trabalho, mas indicam que os animais estão expostos a um ambiente que leva a uma diminuição acentuada em várias defesas antioxidantes, associado a uma



falta de indução da transcrição das mesmas. Essas alterações encontradas em *C. brasiliiana* expostas em ITA I/II são indicativos de aumento na susceptibilidade ou indução de estresse oxidativo.

A GST é uma família de enzimas que catalisam a conjugação de GSH com compostos eletrofílicos, formando metabólitos polares que são imediatamente exportados das células (HELLOU et al., 2012). A atividade GST aumentou 60% em brânquias de ostras do Pacífico expostas em ITAI durante a primavera, mas não apresentou qualquer outra alteração no tempo de 96h (Tab. 5). Por outro lado, um aumento de 2,5 vezes foi observado em transcritos do tipo  $\omega$ GST nos períodos de primavera e outono (BITENCOURT, 2015). Levando em consideração o elevado número de isoformas, especialmente aquelas nas quais o CDNB não é um bom substrato, o aumento da GST pode não ter sido detectado, mesmo quando houve a indução gênica (MILAN et al., 2011). A indução de GST através da exposição a contaminantes é extremamente bem documentada na literatura (HELLOU et al., 2012), bem como a indução observada do tipo  $\omega$ GST em brânquias de ostras do Pacífico expostas a águas residuais (MEDEIROS et al., 2008a, 2008b). A indução de GST também foi observada em brânquias e glândulas digestivas de moluscos *Ruditapes philippinarum* expostos em local contaminado em Veneza, Itália (MILAN et al., 2011). A *C. brasiliiana* apresentou uma acentuada indução no número de transcritos do tipo  $\omega$ GST quando exposta a fenantreno (LÜCHMANN et al., 2014). Estes dados estão em concordância com os dados observados de indução na atividade de GST e nos transcritos do tipo  $\omega$ GST em brânquias de *C. brasiliiana* expostas a esgoto em ITA I/II no outono e primavera, sugerindo que a indução de enzimas de biotransformação de fase II é uma importante resposta protetora nesta espécie.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Uma das questões ambientais contemporâneas mais importantes, é a conservação dos recursos hídricos. A ausência de instrumentos de planejamento ligados à saúde pública, o crescimento populacional e a ascensão de avanço tecnológico aumentam significativamente a expansão de contaminantes em ecossistemas aquáticos (HAVERROTH et al., 2015). Dessa forma, o estudo de biomarcadores deste trabalho é de fundamental relevância, uma vez que refletem a interação entre organismos e sua exposição a contaminantes potencialmente tóxicos. Podemos perceber que contaminantes como o cobre, HPAs, PBCs e LABs estudados neste trabalho ocasionaram desequilíbrio celular, pela capacidade de promover alterações nas respostas antioxidantes.

Observamos a diminuição na atividade da enzima antioxidante GPx em glândulas digestivas e brânquias de ostras *Crassostre brasiliana* expostas aos contaminantes presentes em ITA I/II. Este efeito foi observado também na primavera em 24 horas e em 96h no experimento de outono. Portanto as alterações significativas nas atividades de enzimas antioxidantes sugerem a presença de compostos tóxicos no Manguezal do Itacorubi. Visto que HPAs podem induzir dano oxidativo por aumentar a produção de ERO como subprodutos do seu metabolismo, a diminuição nos níveis de GSH em brânquias de ostras *Crassostre brasiliana* expostas no outono, pode ser em resposta a uma condição pró-oxidante.

Entre as enzimas antioxidantes, a CAT, as peroxiredoxinas e a GPx participam diretamente, ou indiretamente da degradação de peróxidos, especialmente peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos. Dessa forma podemos salientar o efeito na glândula digestiva no tempo de 96h no experimento de outono, especialmente em ITA II, onde as enzimas CAT, GR e TrxR, a da atividade de GPx e os níveis de GSH em brânquias em 96h no outono, as quais foram notavelmente diminuídas pela exposição ao ambiente contaminado com efluentes doméstico, indicando o potencial tóxico e pró-oxidante do Mangue do Itacorubi. De modo geral, nossos dados indicam que o mangue do Itacorubi, o qual está localizado em uma área densamente povoada de Florianópolis, apresenta um cenário compatível com uma área de contaminação moderada, predominantemente com esgoto sanitário não tratado e que pode impactar negativamente a biota local.

As alterações em defesas antioxidantes, observadas neste trabalho nos animais adultos de *Danio rerio*, podem estar relacionadas com uma

situação pró-oxidativa, pois a atividade GST nas concentrações de cobre 9 e 60  $\mu\text{g/L}$  e a atividade de GPx (20  $\mu\text{g/L}$ ) diminuíram em brânquias de paulistinha. A diminuição da atividade de defesas antioxidantes pode comprometer o sistema de defesas antioxidante, deixando os animais mais vulneráveis ao estresse oxidativo. A influência negativa da exposição ao cobre pode ser observada pelas mudanças em respostas comportamentais aumentando a atividade natatória das larvas e diminuindo a memória indivíduos adultos de paulistinha. A diminuição do comprimento das larvas, também é um indicativo da toxicidade do cobre para o peixe paulistinha. O cobre é tóxico ao peixe paulistinha em concentrações próximas aos limites tolerados pela legislação brasileira, indicando a necessidade de mais estudos a respeito dos níveis permitidos. Logo, o estudo de biomarcadores comportamentais e bioquímicos foi usado com sucesso, indicando a viabilidade destes biomarcadores de exposição em estudos exotoxicológicos.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.R. **Analisando o Floripa 2030**: um modelo hegemônico de cidade. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Urbanismo, História e Arquitetura da Cidade da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 2015.

AKERBOOM, T. P.; SIES, H. *Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples.* **Methods Enzymol.**, v. 77, p. 373-382, 1981

AQUILANO, K.; BALDELLI, S.; CIRIOLO, M.R. (2014). *Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant.* **Front. Pharmacol.** v. 5, 2014. 196 p.

BARBOSA, F. et al. *A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs.* **environ. Health Perspect.**, v. 113, p. 1669-1674, 2005.

BLANK, M. et al. *A one-trial inhibitory avoidance task to paulistinha: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory.* **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 92, p. 529–534, 2009.

BONILLA-VALVERDE, D. et al. *Evolution of biological effects of Aznalcóllar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers.* **Toxicology**, v. 197, p. 123-138, 2004.

BORJA, J. et al. *Polychlorinated biphenyls and their biodegradation.* **Process Biochem.**, v. 40, p. 1999–2013, 2005.

BORSKA, L. et al. *Influence of dermal exposure to ultraviolet radiation and coal tar (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the skin aging process.* **J. Dermatol. Sci.**, v. 81, p. 192-202, 2016.

BOYLE, S.M.; GREENBERG, R.M.; JAMES, M.O. *Isolation of CYP2L2 and two other cytochrome P450 sequences from a spiny lobster, *Panulirus argus*, hepatopancreas cDNA library.* **Mar. Environ. Res.**, v. 46, p. 21-24, 1998.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. *Purinergic Signalling and the*

*Nervous System* (Springer Science & Business Media), 2012.

BX LUONG, A.P. *Use of methanesulfonic acid as catalyst for the production of linear alkylbenzenes*. **J. Catal.**, v. 226, p. 301-307, 2004.

CALABRESE, E.J. *Hormetic mechanisms*. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 43, p. 580-606, 2013.

CASAN. Companhia Catarinense de Água e Saneamento. **Índices de Atendimento Urbano-Esgoto**. 2016. Disponível em: <[www.casan.com.br/menu-conteudo/index/url/indices-de-atendimento-urbano-esgoto##223.63635878917611](http://www.casan.com.br/menu-conteudo/index/url/indices-de-atendimento-urbano-esgoto##223.63635878917611)>. Acesso em: 20 abr. 2016.

CAZENAVE, J. et al. *Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR*. **Aquat. Toxicol.**, v. 76, 1-12, 2006.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 2010. **Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo** (CETESB), 2009.

CONAMA. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005**. Brasil: CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005a.

CONAMA. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005**. Brasil: CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005b.

COSSU, C. ET al. *Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 45, p. 106-121, 2000.

CUNHA, I.; GARCÍA, L.M.; GUILHERMINO, L. *Sea-urchin (*Paracentrotus lividus*) glutathione S-transferases and cholinesterase activities as biomarkers of environmental contamination*. **J. Environ. Monit. JEM**, v. 7, p. 288-294, 2005.

DAM, E. et al. *Cytochrome P450 expression is moult stage specific and regulated by ecdysteroids and xenobiotics in the crab *Carcinus maenas**. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 377, p. 1135-1140, 2008.

DAUNER, A. L. L., LOURENÇO, R. A.; MARTINS, C. C. *Effect of seasonal population fluctuation in the temporal and spatial distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in a subtropical estuary*. **Environ. Technol. Innov.**, v. 5, p. 41–51, 2016.

DE BOECK, G. te al. *Swimming performance and energy metabolism of rainbow trout, common carp and gibel carp respond differently to sublethal copper exposure*. **Aquat. Toxicol.**, v. 80, p. 92-100, 2006.

DEPLEDGE, M. H., AAGAARD, A.; GYÖRKÖS, P. *Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers*. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 31, p. 19-27, 1995.

DODOO, D.K.; ESSUMANG, D.K.; JONATHAN, J.W.A. *Accumulation profile and seasonal variations of polychlorinated biphenyls (PCBs) in bivalves *Crassostrea tulipa* (oysters) and *Anadara senilis* (mussels) at three different aquatic habitats in two seasons in Ghana*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 88, p. 26-34, 2013.

DOLCI, G.S. te al. *Moderate hypoxia is able to minimize the manganese-induced toxicity in tissues of silver catfish (*Rhamdia quelen*)*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 91, p. 103-109, 2013.

DOWD, C.A.; Sheehan, D. *Variable expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the fungus, *Mucor circinelloides**. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 170, p. 13-17, 1999.

EGANHOUSE, R.P.; PONTOLILLO, J. *Depositional history of organic contaminants on the Palos Verdes Shelf, California*. **Mar. Chem.**, v. 70, p. 317-338, 2000.

EGANHOUSE, R.P.; SHERBLUM, P.M. *Anthropogenic organic contaminants in the effluent of a combined sewer overflow: impact on Boston Harbor*. **Mar. Environ. Res.**, v. 51, p. 51-74, 2001.

EICHHORN, P. et al. *Incomplete degradation of linear alkylbenzene sulfonate surfactants in Brazilian surface waters and pursuit of their polar metabolites in drinking waters*. **Sci. Total Environ.**, v. 284, p. 123-134, 2002.

ELLIOTT, M. *Risk perception frames in environmental decision making*. **Environ. Pract.**, v. 5, 2003.

