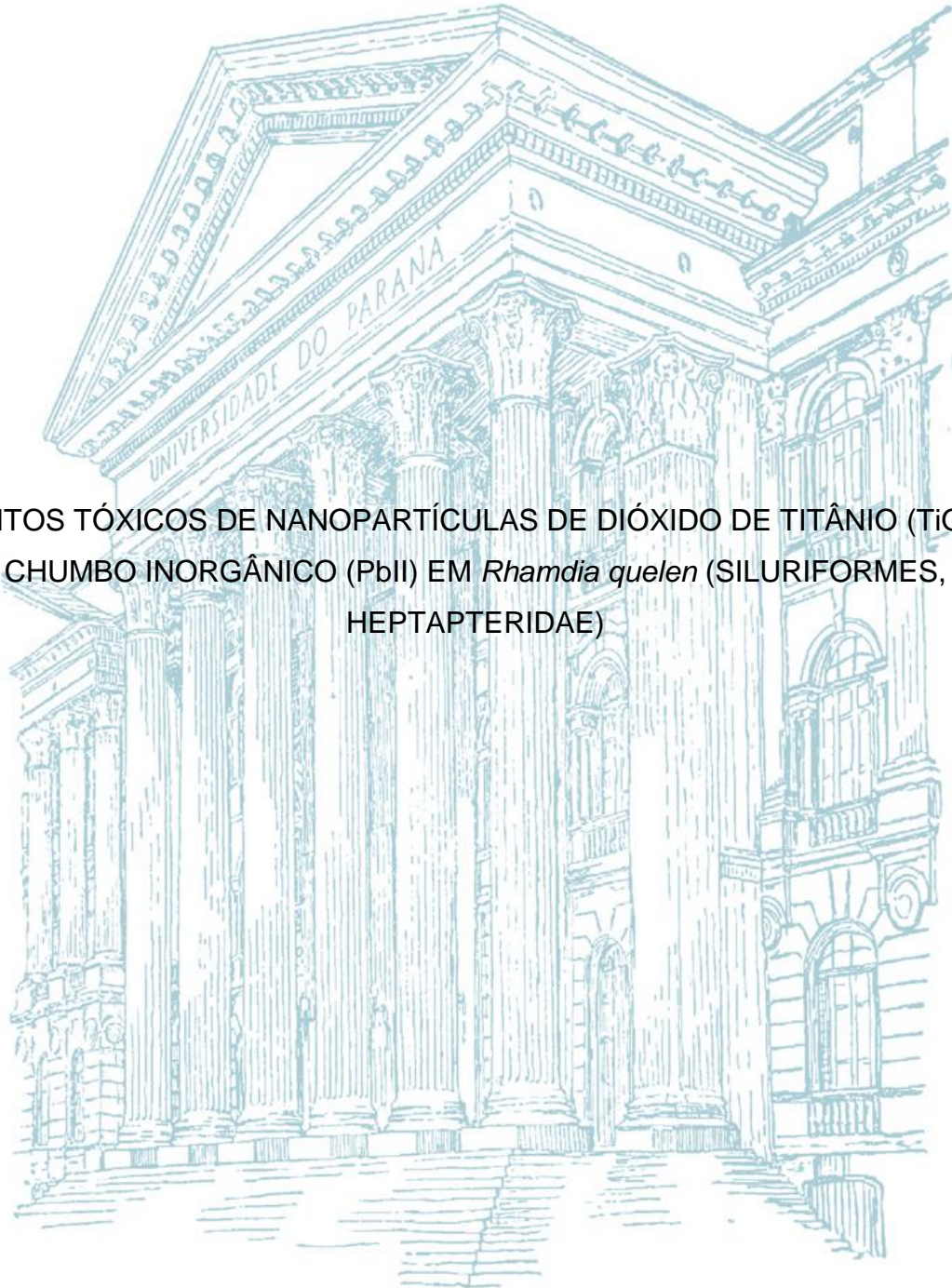


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANE KLINGELFUS

EFEITOS TÓXICOS DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO₂) E
CHUMBO INORGÂNICO (PbII) EM *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES,
HEPTAPTERIDAE)