EPA. U.S. Environmental Protection Agency. **Aquatic life ambient freshwater quality criteria**: Cooper. 2007 Revision. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2007.

EPA. U.S. *Environmental Protection Agency 2012 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories*. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2012.

EUROPEAN UNION. *Drinking Water-Regulations 2014*. 2015.

FÖRLIN, L.; LEMAIRE, P.; LIVINGSTONE, D.R. *Comparative studies of hepatic xenobiotic metabolizing and antioxidant enzymes in different fish species*. **Mar. Environ. Res.**, v. 39, p. 201-204, 1995.

FRANCO, J.L. et al. *Oxidative stress-related parameters in the gills of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to zinc*. **Mar. Environ. Res.**, v. 62, p. 448-449, 2006.

GDULA-ARGASIŃSKA, J. et al. *n-3 Fatty acids regulate the inflammatory-state related genes in the lung epithelial cells exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons*. **Pharmacol. Rep. PR.**, v. 68, p. 319-328, 2016.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. *Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants*. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale*, v. 48, p. 909-930, 2010.

GROSELL, M.; NIELSEN, C.; BIANCHINI, A. *Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals*. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP*, v. 133, p. 287-303, 2002.

GROSELL, M.; WOOD, C.M.; WALSH, P. J. *Copper homeostasis and toxicity in the elasmobranch *Raja erinacea* and the teleost *Myoxocephalus octodecemspinus* during exposure to elevated water-borne copper*. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP*, v. 135, p. 179-190, 2003.



GUILHERME, S. et al. *Antioxidant and biotransformation responses in *Liza aurata* under environmental mercury exposure: relationship with mercury accumulation and implications for public health.* **Mar. Pollut. Bull.**, 2008.

GUTIERREZ-CORREA, J.; STOPPANI, A.O. *Inactivation of yeast glutathione reductase by Fenton systems: effect of metal chelators, catecholamines and thiol compounds.* **Free Radic. Res.**, v. 27, p. 543-555, 1977.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. *Antioxidants: Molecules, medicines, and myths.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 393, p. 561-564, 2010.

HANEKAMP, J. C.; CALABRESE, E. J. *Chloramphenicol, European Legislation and Hormesis-Commentary.* **Dose-Response**, v. 5, p. 91-93, 2006.

HANNAM, M. L. et al. *Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*.* **Chemosphere**, v. 78, p. 779-784, 2010.

HARTMANN, P. C. et al. *Intercalibration of LABs in marine sediment SRM1941a and their application as a molecular marker in narragansett bay sediments.* **Environ. Sci. Technol.**, v. 34, p. 900-906, 2000.

HAVERROTH, G. M. B. et al. *Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in paulistinha (*Danio rerio*).* **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 122, p. 440-447, 2015.

HAWLICZEK, A. et al. *Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo[b]fluorene and retene in the zebrafish *Danio rerio*.* **Reprod. Toxicol. Elmsford N**, v. 33, p. 213-223, 2012.

HELLOU, J.; ROSS, N. W.; MOON, T. W. *Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota.* **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 19, p.

2007-2023, 2012.

HERNÁNDEZ, P. P. et al. *Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (Danio rerio)*. **Hear. Res.**, v.213, p.1-10, 2006.

IRONS, T. D. et al. *Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish*. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 32, p. 84-90, 2010.

ISOBE, K.O. et al. *Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) in riverine and coastal environments in South and Southeast Asia*. **Water Res.**, v. 38, p. 2449-2459, 2004.

JAMES, M. O.; BOYLE, S. M. *Cytochromes P450 in crustacea. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, v. 121, p. 157-172, 1998.

JIA, J.; FERNANDES, Y.; GERLAI, R. *Short-term memory in zebrafish (Danio rerio)*. **Behav. Brain Res.**, v. 270, p. 29-36, 2014.

JOHNSON, A., CAREW, E.; SLOMAN, K. A. *The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos*. **Aquat. Toxicol. Amst. Neth.**, v. 84, p. 431-438, 2007a.

\_\_\_\_\_. *The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos*. **Aquat. Toxicol.**, v. 84, p. 431-438, 2007b.

KALUEFF, A.V. et al. *Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond*. **Zebrafish**, v. 10, p. 70-86, 2013.

KOJADINOVIC, J. et al. *Bioaccumulation of trace elements in pelagic fish from the Western Indian Ocean*. **Environ. Pollut.**, v. 146, p. 548-566, 2007.

LAVANDIER, R. et al. *Polychlorinated biphenyls (PCBs) and Polybrominated Diphenyl ethers (PBDEs) in three fish species from an estuary in the southeastern coast of Brazil*. **Chemosphere**, v. 90, p. 2435-2443, 2013.

LEITE, C. E. et al. *Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae*. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 272, p. 681-689, 2013.

LIEMBURG-APERS, D.C. et al. *Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism*. **Arch. Toxicol.**, v. 89, p. 1209-1226, 2015.

LIMA, D. DE; ROQUE, G.M.; ALMEIDA, E. A, de. *In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (Danio rerio)*. **Mar. Environ. Res.**, v. 91, p. 45-51, 2013.

LIRA, A.; Tailleux, R. G. *Dehydrogenation of C12–C14 paraffins on PtCu/meso-structured Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst for LAB production: process simulation*. **Fuel**, v. 97, p. 49-60, 2012.

LORO, V. L. et al. *Zinc bioaccumulation and ionoregulatory impacts in Fundulus heteroclitus exposed to sublethal waterborne zinc at different salinities*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, v. 166, p. 96-104, 2014.

LÜCHMANN, K. H. et al. *A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene*. **Aquat. Toxicol. Amst. Neth.**, v. 152, p. 324-334, 2014.

MANUEL, R. et al. *Inhibitory avoidance learning in zebrafish (Danio Rerio): effects of shock intensity and unraveling differences in task performance*. **Zebrafish**, v. 11, p. 341-352, 2014.

MARTINS, C. C. et al. *Depositional history of sedimentary linear alkylbenzenes (LABs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil)*. **Environ. Pollut. Barking Essex 1987**, v. 158, p. 3355-3364, 2010.

MATOZZO, V. et al. *Can ecological history influence immunomarker responses and antioxidant enzyme activities in bivalves that have been experimentally exposed to contaminants? A new subject for discussion in "eco-immunology" studies*. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 35, p. 126-

135, 2013.

MEDEIROS, I. et al. *Differential gene expression in oyster exposed to sewage*. **Mar. Environ. Res.** 66, 156–157, 2008a.

MILAN, M. et al. *Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: genomic tools for environmental monitoring*. **BMC Genomics**, v. 12, n. 234, 2011.

MIRA PETROVIĆ, S.G. *Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water*. **TrAC Trends Anal. Chem.**, v. 22, p. 685-696, 2003.

MOREIRA-SANTOS, M. et al. *Avoidance tests with small fish: Determination of the median avoidance concentration and of the lowest-observed-effect gradient*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 27, p. 1576–1582, 2008.

MORGENSTERN, R.; ZHANG, J.; JOHANSSON, K. *Microsomal glutathione transferase 1: mechanism and functional roles*. **Drug Metab. Rev.** v. 43, p. 300-306, 2011.

MYTILINEOU, C.; KRAMER, B. C.; YABUT, J. A. *Glutathione depletion and oxidative stress*. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 8, p. 385-387, 2002.

NERI, M.C. **Trata Brasil**: saneamento, saúde, educação, trabalho e turismo: o caso de Santa Catarina. Rio de Janeiro: FGV/IBRE, CPS, 2008.

NG, M.-C. et al. *Effect of MK-801-induced impairment of inhibitory avoidance learning in zebrafish via inactivation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in telencephalon*. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 38, p. 1099-1106, 2012.

NUNES, B. et al. *Effects of environmentally relevant concentrations of metallic compounds on the flatfish *Scophthalmus maximus*: biomarkers of neurotoxicity, oxidative stress and metabolism*. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 21, p. 7501-7511, 2014.

O'CONNOR, T. P. *National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA.* **Mar. Environ. Res.**, v. 53, p. 117-143, 2002.

OLIVARI, F. A.; HERNÁNDEZ, P. P.; ALLENDE, M. L. *Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae.* **Brain Res.**, v. 1244, p. 1-12, 2008.

OLIVEIRA-FILHO, E.C. de; LOPES, R.M.; PAUMGARTTEN, F.J.R. *Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides.* **Chemosphere**, v. 56, p. 369-374, 2004.

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

OROS, D. R.; ROSS, J. R. M. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves from the San Francisco estuary: spatial distributions, temporal trends, and sources (1993–2001).* **Mar. Environ. Res.**, v. 60, p. 466-488, 2005.

PARK, H. et al. *Molecular cloning, characterization, and the response of manganese superoxide dismutase from the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* to PCB exposure.* **Fish Shellfish Immunol.**, v. 27, p. 522-528, 2009.

PERSONNEL, C. on M.R. for C. and P.P. of M., Research, C. on M.N., Board, F. and N., and Medicine, I. of. *Mineral requirements for military personnel: levels needed for cognitive and physical performance during garrison training*, National Academies Press, 2006.

PIPE, R. K. *Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*.* **Aquat. Toxicol.**, v. 46, p. 43-54, 1999.

PRAST-NIELSEN, S. et al. *Inhibition of thioredoxin reductase 1 by porphyrins and other small molecules identified by a high-throughput screening assay.* **Free Radic. Biol. Med.**, v. 50, p. 1114-1123, 2011.

QU, R. et al. *Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in*

*liver of freshwater fish Carassius auratus following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values.* **Aquat. Toxicol. Amst. Neth.**, v. 150, p. 9-16, 2014a.

QU, R. et al. *Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish Carassius auratus following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values.* **Aquat. Toxicol.**, v. 150, p. 9-16, 2014b.

RESENDER, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

REWITZ, K. F. et al. *Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies.* **Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.**, v.143, p. 363-381, 2006.

RIETJENS, I. M. C. M.; ALINK, G. M. *Future of toxicology low-dose toxicology and risk-benefit analysis.* **Chem. Res. Toxicol.**, v. 19, p. 977-981, 2006.

RODRIGUEZ-ARIZA, A. et al. *Uptake and clearance of PCB congeners in Chamaelea gallina: response of oxidative stress biomarkers.* **Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.**, v. 134, p. 57-67, 2003.

ROSSETTO, A. M.; ORTH, D.M.; ROSSETTO, C.R. *Environmental management integrated with sustainable development: a case study in Passo Fundo, RS, Brazil.* **Rev. Adm. Pública**, v. 40, 809-840, 2006.

SCOTT, M. J.; JONES, M. N. *The biodegradation of surfactants in the environment.* **Biochim. Biophys. Acta BBA, Biomembr.**, v. 1508, p. 235-251, 2000.