CURITIBA

2013

TATIANE KLINGELFUS

EFEITOS TÓXICOS DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO₂) E
CHUMBO INORGÂNICO (PbII) EM *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES,
HEPTAPTERIDAE)

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ecologia, no
Curso de Pós-Graduação em Ecologia e
Conservação, Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2013



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Tatiane Klingelfus** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 28 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

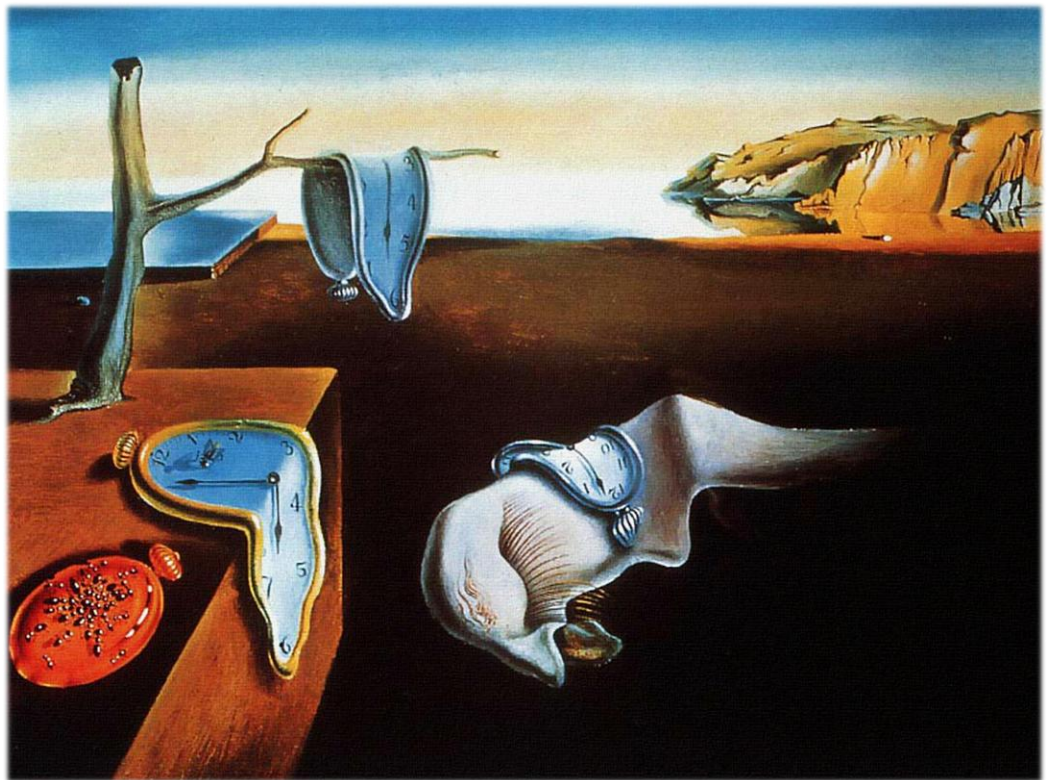
Profª. Dra. Marta Margarete Cestari
Orientadora e Presidente

Profª. Dra. Paula Moiana da Costa
Membro

Prof. Dr. Marcos Vinicius Mocellin Ferraro
Membro

Visto:

Profª. Dra. Maria Regina Torres Boeger
Coordenadora do PPG-ECO



Salvador Dalí, 1931. *A Persistência da Memória.*

“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação.”
John Dewey

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maurício e Míriam, que coloco toda a responsabilidade de criarem uma pessoa extremamente curiosa, sendo isto, um pré-requisito essencial na pesquisa científica. Além disso, vindo de uma família de pescadores, não tive alternativa, a não ser trabalhar com peixes. Muito obrigada e amo muito vocês.

À Profa. Dra. Marta Margarete Cestari, que por todas as dificuldades que tive durante o mestrado, soube sempre como agir. Agradeço a confiança que teve em meu trabalho, e à orientação como amiga e professora.