SEN, A.; SEMIZ, A. *Effects of metals and detergents on biotransformation and detoxification enzymes of leaping mullet (Liza saliens).* **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 68, 405-411, 2007.

SHEPARD, J.; BRADLEY, B. *Protein expression signatures and lysosomal stability in Mytilus edulis exposed to graded copper*

concentrations. **Mar. Environ. Res.**, v. 50, p. 457-463, 2000.

SINGH, A. P.; GUPTA, R. *Copper(I) in the Cleft: Syntheses, Structures and Catalytic Properties of {Cu+-Co3+-Cu+} and {Cu+-Fe3+-Cu+} Heterobimetallic Complexes*. **Eur. J. Inorg. Chem.**, p. 4546-4554, 2010.

SLOMAN, K. A. et al. *Social interactions affect physiological consequences of sublethal copper exposure in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss**. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 21, p. 1255-1263, 2002.

SOLÉ, M.; PORTE, C.; ALBAIGÉS, J. *Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: Its relation with contaminant body burdens*. **Aquat. Toxicol.**, v. 30, p. 271-283, 1994.

SOUZA, D. S. M. et al. *Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 76, p. 153-161, 2012.

SPEEDIE, N.; GERLAI, R. *Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*)*. **Behav. Brain Res.**, v. 188, p. 168-177, 2008.

STEINBERG, C. E. W. et al. *Genes and environment : striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics*. **Sci. Total Environ.**, v. 400, p. 142-161, 2008.

TAKADA, H., ISHIWATARI, R.; OGURA, N. *Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) and linear alkylbenzenesulphonates (LAS) in Tokyo Bay sediments*. **Estuar. Coast. Shelf Sci.**, v. 35, p. 141-156, 1992.

TIERNEY, K. B. *Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish*. **Biochim. Biophys. Acta BBA, Mol. Basis Dis.**, v. 1812, p. 381-389, 2011.

TILTON, F. A.; BAMMLER, T. K.; GALLAGHER, E. P. *Swimming*

*impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures.* **Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP**, v. 153, p. 9-16, 2011.

TREVISAN, R. **Mecanismos de defesas delulares relacionados a defesas antioxidantes e de biotransformação em mexilhões *Perna perna* e ostras *Crassostrea gigas* expostas a agentes oxidantes e eletrofílicos.** 2014. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 2014.

TSUTSUMI, S. et al. *Alkylbenzenes in mussels from South and South East Asian coasts as a molecular tool to assess sewage impact.* **Mar. Pollut. Bull.**, v. 45, p. 325-331, 2002.

URIU-ADAMS, J. Y.; KEEN, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. **Mol. Aspects Med.** 26, 268–298, 2005

VALAVANIDIS, A. et al. *Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants.* **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 64, p. 178-189, 2006.

WANG, B. et al. *Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF- $\kappa$ B, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of fish: Preventive role of arginine.* **Aquat. Toxicol.**, v. 158, p. 125-137, 2015.

WASER, W.; BAUSHEVA, O.; NIKINMAA, M. *The copper-induced reduction of critical swimming speed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is not caused by changes in gill structure.* **Aquat. Toxicol.**, v. 94, p. 77-79, 2009.

WILCZEK, G. et al. *Relations between metals (Zn, Pb, Cd and Cu) and glutathione-dependent detoxifying enzymes in spiders from a heavy metal pollution gradient.* **Environ. Pollut. Barking Essex**, 1987, v. 132, p. 453-461, 2004.

WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R.T. *Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms.* **Aquat. Toxicol.**, v. 19, p. 137-161, 1991.



WITTE, A.-B. et al. *Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds.* **Free Radic. Biol. Med.**, v. 39, p. 696-703, 2005.

XU, W.; WANG, X.; CAI, Z. **Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: a review.** **Anal. Chim. Acta**, v. 790, p. 1-13, 2013.

ZANETTE, J. et al. *Identification and expression of multiple CYP1-like and CYP3-like genes in the bivalve mollusk *Mytilus edulis*.* **Aquat. Toxicol.**, v. 128–129, p. 101-112, 2013.

ZHANG, M. et al. *Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection.* **Prog. Neurobiol.**, v. 100, p. 30-47, 2013.

ZIYAADINI, M. et al. *Assessment of concentration, bioaccumulation and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in zooplankton of Chabahar Bay.* **Mar. Pollut. Bull**, 2016.



## APÊNDICE A - ARTIGO

Copper at low levels impairs memory of adult zebrafish (*Danio rerio*) and affects swimming performance of larvae

Daiane da Silva Acosta<sup>1</sup>, Naissa Maria Danielle<sup>1</sup>, Stefani Altenhofen<sup>2</sup>, Milene Dornelles Luzardo<sup>2</sup>, Patrícia Gomes da Costa<sup>3</sup>, Adalto Bianchini<sup>3</sup>, Carla Denise Bonan<sup>2</sup>, Rosane Souza da Silva<sup>2</sup>, Alcir Luiz Dafre<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>2</sup> Department of Molecular and Cellular Biology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, 90610-900 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Institute of Biological Sciences, Federal University of Rio Grande, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil

Corresponding Author: *Alcir Luiz Dafre, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil*

*Email: alcir.dafre@ufsc.br; Phone: +55 48 3721 2817; Fax: +55 48 3721 2827*

### **Abstract**

Metal contamination at low levels is an important issue because it usually produces health and environmental effects, either positive or deleterious. Contamination of surface waters with copper (Cu) is a worldwide event, usually originated by mining, agricultural, industrial, commercial, and residential activities. Water quality criteria for Cu are variable among countries but allowed limits are generally in the µg/L range, which can disrupt several functions in the early life-stages of fish species. Behavioral and biochemical alterations after Cu exposure have also been described at concentrations close to the allowed limits. Aiming to search for the effects of Cu in the range of the allowed limits, larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*) were exposed to different concentrations of dissolved Cu (nominally: 0, 5, 9, 20 and 60 µg/L; measured: 0.4, 5.7, 7.2 16.6 and 42.3 µg/L, respectively) for 96 h. Larvae swimming and body length, and adult behavior and biochemical

biomarkers (activity of glutathione-related enzymes in gills, muscle, and brain) were assessed after Cu exposure. Several effects were observed in fish exposed to 9 µg/L nominal Cu, including increased larvae swimming distance and velocity, abolishment of adult inhibitory avoidance memory, and decreased glutathione S-transferase (GST) activity in gills of adult fish. At the highest Cu concentration tested (nominally: 60 µg/L), body length of larvae, spatial memory of adults, and gill GST activity were decreased. Social behavior (aggressiveness and conspecific interaction), and glutathione reductase (GR) activity were not affected in adult zebrafish. Exposure to Cu, at concentrations close to the water quality criteria for this metal in fresh water, was able to alter larvae swimming performance and to induce detrimental effects on the behavior of adult zebrafish, thus indicating the need for further studies to reevaluate the currently allowed limits for Cu in fresh water.

**Keywords:** behavior; copper; inhibitory avoidance; memory; toxicology; zebrafish.

## Introduction

Zebrafish (*Danio rerio*) has been considered a useful model for neurotoxicological tests, adding new tools to classical toxicological studies (Baldissarelli et al., 2012; Linney et al., 2004). Zebrafish is also considered a model for neurological disorders, such as epilepsy (Leclercq et al., 2015), Parkinson's (Fetcho, 2007) and Alzheimer's diseases (Newman et al., 2014). In this regard, during neurodegenerative diseases, copper (Cu) released from nerve cells can reach toxic levels (200–400 µM) (White and Cappai, 2003). Such increase in endogenous Cu levels would affect biochemical as well as behavioral endpoints (Mathie et al., 2006).

Studies focused on fish exposure to Cu are often reported in the literature, particularly those relating to environmental contamination (Brandão et al., 2013; Falfushynska et al., 2011; Hernández and Allende, 2008; Sandahl et al., 2007). However, studies on trace metals using zebrafish as a model generally report biochemical alterations more frequently than behavioral ones (Baldissarelli et al., 2012). Nevertheless, behavioral alterations (Baatrup, 1991; Rehnberg and Schreck, 1986) have been documented for several metals (Baldissarelli et al., 2012; Vieira et al., 2009; Weber and Ghorai, 2013), including Cu (Campbell et al., 2005; Sloman et al., 2003).

Exposure to Cu at low concentrations ( $\mu\text{g/L}$  range) can affect neuromodulation in the fish brain. Exposure to a sublethal concentration of Cu ( $15 \mu\text{g/L}$ ) for 96 h can affect brain extracellular enzymes, such as nucleotidases, decreasing their expressions and activities (Rosemberg et al., 2007). Also, it can inhibit cholinesterase activity (de Lima et al., 2013; Haverroth et al., 2015). Exposure to Cu at  $20 \mu\text{g/L}$  for 96 h inhibited carbonic anhydrase activity and increased the  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  exchange activity in the guppy *Poecilia vivipara* (Zimmer et al., 2012).

Neurochemical effects can be translated into behavioral responses. For instance, Cu ( $25\text{-}50 \mu\text{g/L}$ ) triggers a rapid loss of ciliated mechanoreceptor neurons from neuromasts in the lateral line, presenting the potential for disrupting behaviors in fish that depend on olfaction and mechanosensory information (Linbo et al., 2006; Olivari et al., 2008). For example, coho salmon showed an important loss of chemosensory response (McIntyre et al., 2008), which increased predator capture (McIntyre et al., 2012). Low levels of Cu ( $<10 \mu\text{g/L}$ ), produced a significant inhibition of olfactory activity in fathead minnows, which are below the  $\text{IC}_{50}$  predicted by the biotic ligand model (BLM) (Dew et al., 2012). Indeed, chemosensory and mechanosensory systems appear to be among the main targets of Cu toxicity, even at low levels (Dew et al., 2012; Linbo et al., 2006; McIntyre et al., 2012, 2008). These examples highlight the marked toxicity of Cu in fish, with potentially deleterious effects at low and environmentally relevant concentrations of this metal.

Like adults, larvae of zebrafish have also been used in toxicological studies. Exposure to Cu ( $93 \mu\text{g/L}$  or higher) at 72 h post fertilization (hpf) increased yolk sac area, heart beats, and embryo mortality, as well as decreased hatching and length of zebrafish larvae (Johnson et al., 2007). Median effective concentration for Cu-induced morphological effects was estimated as  $18 \mu\text{g/L}$  for zebrafish embryo. These effects were associated with a significant loss of primary and secondary motor neurons (Sonnack et al., 2015). Similarly to the observed in adult zebrafish, the olfactory system (Sandahl et al., 2007) and the lateral line sensory cells of zebrafish larvae were affected by Cu exposure (Hernández et al., 2006; Linbo et al., 2006).