A todos os colegas do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, que além de compartilharem conhecimentos, também tornaram o ambiente de trabalho descontraído em alguns momentos. Em especial, a Taynah e a Gabrieli, que me ensinaram muito, e continuam me ensinando. Aos estagiários, especialmente a Laís, que entrou no “barco” junto comigo. Ao Gustavo, pela oportunidade de participação em seu trabalho, além da ajuda durante o experimento deste estudo. À Kézia, que começou junto comigo os projetos. Ao Laércio, que sempre respondeu às minhas dúvidas, por mais simples que estas eram. Ao Geonildo, que chegou depois no laboratório, mas que sempre esteve ao meu lado, como colega e também como amigo.

Ao Laboratório de Toxicologia Ambiental, pela participação no trabalho.

Aos professores da banca de avaliação, que tenho confiança nas correções e melhoramento do trabalho.

E ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

RESUMO

Nanopartículas são potencialmente atrativas em tecnologias industriais e medicinais, pois apresentam singularidades físico-químicas. Além disso, há necessidade de estudos de associação entre nanopartículas e compostos já existentes com mecanismos de toxicidade conhecidos. Avaliou-se o potencial tóxico de nanopartículas de dióxido de titânio e chumbo inorgânico em tecido hepático e eritrócitos da espécie de peixe *Rhamdia quelen*, após uma única injeção intraperitoneal, em ensaio agudo de 96 horas. As nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂) foram aplicadas nas doses de 5ng/g, 50ng/g e 500ng/g, o chumbo inorgânico (PbII) na dose 21µg/g e foram aplicadas essas doses em associação. Demonstramos que NPTiO₂ em baixas doses apresentam a capacidade de alterar a atividade enzimática, causar danos ao DNA, promover o mecanismo de apoptose e alterar a acumulação de chumbo em tecido hepático de *Rhamdia quelen*, além de causar alterações morfológicas nucleares, danos ao DNA e apoptose em eritrócitos. A dose de 5ng/g de NPTiO₂ causou efeitos citotóxicos e genotóxicos no sangue. A dose de 50ng/g de NPTiO₂ aumento na concentração de metalotioneína, indicando absorção no fígado, além de aumento na atividade de SOD e inibição de CAT, demonstrando possível estresse oxidativo excessivo, causando danos ao DNA e induzindo ao mecanismo de apoptose. No tratamento que recebeu injeção intraperitoneal somente com PbII, foi detectado danos ao DNA em eritrócitos e no tecido hepático, além de elevada absorção no fígado, porém não induziu o mecanismo de apoptose. Foi observado que a mistura PbII+5ng/g de NPTiO₂ induziu à apoptose de eritrócitos, e menor absorção de chumbo no fígado quando comparada com o grupo tratado somente com PbII. A mistura PbII+50ng/g de NPTiO₂, apresentou maiores danos ao DNA de eritrócitos quando comparada à NPTiO₂ sozinha na mesma dose, além de grande absorção de chumbo no fígado. Apresentou maior concentração de metalotioneína, indução da atividade da SOD, mas sem alteração na atividade da CAT e da GST, demonstrando um possível estresse oxidativo, induzindo o mecanismo de apoptose. A mistura de PbII+500ng/g de NPTiO₂ não causou efeitos citotóxicos e genotóxicos no sangue, houve menor absorção de chumbo no fígado, porém aumentou a concentração de metalotioneína, demonstrando uma possível interação PbII e NPTiO₂, que conseqüentemente pode ter facilitado a eliminação dos contaminantes. A sensibilidade da espécie *Rhamdia quelen* frente às baixas doses de contaminantes, demonstrou que é um bom bioindicador. Este trabalho é o primeiro relato da utilização de contaminação via injeção intraperitoneal em *Rhamdia quelen*.

PALAVRAS-CHAVE: ensaio cometa, ensaio de difusão, nanopartículas, chumbo, peixe, estresse oxidativo, DNA, apoptose.