In light of the above, the aim of the present study was to investigate the effects of waterborne Cu exposure in larvae and adult zebrafish. There are reports demonstrating that Cu at low levels ( $\mu\text{g/L}$  range) can cause adverse effects in fish (De Boeck et al., 2006; de Lima et al., 2013; Haverroth et al., 2015; Linbo et al., 2006; Moreira-Santos et

al., 2008; Sloman et al., 2003). Taken this into account, we investigated if Cu at environmentally relevant concentrations can induce adverse effects on morphological (body length), and behavioral (swimming performance) endpoints in larval zebrafish, as well as behavioral (aggressiveness, social interaction and memory) and biochemical (glutathione reductase, glutathione transferase, and glutathione peroxidase activity) endpoints in adult zebrafish.

## **Materials and methods**

### *Animals*

Adult wild-type zebrafish with Tubingen background of both sexes were obtained from the colony maintained by the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, southern Brazil). Fish were maintained in automated re-circulating tank system (ZEBTEC, Tecniplast, Buguggiate, Varese, Italy). Fish were maintained under a 14 h light:10 h dark photoperiod at a density of up to five animals per liter of water. Fish were fed three times a day with TetraMin Tropical Flake Fish<sup>®</sup>, supplemented with brine shrimp larvae.

Zebrafish larvae were obtained by breeding animal from the stock held by the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul. Just after fertilization, eggs were saved and kept at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  and under a 14 h light:10 h dark photoperiod for 72 hpf.

After experiments, adult and larvae of zebrafish were euthanized by hypothermia. Each individual either was used once, for a given behavioral test or for sampling collection for biochemical analyzes. All protocols were in accordance with the local regulation and international guidelines and approved by the institutional Animal Ethics Committee (permits # 12/00319 and 10/00196 CEUA PUCRS).

### *Water of maintenance and copper exposure*

Water used in the experiments was obtained from a reverse osmosis apparatus (18 mohm/cm) and reconstituted with marine salt (Cristalsea<sup>™</sup>, Marinemix, Baltimore, USA) at 0.4 ppt, resulting in the following composition in mmol/L (Atkinson and Bingman, 1999):  $\text{Na}^+$  5.34,  $\text{K}^+$  0.115,  $\text{Ca}^{2+}$  0.115,  $\text{Mg}^{2+}$  0.605,  $\text{Cl}^-$  6.15 and  $\text{SO}_4^{2-}$  0.32. Total organic carbon concentration was 0.33 mg/L. Total alkalinity as  $\text{CO}_3^{2-}$  corresponded to 0.030 mEq/L. Water pH was 7.4. During fish

maintenance, water parameters were monitored daily and kept in the following ranges: pH: 6.5 to 7.5, conductivity: 400 to 600  $\mu\text{S}$ , ammonium concentration:  $<0.004$  ppm, and temperature: 25 to 28°C.

Copper concentration was measured before and after addition of Cu (nominally: 5, 9, 20, and 60  $\mu\text{g/L}$ ) in the water of maintenance. Water samples were collected before and 48 h after introduction of fish in the experimental tanks. Water samples were filtered (0.45  $\mu$ -mesh filter) and acidified with  $\text{HNO}_3$  (Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany) at 1% final concentration. Copper concentration was determined using a high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry (HR-CS-AAS; ContrAA 700 Analytik Jena, Germany). Quality assurance controls were performed. A standard copper solution (SpecSol<sup>®</sup>, QuimLab, Jacareí, SP, Brazil) was used to build a standard curve and check measurement accuracy. Percentage of metal recovery corresponded to  $103.5 \pm 0.7\%$ .

Adult zebrafish (5 fish/L) were exposed to different Cu concentrations (nominally: 0, 5, 9, 20 and 60  $\mu\text{g/L}$  copper) for 96 h. Copper as  $\text{CuCl}_2$  was added in the water of maintenance. During copper exposure, fish were not fed with brine shrimp larvae and water was replaced every two days. Fish were kept in a 5-L aquarium (27 cm width x 17 cm height x 12 cm deep) with water of maintenance, which was kept under biological and mechanical filtration, aeration (7.2 mg  $\text{O}_2/\text{L}$ ) and temperature control ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Larvae (72 hpf) were also exposed to different concentrations of dissolved Cu (nominally: 0, 5, 9, 20 and 60  $\mu\text{g/L}$  copper) for 96 h. Copper as  $\text{CuCl}_2$  was added into the water of maintenance, and gently handled and individually placed in a 12-well plate ( $n=10$  per treatment). They were maintained under the same conditions described above for adult fish. Control fish were kept under the same conditions used for Cu-exposed fish, but without Cu addition in the water of maintenance.

#### *Assessment of larvae body length*

Body length of larvae was measured by using images obtained from Nikon stereoscopy microscopy using the NIS-Elements D 3.2 software provided by the manufacturer (Nikon Instruments Inc., Japan). Body length was standardized as the distance from the center of an eye to the tail end (Capiotti et al., 2013).

#### *Locomotor activity of zebrafish larvae*

After 96 h of Cu exposure, larvae were placed in fresh media solution and transferred to a 96-well plate. Locomotor activity was recorded during 5 min by a top camera (Quikcam PRO 9000 - Longitec™, California, EUA), and analyzed by ANY-Maze video tracking software (Stoelting Co., Wood Dale, EUA). Total distance (m), average swimming velocity (m/s), and maximal velocity (m/s) were obtained as previously described (Capiotti et al., 2013).

#### *Spatial memory training-test in adult zebrafish*

Spatial memory of adult fish was assessed using the Y maze task. In this context, fish were trained and tested individually in Y-shaped glass aquaria, with three arms (25 cm long x 8 cm wide x 15 cm height): the initial arm, designated the “start arm”; the adjacent arm (always open) was named “other arm”, and the new arm (was open only during the test) was designated “novel arm”. The external maze walls presented visual clues. During the training session (5 min), fish was individually placed in the start arm with a novel arm closed. After one hour, fish was placed again in the start arm and subjected to an additional test session (5 min). However, in this case, the new arm was opened (Cognato et al., 2012). Training and test sessions were recorded using the Quikcam PRO 9000 camera (Longitec™, California, EUA). The determination of the time spent in each arm was performed using the software ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). The center of the maze (neutral zone) was not computed in the analysis (Dellu et al., 1997).

#### *Inhibitory avoidance task in adult zebrafish*

Analogous to the avoidance test performed with rodents, this test was adapted for testing fish (Blank et al., 2009; McGaugh, 2000). An apparatus measuring 18 cm long x 9 cm wide x 7 cm height, and made of glass was used, as previously reported (Blank et al., 2009). The apparatus was separated by a sliding guillotine-type partition (9 cm height x 7 cm wide) in two equally sized compartments, white and dark. In the training session, adult fish were individually placed on the white side with the partition closed. After 1 min of habituation, the partition was raised 1 cm, allowing fish to cross to the dark side of the tank. Just after fish entered the dark compartment, the slide partition was closed



and a pulsed electric shock of  $3 \pm 0.2$  V (intensity measured between electrodes and the center of the dark compartment) was administered for 5 s. Fish were removed from the apparatus and placed in a temporary tank; they were later returned to their housing tank. Twenty-four hours after a training session, the test session was performed, following the same procedure, except that the aversive stimulus (shock) was not applied. The latency to enter the dark compartment was measured as an indicative of memory retention, including the learned association between the aversive stimulus and the dark environment entry.

### *Aggressive behavior in adult zebrafish*

Aggressive behavior was evaluated in adult fish by the mirror test (Gerlai et al., 2000; Moretz et al., 2006) in a test aquaria (36 long x 25 cm wide and 18 cm height) filled with 6 L of water, where a mirror (45 x 38 cm) was placed at the side of the tank at an angle of 22.5°. After 60 s of fish introduction in the aquaria, aggressive interactions (bites, displays and fast bouts of swimming) were recorded for a period of 5 min. This protocol has been previously validated by actual fish opponents (Ariyomo et al., 2013; Ariyomo and Watt, 2015). Aggressive behavior (boldness and aggressiveness) in zebrafish can be influenced by genetic background (Ariyomo et al., 2013), but aggressiveness was similar between male and female zebrafish (Dahlbom et al., 2011), indicating the appropriateness of using both sexes.

### *Social interaction in adult zebrafish*

The zebrafish is a social animal. To test social interaction, fish from the same shoal were used in each experiment. Five experimental fish were placed in a small experimental aquarium (30 cm large x 15 cm height x 10 cm W). On one side of the experimental aquarium, an empty tank was placed; and on the opposite side of the aquarium, a “stimulus tank” of identical size containing 15 zebrafish was introduced. After a 30 s of habituation time, the behavior of experimental fish was recorded during 5 min. In order to quantify any inherent preference for the “stimulus” side, the central tank was “virtually” separated into two equal parts. The time that experimental fish spent in the virtual half, adjacent to the conspecific school, was measured (Gerlai, 2003).

### *Biochemical analyses*

After behavioral tests, gills, muscle and brain tissues were dissected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before analyses. Enzyme activities were expressed relative to protein content, as determined by using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

For enzyme activity measurements, frozen tissues were homogenized (1:4 weight: volume ratio) in a buffer solution containing 50 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.15 M KCl, and 0.1 mM phenyl-methane-sulfonyl fluoride (pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 9,000  $g$  for 30 min ( $4^{\circ}\text{C}$ ) and the supernatant was used as a cytosolic fraction for the enzymatic analyzes.

Enzyme activities were determined spectrophotometrically using a UV/Vis plate reader. GST activity was assayed considering the rate of glutathione conjugation to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene at 340 nm and the spontaneous reaction was subtracted from readings (Habig and Jakoby, 1981). GR activity was measured at 340 nm considering the NADPH consumption rate in the presence of oxidized glutathione (Carlberg and Mannervik, 1985). GPx activity was measured at 340 nm through the NADPH consumption rate in the presence of GR, glutathione and cumene hydroperoxide (Wendel, 1981).

#### *Statistical analysis*

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Homogeneity of variance was checked using the Bartlett's test, and outliers were excluded when detected by the Grubb's test. Enzyme activity and social behavior (aggressiveness and conspecific behaviors) were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's test, when appropriate. The variance of data regarding the response to novelty, body length and swimming behavior showed significantly different variances. Therefore, non-parametric ANOVA on ranks was used, and differences among groups were detected by the Dunn's *post hoc* test. The inhibitory avoidance task was tested using the unpaired Student's  $t$  test (training *vs* test session). In all cases, the level of significance adopted was 95% ( $p < 0.05$ ).

Data on dissolved Cu concentrations were calculated based on values measured before and 48 h after fish introduction in the water of maintenance. Free Cu concentrations were calculated based on the mean values of dissolved Cu concentrations calculated as described above and the water physicochemical parameters observed during the experimental period. Calculations were performed using the Biotic Ligand Model version 2.2.3. (HydroQual, Mahwah, NJ, USA).