ABSTRACT

Nanoparticles are potentially attractive in industrial and medical technologies, by their physicochemical singularities. Furthermore, there is a need to investigate the association between nanoparticles and compounds that toxicity mechanisms are known. Our objective was to evaluate the potential toxicity of nanoparticles of titanium dioxide and inorganic lead in fish *Rhamdia quelen* after a single intraperitoneal injection in acute assay of 96 hours. The nanoparticles of titanium dioxide (NPTiO₂) were applied at doses of 5ng/g, 50ng/g and 500ng/g, the inorganic lead (PbII) in dose 21µg/g and the association of the doses were also applied. We use genetic and cytotoxicity biomarkers in blood, biochemical, genetic and cytotoxicity biomarkers in liver tissue and chemical analysis was performed for quantification of lead in liver. At low concentrations, NPTiO₂ have the ability to modify enzyme activity, cause DNA damage, promotes the mechanism of apoptosis and change the absorption of lead in liver tissue of *Rhamdia quelen*, and may also cause nuclear morphological changes, DNA damage and apoptosis into erythrocytes. NPTiO₂ 5ng/g dose caused cytotoxic and genotoxic effects in blood. NPTiO₂ 50ng/g dose showed increased metallothionein concentrations indicating liver nanoparticle absorption, besides increase in SOD activity and CAT inhibition, possibly demonstrating excessive oxidative stress, causing DNA damage and inducing apoptosis mechanism. The treatment that received only intraperitoneal injection of PbII, DNA damage was detected in liver tissue and erythrocytes, and high concentration of lead in liver, but did not induce apoptosis mechanism. The mixture PbII+5ng/g of NPTiO₂ induced apoptosis of erythrocytes and less absorbing lead in the liver compared to the PbII treated group. The mixture PbII+50ng/g of NPTiO₂, showed higher DNA damage red blood cells as compared to NPTiO₂ alone, at the same dose, in addition to great absorption of lead in liver. Moreover, these combined doses presented the highest concentration of metallothionein, induction of SOD activity, but no change in the activity of CAT and GST, demonstrating potential oxidative stress and apoptosis activating mechanism. The mixture PbII+500ng/g NPTiO₂ did not caused cytotoxic and genotoxic effects in blood, there was less absorption of lead in the liver but increases metallothionein concentration, demonstrating a possible interaction between PbII and NPTiO₂, that consequently may have facilitated the removal of contaminants. The species *Rhamdia quelen* proved as a good bioindicator because were sensitive to low doses of contaminants. This work is the first report of the use of contamination via intraperitoneal injection in *Rhamdia quelen*.

KEYWORDS: comet assay, alkali-halo assay, nanoparticles, lead, fish, oxidative stress, DNA, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.Caracterização da Nanopartícula de Dióxido de Titânio	26
FIGURA 2.Exemplar de <i>Rhamdia quelen</i>	27
FIGURA 3.Contaminação dos peixes.....	28
FIGURA 4.Coleta das amostras.	29
FIGURA 5.Nucleóides com danos de 0 a 4 detectados através do ensaio cometa. .	32
FIGURA 6.Nucleóides detectados através do ensaio de difusão do DNA	33
FIGURA 7.Alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de <i>Rhamdia quelen</i>	35
FIGURA 8.Danos ao DNA de eritrócitos em <i>Rhamdia quelen</i> , detectados por ensaio cometa	40
FIGURA 9.Porcentagem de apoptose em eritrócitos de <i>Rhamdia quelen</i> , detectada por ensaio de difusão de DNA	42
FIGURA 10.Quantificação de chumbo em tecido hepático de <i>Rhamdia quelen</i>	43
FIGURA 11.Quantificação de metalotioneína (MT) em tecido hepático de <i>Rhamdia quelen</i>	45
FIGURA 12 .Danos ao DNA no tecido hepático de <i>Rhamdia quelen</i> , detectados por ensaio cometa	50
FIGURA 13 .Porcentagem de apoptose no tecido hepático de <i>Rhamdia quelen</i> , detectada por ensaio de difusão de DNA	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.: Frequência média de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos maduros de <i>Rhamdia quelen</i>	38
TABELA 2.: Atividade das enzimas Superóxido-Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S-Transferase (GST) em tecido hepático de <i>Rhamdia quelen</i>	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL	12
1.2 TOXICOLOGIA	12
1.3 BIOINDICADORES	14
1.3.1 <i>Rhamdia quelen</i>	15
1.4 BIOMARCADORES	15
1.4.1 BIOMARCADORES GENÉTICOS	15
1.4.1.1 ENSAIO COMETA	16
1.4.1.2 ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA	17
1.4.1.3 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES.....	18
1.4.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	19
1.4.2.1 METALOTIONEÍNA	19
1.4.2.2 SUPERÓXIDO-DISMUTASE	19
1.4.2.3 CATALASE	20
1.4.2.4 GLUTATIONA S-TRANSFERASE.....	20
1.5 METAIS.....	21
1.5.1 CHUMBO	22
1.6 NANOPARTÍCULAS.....	23
1.6.1 NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO	23
1.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS E METAIS.....	24
2 OBJETIVO GERAL	25
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE NPTiO ₂ E PbII.....	26
3.2 CARACTERIZAÇÃO DE NPTiO ₂	26
3.3 ACLIMATAÇÃO DE <i>Rhamdia quelen</i>	27
3.4 CONTAMINAÇÃO DOS PEIXES	28
3.5 COLETA DAS AMOSTRAS.....	29