## Results

### *Copper concentrations in the experimental media*

Measured dissolved Cu concentrations were  $0.40 \pm 0.09$ ,  $5.74 \pm 0.51$ ,  $7.25 \pm 0.08$ ,  $16.56 \pm 1.18$  and  $42.30 \pm 0.92$   $\mu\text{g/L}$  for the nominal concentrations of 0, 5, 9, 20 and 60  $\mu\text{g/L}$ , respectively. They corresponded to  $87.2 \pm 9.6\%$  (ranging from 114.8 to 70.5%) of the nominal values. In turn, concentrations of free Cu ion calculated using the BLM approach corresponded to 0.002, 0.065, 0.100, 0.727 and 6.548  $\mu\text{g/L}$ , respectively.

### *Copper exposure increased swimming velocity and distance and decreased larvae body length*

Exposure to copper significantly ( $p < 0.01$ ) reduced (5%) the body length of larvae exposed to the highest Cu concentration (60  $\mu\text{g/L}$ ) tested (Fig. 1).

The average distance traveled was increased ( $p < 0.01$ ) from  $0.17 \pm 0.03$  m to  $0.38 \pm 0.05$  m in larvae exposed to 9  $\mu\text{g/L}$  Cu (Fig. 2A), corresponding to a 2.2-fold increase in the swimming distance of Cu-exposed larvae in comparison to those of the control group. Mean swimming velocity was also increased by Cu treatment ( $p < 0.01$ ). Control values of  $0.00052 \pm 0.00013$  m/s increased to  $0.0013 \pm 0.00019$  m/s in larvae exposed to 9  $\mu\text{g/L}$  Cu (Fig. 2B), which corresponded to a 2.5-fold increase with respect to the control group. Maximal velocity (Fig. 2C) was increased by 1.4-fold in larvae exposed to 9  $\mu\text{g/L}$  Cu ( $p < 0.01$ ) and by 1.8-fold in those exposed to 20  $\mu\text{g/L}$  Cu ( $p < 0.01$ ) with respect to the control group. The observed increase in the distance traveled by larvae exposed to 9  $\mu\text{g/L}$  Cu is in agreement with the higher swimming velocity and maximal velocity observed in this group of larvae. At 5 and 60  $\mu\text{g/L}$  Cu, distance traveled, as well as mean and maximal velocity displayed by larvae were not significantly altered by Cu exposure.

### *Behavioral responses of adult zebrafish exposed to copper*

Concomitantly to the spatial memory assessment, locomotor activity of adult zebrafish was evaluated considering the distance

traveled and the mean velocity. These parameters were not affected by any Cu concentration tested (distance traveled:  $p=0.58$ ; mean velocity:  $p=0.24$ , data not shown), indicating that observed effects in other parameters analyzed are not related to a possible increased locomotor activity. Spatial memory and response to novelty were assessed by Y-maze training-test (Fig. 3). Results showed that exposure to Cu did not alter the time spent in the novel arm, which was homogenous among groups, averaging between  $108 \pm 21$  s and  $113 \pm 24$  s. The time spent by adult fish in the novel arm was significantly increased ( $p < 0.05$ ) with respect to the time spent in the start arm (averaging between  $80 \pm 13$  s and  $88 \pm 21$  s), or in the other arm (averaging between  $71 \pm 12$  s and  $95 \pm 20$  s), except for the group of fish exposed to  $60 \mu\text{g/L}$  Cu. In this case, no significant differences were observed (Fig. 3).

In the aversive memory assessment, fish that retained memory after receiving an electric shock in the training session spent more time in the test session before entering the dark compartment where they previously received the electric shock. Only fish exposed to  $9 \mu\text{g/L}$  Cu failed to acquire memory in the inhibitory avoidance task ( $p = 0.21$ ) since latency did not increase (NS) in the test session (Fig. 4). When comparing the latency time in the test session between fish kept under control conditions and those exposed to  $9 \mu\text{g/L}$  Cu, a significant decrease was also observed. The latency time was reduced from  $82.5 \pm 21.5$  to  $25 \pm 9.0$  s ( $p < 0.05$ ). This response indicates that fish exposed to Cu lost their ability to retain memory. All other fish groups had their latency time increased with respect to those observed in the training session, indicating that their memory retention was preserved.

Aggressive behavior, evaluated by exposing each fish individually to a mirror and recording aggressive display, was not altered by Cu exposure, regardless of the concentration tested (Fig. 5A). In addition, social interaction was not affected by Cu exposure (Fig. 5B).

### *Glutathione-related enzymes*

The activities of three enzymes related to GSH metabolism (GST, GPx, and GR) were evaluated in gills, muscle, and brain of adult zebrafish. Cu exposure induced changes in GST activity in the gills (Fig. 6B), but not in the brain or the muscle (Fig. 6A and C). GST activity from gills was 67 and 44% lower in fish exposed to 9 and  $60 \mu\text{g/L}$ , respectively. However, no significant changes in GST activity from gills

were observed in fish exposed to 5 and 20  $\mu\text{g/L}$  Cu with respect to the control fish (Fig. 6A-C). GPx activity increased 2.1-fold in the muscle of fish exposed to 20  $\mu\text{g/L}$  Cu (Fig. 6D) but showed a lower activity (75%) in the gills of these fish (Fig. 6E). GPx activity remained unaltered in the brain of fish exposed to Cu (Fig. 6F). GR activity was unaltered in muscle, brain, and gills of fish exposed to Cu (5-60  $\mu\text{g/L}$ ) for 96 h (Fig. 6G-I).

## Discussion

A slightly but significant reduction in body length was observed in zebrafish larvae (96 hpf) exposed to the highest Cu concentration tested (60  $\mu\text{g/L}$ ), indicating a detrimental impact of this metal on larvae growth. In a similar study, exposure of *Danio rerio* larvae (72 hpf) to 53  $\mu\text{g/L}$  Cu did not affect embryo mortality, hatching, yolk sac area, heart beats, and body length. However, body length was reduced in larvae exposed to 93  $\mu\text{g/L}$  or higher Cu concentrations (Johnson et al., 2007). Despite the discrepancy in the age of larvae employed by Johnson et al. (1 hpf) and those tested in the present study (96 hpf), body length was affected at relatively close Cu concentrations in both studies. Therefore, the 5% reduction in body length observed in the present study suggests that 60  $\mu\text{g/L}$  Cu may be close to a threshold limit between toxic and non-toxic levels of Cu for zebrafish larvae.

In addition to the Cu impact on larvae growth, behavioral effects were also observed in both larvae and adult zebrafish tested in the present study. An altered neurological function will generally be behaviorally apparent, and as performed in the present study, it can be analyzed in both larvae and adults of zebrafish (Blank et al., 2009; Irons et al., 2010; Jia et al., 2014). In this context, assessing locomotor activity can indicate compounds that modulate neuron firing rate, thus, presenting potential to affect swimming velocity and distance traveled (Tierney, 2011). In the present study, zebrafish larvae showed an increased mean swimming velocity and distance traveled after being exposed to 9  $\mu\text{g/L}$  Cu for 96 h. In turn, the maximum velocity was affected in larvae exposed to 20  $\mu\text{g/L}$  Cu. Swimming performances of two cyprinids (common and gibel carps) and the rainbow trout were also decreased shortly after (12-24h) exposure to 30  $\mu\text{g/L}$  (De Boeck et al., 2006). Also, exposure to 105  $\mu\text{g/L}$  Cu induced a reduction in the swimming performance of the rainbow trout (Waser et al., 2009). Increased gill lamellar thickness and ionic imbalance were proposed as a

possible mechanism underlying the respiratory distress triggered by Cu exposure, especially in the two cyprinid fish (De Boeck et al., 2007, 2006).

The behavioral alterations observed in the present study after exposure of zebrafish larvae to intermediate concentrations of Cu (9 and 20  $\mu\text{g/L}$ ) could be a result from effects of Cu on specific neurochemical circuits such as the cholinergic-mediated signaling, as proposed for adult zebrafish (de Lima et al., 2013; Haverroth et al., 2015). Indeed, Cu effects on the olfactory system have been reported in fish exposed to low concentrations of this metal ( $<10 \mu\text{g/L}$ ) using a continuous exposure protocol (Dew et al., 2012). Additionally, the number of visible neuromast cells were decreased in *Danio rerio* larvae exposed to 68  $\mu\text{g/L}$  Cu (Johnson et al., 2007). In this case, zebrafish larvae displayed evidence of oxidative stress (Olivari et al., 2008). Interestingly, several oxidative stress parameters were shown to be adequate biomarkers of acute Cu exposure in the euryhaline guppy *Poecilia vivipara* (Machado et al., 2013).

The Cu effects on the sensory system described above were shown to be dependent on the time of exposure to Cu. In fact, neuromast and olfactory cells can be affected within hours of Cu exposure, but show a partial recovery over time (Dew et al., 2012; Linbo et al., 2006). It is worth noting that the swimming performance of the common and gibel carps, as well as the rainbow trout also showed a tendency to recovery over time after had been reduced shortly after (12-24h) exposure to 30  $\mu\text{g/L}$  Cu (De Boeck et al., 2006). These findings clearly indicate the ability of fish to respond and deal with the acute effects induced by dissolved Cu over time, especially at the range of Cu concentrations tested in the present study. On the mechanism underlying the behavioral responses after Cu exposure, possible effects of this metal on the sensory system of zebrafish larvae seems to be the primary candidates to explain the altered swimming performance observed in the present study. Therefore, future studies focused on the effects of dissolved Cu on the sensory system of zebrafish larvae would be of great interest for a better understanding and interpretation of the behavioral effects of Cu reported in the present study.

Introducing adult fish to new surroundings will induce searching behavior, leading to the formation of cognitive map, which is dependent on neural plasticity. Therefore, the interferences on searching behavior can be used as an index of neurological impairment. Anxiolytic and anxiogenic drugs can interfere with exploratory behavior (Tierney,

2011). In the present study, spatial memory in Cu-exposed adult zebrafish was assessed by using the Y-maze task. Data obtained indicated that exposure to 0, 5, 9 and 20  $\mu\text{g/L}$  Cu did not alter the exploratory behavior of adult zebrafish. Indeed, all fish groups spent more time in the novel arm. Nevertheless, this effect was no longer observed in adult zebrafish exposed to 60  $\mu\text{g/L}$  Cu, given that the time spent in the novel arm of the Y-maze was not significantly different from that observed for the other arms. This result indicates that exposure to a high concentration of dissolved Cu can impair the acquisition and/or consolidation of spatial memory. However, further experiments are necessary to test for reproducibility of these findings and to identify the possible neurochemical targets responsible for the observed effect.

In the present study, two approaches were used to evaluate social behavior. Firstly, an inclined mirror was used to simulate a conspecific behavior, and to assess aggression. In addition, exposure of a single fish to a group of fish or an empty aquarium was used to assess social interaction. Exposure to dissolved Cu up to 60  $\mu\text{g/L}$  induced no significant effect on the aggressive behavior or social interaction of adult zebrafish. These findings suggest that exposure to Cu does not disrupt the preference of adult zebrafish to live in groups. Additionally, it is important to stress that the dominant behavior of zebrafish was also shown to be not altered by exposure to 30  $\mu\text{g/L}$  Cu for 48 h (Sloman et al., 2002), thus corroborating with our findings.

The inhibitory avoidance paradigm has been validated for zebrafish and predicts that fish can learn to refrain from swimming from a white to a black compartment to avoid receiving an electric shock (Blank et al., 2009; Moreira-Santos et al., 2008; Ng et al., 2012). The poor performance in this test has recently been associated with decreased levels of genes related to neuroplasticity, the endocrine system, and to stress response (Manuel et al., 2014). Interestingly, exposure of adult zebrafish to 9  $\mu\text{g/L}$  Cu induced a marked loss of memory retention in the inhibitory avoidance task. This effect is clearly detrimental to fish, once it can decrease the animal's fitness to the environment. As observed in the present study, it has been suggested that defensive behaviors are affected by acute exposure of adult zebrafish to Cu. This condition seems to be related to the Cu effects on the locomotor activity and natural tendency to avoid brightly lit environments (Haverroth et al., 2015).

As discussed above for zebrafish larvae, oxidative stress seems to be also involved or associated with the observed effects of acute

exposure to Cu on behavioral parameters in adult zebrafish. This seems to be possible at least at Cu concentrations equal or higher than 9  $\mu\text{g/L}$ . This statement is based on the fact that acute (24 h) exposure to 6  $\mu\text{g/L}$  induced no effect on antioxidant enzymes activity (superoxide dismutase and catalase) and thiol levels in zebrafish liver (Haverroth et al., 2015). On the other hand, in the present study GST activity was reduced in gills of adult zebrafish acutely exposed to 9 and 60  $\mu\text{g/L}$  Cu. Additionally, in the present study GPx activity was also reduced in gills of adult zebrafish acutely exposed to 20  $\mu\text{g/L}$  Cu. Furthermore, short-term (48 h) exposure to 15  $\mu\text{g/L}$  Cu also induced increased levels of protein carbonyl in gills and liver, as well as increased expression of the gene encoding for catalase and superoxide dismutase in the liver of zebrafish (Craig et al., 2007). Finally, acute exposure (96 h) of adult zebrafish to an extremely high concentration of Cu (700  $\mu\text{g/L}$ ) was shown to increase oxidative stress markers and reduce the activities of antioxidant enzymes, including GPx and GST (Wang et al., 2015). It is also worth noting that these findings are in agreement with previous results reported for other fish species acutely exposed to similar concentrations of Cu (Machado et al., 2013; Qu et al., 2014; Wang et al., 2014).

As observed in the present study, Cu effects on oxidative parameters are generally dependent on the fish tissue (Feng et al., 2015; Machado et al., 2013; Qu et al., 2014). In the present study, gills showed to be the most affected tissue by Cu exposure. Indeed, activities of enzymes related to glutathione metabolism (GST, GPx, and GR) in the brain of adult zebrafish were not affected by acute exposure to Cu. Additionally, muscle GPx activity was only affected in adult zebrafish acutely exposed to 20  $\mu\text{g/L}$ . These findings are in line with the fact that gills are directly exposed to waterborne Cu. This reinforces the need for further investigation using this tissue to ascertain the mechanisms involved in the effects observed after acute exposure of zebrafish to dissolved Cu, especially in the range of concentrations tested in the present study.

Derivation of adequate water quality criteria for aquatic contaminants, including Cu, is challenging and an ongoing debate worldwide. Studies focused on the identification and characterization of the effects of chemicals on aquatic organisms at low, physiologically and environmentally relevant levels may certainly contribute significantly to a better risk and safety assessment. However, these studies can also generate key information on possible adverse or



beneficial effects of aquatic contaminants, which may be directly dependent on the range of concentrations tested (Rietjens and Alink, 2006). In fact, biphasic responses, as observed in the present study for behavioral and biochemical parameters in larvae and adult zebrafish, are often reported after fish exposure to environmentally relevant concentrations of dissolved Cu (Machado et al., 2013).

Regarding biphasic responses, it is important to stress that response of fish to low concentrations of Cu can be largely variable, depending on several factors, including the physicochemical conditions of the water used, as well as the exposure protocol adopted. These conditions make the identification of the exact mechanism involved in a giving effect, as well as the derivation of water quality criteria for aquatic contaminants a real challenging task.

In the present study, the experimental exposure system used was static with complete renew of the experimental media every 48 h. Despite the use of a static exposure system with renewal every 48 h, which would be considered less effective than a continuous exposure protocol, data on measured concentrations of dissolved Cu in the experimental media are in complete agreement with the expected (nominal) concentrations. Indeed, measured dissolved Cu concentrations corresponded to 87.2% of the expected (nominal) concentrations over the exposure period. In addition, concentrations of free Cu ion, the most toxic fraction of dissolved Cu (Paquin et al., 2002), significantly augmented with increasing Cu concentrations. In addition, it is interesting to note that the percentage of free Cu ion corresponded to only 0.4% of the dissolved Cu present in the water of maintenance. However, it increases 2.7- and 3.4-fold at 5 and 9  $\mu\text{g/L}$  Cu, while this increase was of 10.6- and 37.4-fold at 20 and 60  $\mu\text{g/L}$  Cu.

Findings discussed above, together with those of the physicochemical conditions observed during the exposure period, indicate that all responses observed after exposure of larvae and adults of zebrafish to Cu, including the biphasic responses, cannot be ascribed to methodological biases. Indeed, biphasic response is a recognized biological phenomenon that is usually observed in the presence of low levels of aquatic contaminants (Hanekamp and Calabrese, 2006; Calabrese, 2013). However, biphasic responses may not be limited to a simple adaptive response, but accompanied by a transcriptional activation of different pathways that may interact with themselves, increasing the level of complexity in toxicological studies (Steinberg et al., 2008).

On the water quality criteria, regulatory agencies (EPA, 2012, 2007; European Union, 2015) establish a broad range of allowed Cu concentrations in water bodies, ranging from 1 to more than 100  $\mu\text{g/L}$ . The upper limit established for Cu by the Brazilian regulatory agency is 9  $\mu\text{g/L}$ , which is applied to aquatic ecosystems used for aquaculture (CONAMA, 2005). However, dissolved Cu concentrations often exceed the allowed limit. For example, in most rivers of São Paulo State (southeastern Brazil), it was shown to vary from 10 to 20  $\mu\text{g/L}$  Cu (CETESB, 2009). Early life stages of fish are frequently affected by exposure to Cu at concentrations close to 9  $\mu\text{g/L}$  (EPA, 2007). In this context, data from the present study show that environmentally relevant concentrations of Cu (9 and 20  $\mu\text{g/L}$ ) affected some biomarkers related to oxidative stress (GST and GPx activities). Furthermore, the current Brazilian water quality criteria for dissolved Cu in fresh water (9  $\mu\text{g/L}$ ) cannot prevent against the Cu-induced behavioral alterations in the swimming performance of zebrafish larvae, as well as in the deficits in avoidance memory in adult zebrafish. Furthermore, the dependence of the behavioral response to the concentration of waterborne dissolved Cu resembles a U-shaped curve, indicating that specific or a combination of interactive targets may be affected, clearly showing the need for further mechanistic studies.

Inter-specific interactions such as predation, as well as intraspecific interactions such as schooling and mating behavior, are relevant traits to fish life. Fish survival and reproduction depend on appropriate behavioral performance. Predator avoidance, social and reproductive behaviors are social interactions that are crucial to a successful and adapted life strategy. Exposure to aquatic pollutants, such as Cu, can alter the normal behavioral patterns, thus increasing the chance of a less successful establishment of a fish population. Additionally, it is important to note that this negative biological impact of chemical pollutants usually occurs at levels much lower than those necessary to cause mortality. Indeed, behavioral biomarkers can detect sub-lethal impacts of aquatic pollutants. In the present study, exposure to dissolved Cu at sub-lethal levels was able to disrupt the response to novelty and fear conditioning memory, which are clearly negative outcomes for adult zebrafish. Regarding the larvae response, Cu exposure increased velocity and distance traveled, which are not necessarily negative outcomes; however, they lead to increased energy expenditure, a potential maladaptive response. Therefore, findings from the present study are of highly ecotoxicological relevance, since

behavioral disturbances can significantly affect the adaptive performance or even survival of affected fish.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Brazilian CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, #462333/2014-0, #406426/2012-0), and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática (INC-TA, #573949/2008-5). Daiane da Silva Acosta was a Ph.D. fellow from the Brazilian CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Alcir L. Dafre, Adalto Bianchini, and Carla D. Bonan are CNPq research fellows.

### **References**

- Ariyomo, T.O., Carter, M., Watt, P.J., 2013. Heritability of boldness and aggressiveness in the zebrafish. *Behav. Genet.* 43, 161–167. doi:10.1007/s10519-013-9585-y
- Ariyomo, T.O., Watt, P.J., 2015. Effect of hunger level and time of day on boldness and aggression in the zebrafish *Danio rerio*. *J. Fish Biol.* 86, 1852–1859. doi:10.1111/jfb.12674
- Atkinson, M.J., Bingman, C., 1999. Elemental composition of commercial seasalts. *J. Aquac. Aquat. Sci.* 8, 39–43.
- Baatrup, E., 1991. Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100, 253–257.
- Baldissarelli, L.A., Capiotti, K.M., Bogo, M.R., Ghisleni, G., Bonan, C.D., 2012. Arsenic alters behavioral parameters and brain ectonucleotidases activities in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 155, 566–572. doi:10.1016/j.cbpc.2012.01.006
- Blank, M., Guerim, L.D., Cordeiro, R.F., Vianna, M.R.M., 2009. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 529–534. doi:10.1016/j.nlm.2009.07.001

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brandão, F., Correia, A.T., Gonçalves, F., Nunes, B., 2013. Effects of anthropogenic metallic contamination on cholinesterases of *Gambusia holbrooki*. *Mar. Pollut. Bull.* 76, 72–76. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.09.029

Calabrese, E.J., 2013. Hormetic mechanisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 43, 580–606. doi:10.3109/10408444.2013.808172

Campbell, H.A., Handy, R.D., Sims, D.W., 2005. Shifts in a Fish's Resource Holding Power during a Contact Paired Interaction: The Influence of a Copper-Contaminated Diet in Rainbow Trout. *Physiol. Biochem. Zool.* 78, 706–714. doi:10.1086/432146

Capiotti, K.M., Fazenda, L., Nazario, L.R., Menezes, F.P., Kist, L.W., Bogo, M.R., Da Silva, R.S., Wyse, A.T., Bonan, C.D., 2013. Arginine exposure alters ectonucleotidase activities and morphology of zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Int. J. Dev. Neurosci.* 31, 75–81. doi:10.1016/j.ijdevneu.2012.09.002

Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113, 484–490.