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO EM TECIDO HEPÁTICO	29
3.7 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	30
3.7.1 QUANTIFICAÇÃO DE METALOTIONEÍNA	30
3.7.2 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO-DISMUTASE	30
3.7.3 ATIVIDADE DA CATALASE	31
3.7.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE	31
3.8 BIOMARCADORES GENÉTICOS	31
3.8.1 ENSAIO COMETA.....	31
3.8.2 ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA.....	32
3.8.3 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES.....	33
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 DANOS EM ERITRÓCITOS DE <i>Rhamdia quelen</i>	35
4.1.1 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES.....	35
4.1.1.1 FREQUÊNCIA DE VACUOLATED.....	36
4.1.1.2 FREQUÊNCIA TOTAL DE AMN	37
4.1.2 ENSAIO COMETA.....	39
4.1.3 ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA.....	41
4.2 DANOS EM TECIDO HEPÁTICO DE <i>Rhamdia quelen</i>	43
4.2.1 QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO.....	43
4.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE METALOTIONEÍNA	44
4.2.3 ATIVIDADE DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO-DISMUTASE (SOD), CATALASE (CAT) E GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)	46
4.2.4 ENSAIO COMETA.....	49
4.2.5 ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA.....	51
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

A industrialização disponibiliza uma grande diversidade de produtos químicos que são potencialmente tóxicos, e geram resíduos em quantidade significativamente prejudicial ao ambiente, e à medida que a humanidade aumenta sua capacidade tecnológica de intervir na natureza, há a necessidade de aumento do uso do espaço e recursos, e, conseqüentemente, aumenta-se a disposição de resíduos no ambiente (ZAGATO, 2006).

Atualmente estão catalogadas cerca de 70 milhões de substâncias químicas, sendo 10 milhões destas disponíveis comercialmente, 80 mil utilizadas no cotidiano, e somente 2 mil apresentam conhecimento toxicológico (Chemical Abstrat Service, 2012).

O ambiente aquático é um dos ecossistemas que mais sofre impactos antropogênicos, devido ao despejo de esgoto industrial e doméstico, o uso excessivo de agrotóxicos e a geração substâncias químicas que não são degradadas no ambiente, também chamadas de substâncias químicas persistentes (AKAISHI, 2003).

A preocupação com a preservação e manutenção da qualidade do ecossistema aquático está em crescimento contínuo. Estudos são realizados com o objetivo de compreender a ação de elementos e substâncias químicas no ecossistema, assim como a interação e seus efeitos com os seres vivos (AKAISHI, 2003).

1.2 TOXICOLOGIA

Segundo Bawden (1988), a toxicologia é um campo interdisciplinar, que estuda os efeitos de compostos químicos, agentes biológicos e físicos em organismos vivos e no ambiente, apresentando informações de importância científica, ética, legislativa e financeira.

A utilização de bioensaios em pesquisas de toxicologia é vantajosa no sentido de possibilitar o estudo dos efeitos tóxicos, de contaminantes específicos, em organismos de forma isolada ou associada (caso seja mais de uma substância a ser estudada), reduzindo a influência de variáveis ambientais. Desta forma, é possível fazer um estudo da especificidade relativa de alguns efeitos e com os contaminantes utilizados (AKAISHI, 2003).

A ecotoxicologia tem por definição descrever efeitos tóxicos de diversos agentes químicos em organismos vivos, comunidades e populações (TRUHAUT, 1969 *apud* TRUHAUT, 1977). Tem como característica ser uma ciência multidisciplinar, envolvendo conhecimentos de diversas áreas, e principalmente abrange o estudo do ambiente e a interação de substâncias tóxicas com os seres vivos (CONNEL *et al.*, 1999).