CETESB, 2009. (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), 2010. Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo. CETESB.

Cognato, G. de P., Bortolotto, J.W., Blazina, A.R., Christoff, R.R., Lara, D.R., Vianna, M.R., Bonan, C.D., 2012. Y-Maze memory task in zebrafish (*Danio rerio*): The role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. *Neurobiol. Learn. Mem.* 98, 321–328. doi:10.1016/j.nlm.2012.09.008

CONAMA, 2005. (Conselho Nacional do Meio Ambiente do Brasil) Resolução número 357, de 17 de março de 2005. CONAMA, Brasília, DF, Brazil.

Craig, P.M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2007. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R1882–R1892. doi:10.1152/ajpregu.00383.2007

Dahlbom, S.J., Lagman, D., Lundstedt-Enkel, K., Sundström, L.F., Winberg, S., 2011. Boldness Predicts Social Status in Zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS ONE* 6, e23565. doi:10.1371/journal.pone.0023565

De Boeck, G., van der Ven, K., Hattink, J., Blust, R., 2006. Swimming performance and energy metabolism of rainbow trout, common carp and gibel carp respond differently to sublethal copper exposure. *Aquat. Toxicol.* 80, 92–100. doi:10.1016/j.aquatox.2006.07.017

De Boeck, G., Van der Ven, K., Meeus, W., Blust, R., 2007. Sublethal copper exposure induces respiratory stress in common and gibel carp but not in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 144, 380–390. doi:10.1016/j.cbpc.2006.11.008

de Lima, D., Roque, G.M., de Almeida, E.A., 2013. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Environ. Res., Next Generation of Ecotoxicologists* 91, 45–51. doi:10.1016/j.marenvres.2012.11.005

Dellu, F., Mayo, W., Vallee, M., Moal, M.L., Simon, H., 1997. Facilitation of Cognitive Performance in Aged Rats by Past Experience Depends on the Type of Information Processing Involved: A Combined Cross-Sectional and Longitudinal Study. *Neurobiol. Learn. Mem.* 67, 121–128. doi:10.1006/nlme.1996.3750

Dew, W.A., Wood, C.M., Pyle, G.G., 2012. Effects of Continuous Copper Exposure and Calcium on the Olfactory Response of Fathead Minnows. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9019–9026. doi:10.1021/es300670p

EPA, 2012. (U.S. Environmental Protection Agency) 2012 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

EPA, 2007. (U.S. Environmental Protection Agency) Aquatic life ambient freshwater quality criteria - Cooper. 2007 Revision. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

European Union, 2015. Drinking Water-Regulations 2014.

Falfushynska, H.I., Gnatyshyna, L.L., Stoliar, O.B., Nam, Y.K., 2011. Various responses to copper and manganese exposure of *Carassius auratus gibelio* from two populations. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 154, 242–253. doi:10.1016/j.cbpc.2011.06.001

Feng, M., He, Q., Meng, L., Zhang, X., Sun, P., Wang, Z., 2015. Evaluation of single and joint toxicity of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoic acid, and copper to *Carassius auratus* using oxidative stress biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 161, 108–116. doi:10.1016/j.aquatox.2015.01.025

Fetcho, J.R., 2007. The utility of zebrafish for studies of the comparative biology of motor systems. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 308B, 550–562. doi:10.1002/jez.b.21127

Gerlai, R., 2003. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behav. Genet.* 33, 461–468.

Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A., 2000. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67, 773–782.

Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 77, 398–405.

Hanekamp, J.C., Calabrese, E.J., 2006. Chloramphenicol, European Legislation and Hormesis - Commentary. *Dose-Response* 5, 91–93. doi:10.2203/dose-response.06-012.Hanekamp

Haverroth, G.M.B., Welang, C., Mocelin, R.N., Postay, D., Bertoncello, K.T., Franscescon, F., Rosemberg, D.B., Dal Magro, J., Dalla Corte, C.L., 2015. Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol.*

Environ. Saf. 122, 440–447. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.09.012

Hernández, P.P., Allende, M.L., 2008. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for studying the genetic basis of copper toxicity, deficiency, and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 835S–839S.

Hernández, P.P., Moreno, V., Olivari, F.A., Allende, M.L., 2006. Sublethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear. Res.* 213, 1–10. doi:10.1016/j.heares.2005.10.015

Irons, T.D., MacPhail, R.C., Hunter, D.L., Padilla, S., 2010. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 84–90. doi:10.1016/j.ntt.2009.04.066

Jia, J., Fernandes, Y., Gerlai, R., 2014. Short-term memory in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 270, 29–36. doi:10.1016/j.bbr.2014.04.046

Johnson, A., Carew, E., Sloman, K.A., 2007. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 84, 431–438. doi:10.1016/j.aquatox.2007.07.003

Leclercq, K., Afrikanova, T., Langlois, M., De Prins, A., Buenafe, O.E., Rospo, C.C., Van Eeckhaut, A., de Witte, P.A.M., Crawford, A.D., Smolders, I., Esguerra, C.V., Kaminski, R.M., 2015. Cross-species pharmacological characterization of the allylglycine seizure model in mice and larval zebrafish. *Epilepsy Behav.* 45, 53–63. doi:10.1016/j.yebeh.2015.03.019

Linbo, T.L., Stehr, C.M., Incardona, J.P., Scholz, N.L., 2006. Dissolved copper triggers cell death in the peripheral mechanosensory system of larval fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 597–603. doi:10.1897/05-241R.1

Linney, E., Upchurch, L., Donerly, S., 2004. Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicol. Teratol., The Use of Zebrafish (*Danio Rerio*) as a Model System in Neurobehavioral Toxicology* 26, 709–718. doi:10.1016/j.ntt.2004.06.015

Machado, A.A. de S., Hoff, M.L.M., Klein, R.D., Cardozo, J.G., Giacomini, M.M., Pinho, G.L.L., Bianchini, A., 2013. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. *Aquat. Toxicol.* 138–139, 60–69. doi:10.1016/j.aquatox.2013.04.009

Manuel, R., Gorissen, M., Piza Roca, C., Zethof, J., Vis, H. van de, Flik, G., Bos, R. van den, 2014. Inhibitory Avoidance Learning in Zebrafish (*Danio Rerio*): Effects of Shock Intensity and Unraveling Differences in Task Performance. *Zebrafish* 11, 341–352. doi:10.1089/zeb.2013.0970

Mathie, A., Sutton, G.L., Clarke, C.E., Veale, E.L., 2006. Zinc and copper: Pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. *Pharmacol. Ther.* 111, 567–583. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.11.004

McGaugh, J.L., 2000. Memory--a century of consolidation. *Science* 287, 248–251.

McIntyre, J.K., Baldwin, D.H., Beauchamp, D.A., Scholz, N.L., 2012. Low-level copper exposures increase visibility and vulnerability of juvenile coho salmon to cutthroat trout predators. *Ecol. Appl.* 22, 1460–1471. doi:10.1890/11-2001.1

McIntyre, J.K., Baldwin, D.H., Meador, J.P., Scholz, N.L., 2008. Chemosensory Deprivation in Juvenile Coho Salmon Exposed to Dissolved Copper under Varying Water Chemistry Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1352–1358. doi:10.1021/es071603e

Moreira-Santos, M., Donato, C., Lopes, I., Ribeiro, R., 2008. Avoidance tests with small fish: Determination of the median avoidance concentration and of the lowest-observed-effect gradient. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1576–1582. doi:10.1897/07-094.1

Moretz, J.A., Martins, E.P., Robison, B.D., 2006. The effects of early and adult social environment on zebrafish (*Danio rerio*) behavior. *Environ. Biol. Fishes* 80, 91–101. doi:10.1007/s10641-006-9122-4

Newman, M., Ebrahimie, E., Lardelli, M., 2014. Using the zebrafish



model for Alzheimer's disease research. *Genet. Aging* 5, 189. doi:10.3389/fgene.2014.00189

Ng, M.-C., Hsu, C.-P., Wu, Y.-J., Wu, S.-Y., Yang, Y.-L., Lu, K.-T., 2012. Effect of MK-801-induced impairment of inhibitory avoidance learning in zebrafish via inactivation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in telencephalon. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1099–1106. doi:10.1007/s10695-011-9595-8

Olivari, F.A., Hernández, P.P., Allende, M.L., 2008. Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res.* 1244, 1–12. doi:10.1016/j.brainres.2008.09.050

Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di Toro, D.M., Dwyer, R.L., Galvez, F., Gensemer, R.W., Goss, G.G., Hostrand, C., Janssen, C.R., McGeer, J.C., Naddy, R.B., Playle, R.C., Santore, R.C., Schneider, U., Stubblefield, W.A., Wood, C.M., Wu, K.B., 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 133, 3–35.

Qu, R., Feng, M., Wang, X., Qin, L., Wang, C., Wang, Z., Wang, L., 2014. Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquat. Toxicol.* 150, 9–16. doi:10.1016/j.aquatox.2014.02.008

Rehnberg, B.C., Schreck, C.B., 1986. Acute metal toxicology of olfaction in coho salmon: behavior, receptors, and odor-metal complexation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 579–586.

Rietjens, I.M.C.M., Alink, G.M., 2006. Future of Toxicology Low-Dose Toxicology and Risk-Benefit Analysis. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 977–981. doi:10.1021/tx0601051

Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Senger, M.R., Arizi, M. de B., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2007. Acute and subchronic copper treatments alter extracellular nucleotide hydrolysis in zebrafish brain

membranes. *Toxicology* 236, 132–139. doi:10.1016/j.tox.2007.04.006

Sandahl, J.F., Baldwin, D.H., Jenkins, J.J., Scholz, N.L., 2007. A sensory system at the interface between urban stormwater runoff and salmon survival. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2998–3004.

Sloman, K.A., Baker, D.W., Wood, C.M., McDonald, G., 2002. Social interactions affect physiological consequences of sublethal copper exposure in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1255–1263. doi:10.1002/etc.5620210620

Sloman, K.A., Morgan, T.P., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2003. Socially-induced changes in sodium regulation affect the uptake of water-borne copper and silver in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 135, 393–403.

Sonnack, L., Kampe, S., Muth-Köhne, E., Erdinger, L., Henny, N., Hollert, H., Schäfers, C., Fenske, M., 2015. Effects of metal exposure on motor neuron development, neuromasts and the escape response of zebrafish embryos. *Neurotoxicol. Teratol.* 50, 33–42. doi:10.1016/j.ntt.2015.05.006

Steinberg, C.E.W., Stürzenbaum, S.R., Menzel, R., 2008. Genes and environment — Striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. *Sci. Total Environ.* 400, 142–161. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.07.023

Tierney, K.B., 2011. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis., Including the Special Section: Zebrafish Models of Neurological Diseases* 1812, 381–389. doi:10.1016/j.bbadis.2010.10.011

Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76, 1416–1427. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.06.005

Wang, B., Feng, L., Jiang, W.-D., Wu, P., Kuang, S.-Y., Jiang, J., Tang,

- L., Tang, W.-N., Zhang, Y.-A., Liu, Y., Zhou, X.-Q., 2015. Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF- $\kappa$ B, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of fish: Preventive role of arginine. *Aquat. Toxicol.* 158, 125–137. doi:10.1016/j.aquatox.2014.10.025
- Wang, T., Long, X., Cheng, Y., Liu, Z., Yan, S., 2014. The potential toxicity of copper nanoparticles and copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides*. *Aquat. Toxicol.* 152, 96–104. doi:10.1016/j.aquatox.2014.03.023
- Waser, W., Bausheva, O., Nikinmaa, M., 2009. The copper-induced reduction of critical swimming speed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is not caused by changes in gill structure. *Aquat. Toxicol.* 94, 77–79. doi:10.1016/j.aquatox.2009.05.016
- Weber, D.N., Ghorai, J.K., 2013. Experimental Design Affects Social Behavior Outcomes in Adult Zebrafish Developmentally Exposed to Lead. *Zebrafish* 10, 294–302. doi:10.1089/zeb.2012.0780
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77, 325–333.
- White, A.R., Cappai, R., 2003. Neurotoxicity from glutathione depletion is dependent on extracellular trace copper. *J. Neurosci. Res.* 71, 889–897. doi:10.1002/jnr.10537
- Zimmer, A.M., Barcarolli, I.F., Wood, C.M., Bianchini, A., 2012. Waterborne copper exposure inhibits ammonia excretion and branchial carbonic anhydrase activity in euryhaline guppies acclimated to both fresh water and sea water. *Aquat. Toxicol.* 122–123, 172–180. doi:10.1016/j.aquatox.2012.06.010

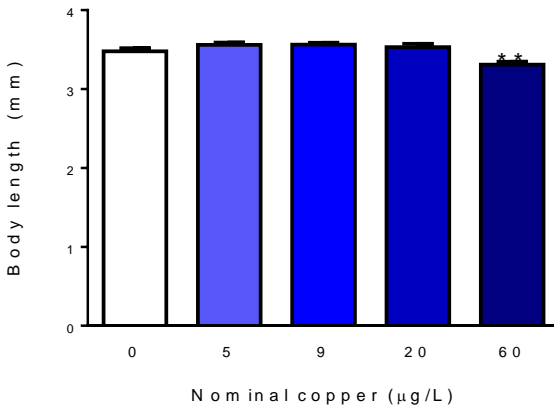
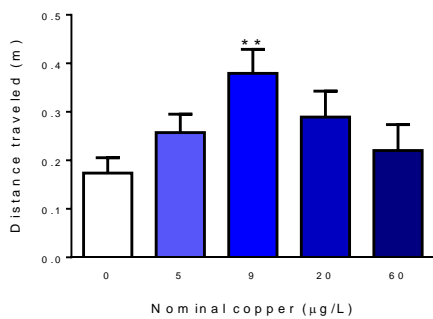
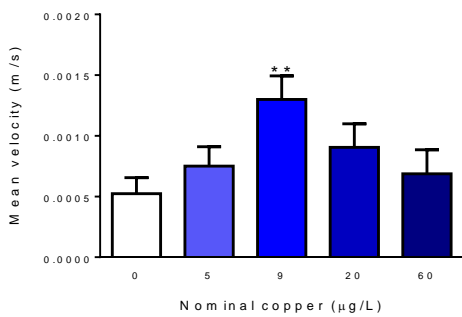
**Legends**

Fig. 1. Body length of zebrafish larvae (72 hpf) exposed to dissolved copper for 96 h. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 19-21). Significant different mean values with respect to the control group (0) are indicated as \*\* (p < 0.01).

A



B



C

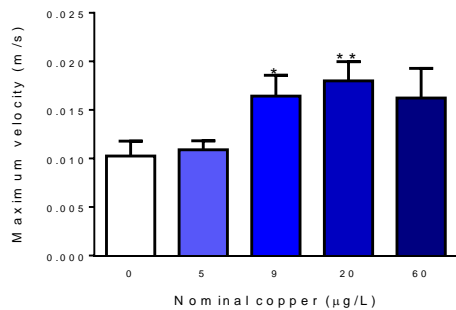


Fig. 2. Swimming performance of zebrafish larvae (72 hpf) exposed to dissolved copper for 96 h. Swimming distance (A), mean velocity (B), and maximum velocity (C) data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 16-21). Significant different mean values with respect to the control group (0) are indicated as \* (p < 0.05) and \*\* (p < 0.01).

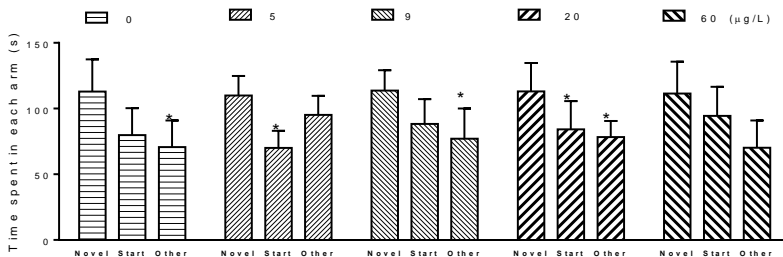


Figure 3. Spatial memory training-test of adult zebrafish exposed to dissolved copper for 96 h. After being trained, the time spent by fish in each arm of the Y maze was recorded. In the test session, fish are expected to spend more time in the novel or in the other arm of the maze, which was not previously explored (novel), or less explored (other) in the training session. Legends indicate the nominal Cu concentrations. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 10-12). Significant different mean values with respect to the novel arm are indicated as \* (p < 0.05).

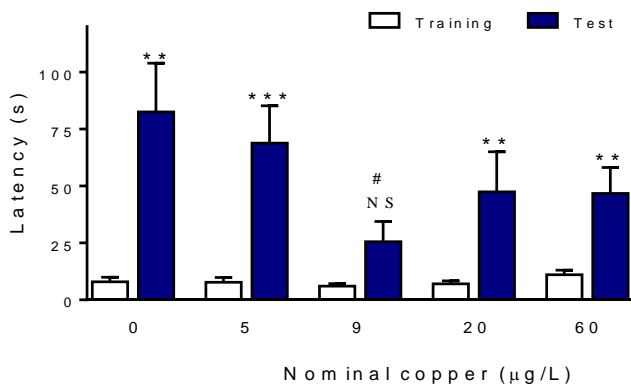


Fig. 4. Inhibitory avoidance task of adult zebrafish exposed to dissolved copper for 96 h. In the training session (Training), fish received an

electric shock when entered the dark compartment. The test session (Test) was conducted 24 h later, when fish were resubmitted to the same procedure, except by the absence of shock. The latency to enter the dark compartment was measured. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 8-11). Significant different mean values with respect to the control group (0) are indicated as NS (non-significant), \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), and \*\*\* ( $p < 0.001$ ). # indicates significant difference from the Test session of control fish ( $p < 0.05$ ).

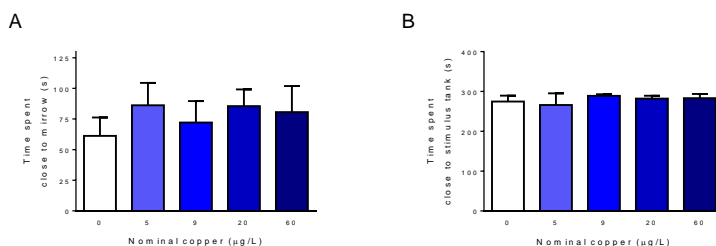


Fig. 5. Aggressive behavior and social interaction of adult zebrafish exposed to dissolved copper for 96 h. Aggressive behavior (n = 12-15) was evaluated by the mirror test, and the number of typical aggressive behaviors recorded. Social interaction (n = 4-5) was evaluated when fish were placed between an empty tank, and a “stimulus tank” containing 15 adult zebrafish. The time spent by fish close to mirror (A), and time spent close to stimulus tank (B) was recorded. No significant differences were detected between copper treatments and the control group (0).

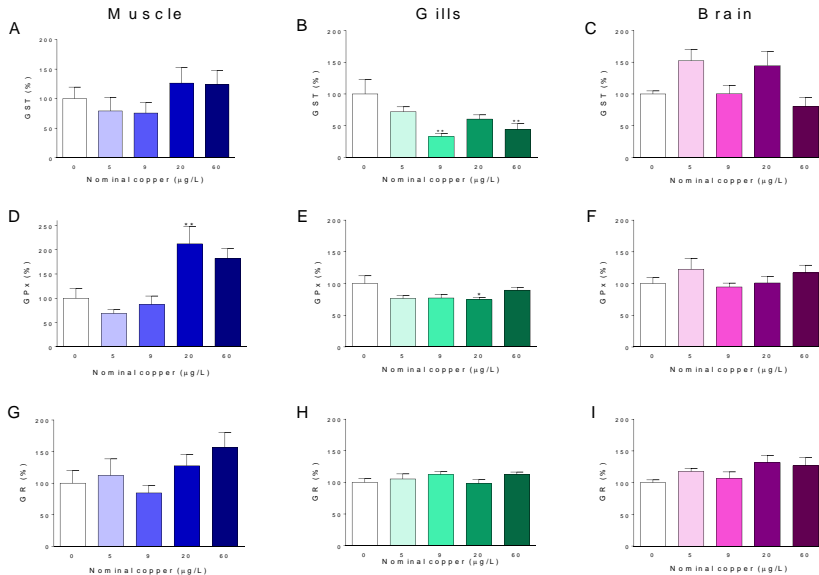


Fig. 6. Activities of glutathione-related enzymes in tissues of adult zebrafish exposed to dissolved copper for 96 h. (A-C) - Glutathione S-transferase (GST), (D-F) glutathione peroxidase (GPx), and (G-I) glutathione reductase (GR) in muscle (A, D, and G), gills (B, E and H) and brain (C, F and I). Values are expressed as percentage of the control group. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n = 5-6). Significant different mean values with respect to the control group (0) are indicated as \* (p < 0.05), and \*\* (p < 0.01).