Através de testes ecotoxicológicos é possível determinar concentrações de compostos químicos que causam danos a organismos, além de apresentar ampla utilização no desenvolvimento de padrões e critérios de qualidade para proteção de populações e comunidades (BERTOLETTI, 2000). Além disso, a simples detecção de contaminantes em compartimentos abióticos e bióticos, ou seja, no ambiente ou em seres vivos, não é suficiente para avaliar danos ecológicos, sendo necessário o conhecimento dos efeitos que estes contaminantes causam em organismos vivos (JHA, 2008).

A genética toxicológica trata do estudo de substâncias que podem danificar o DNA e os cromossomos das células. Esses danos são usualmente detectados como mutações gênicas, aberrações cromossômicas, quebras de fita e aductos de DNA, ou ainda como interferência com os mecanismos envolvidos no reparo destes danos. No intuito de estudar os efeitos de agentes químicos e radiações no DNA e nos cromossomos, tem sido desenvolvido um número expressivo de sistemas testes *in vitro* e *in vivo* (RIBEIRO e ANDRADE, 2003).

Devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, como a nanotecnologia, conceitos atuais foram criados a fim de estudar os efeitos de nanomateriais. Sendo estes estudos chamados de nanoecotoxicologia e nanogenotoxicologia.

A presença de nanopartículas no meio aquático é seguida por inúmeras consequências, e estas imprevisíveis, devido a escassez de informações (KRYSANOV *et al.*, 2010). Além disso, o desenvolvimento de nanotecnologias ainda

apresenta dados variados e contraditórios de avaliação do impacto sobre o ambiente e seres vivos (ANDRIEVSKY *et al.*, 2005; OBERDORSTER *et al.*, 2005a,b; OBERDORSTER, 2007; KOLESNICHENKO *et al.*, 2008).

Nanomateriais apresentam propriedades genotóxicas imprevisíveis, devido ao pequeno tamanho e grande área de superfície, além de propriedades físico-químicas que favorecem à adsorção de metais ou biomoléculas. Esses danos ao DNA podem ser causados indiretamente, através de respostas inflamatórias e estresse oxidativo, ou diretamente, através da possibilidade de atravessar a membrana nuclear ou durante a mitose (SINGH *et al.*, 2009).

1.3 BIOINDICADORES

Os bioindicadores ideais para ensaios em mutagênese devem, preferivelmente, ser organismos endêmicos como sentinelas ambientais, apresentando capacidade de sobreviver tanto em ambientes com ausência de contaminantes, quanto na presença de contaminantes, além de ser abundantes no ambiente e adaptar-se bem em condições experimentais (PANDRANGI *et al.*, 1995; AKAISHI, 2003).

A utilização de animais em experimentos permite a administração da substância em estudos por diversas vias, através do alimento, da água ou por injeções. Além disso, há possibilidade de avaliar efeitos em tecidos específicos, em células somáticas ou germinativas e comparar contaminações agudas e crônicas. Além disso, é possível, de certa forma, extrapolar os efeitos observados nos organismos utilizados em experimento, para condições de exposição de compostos químicos em seres humanos (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

A utilização de peixes como bioindicadores para testes laboratoriais e de biomonitoramento é devido sua atuação em diversos níveis da cadeia trófica, capacidade de bioacumulação e capacidade de responder a baixas concentrações de xenobióticos (MINISSI *et al.*, 1996; GOKSOYR *et al.*, 1991). Ou seja, são organismos sentinelas que indicam mais rapidamente os efeitos causados por contaminantes, em comparação com altos níveis de organização, como populações ou comunidades (ADAMS, 2002).

1.3.1 *Rhamdia quelen*

Rhamdia quelen, ou jundiá, pertence à família Heptapteridae (NELSON, 2006), é uma espécie de peixe com distribuição neotropical, encontrada do sul do México até o centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). É uma espécie nativa promissora para o cultivo, com rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, fácil adaptação ao manejo, boa produtividade em açudes e alto potencial de comercialização (GOMES *et al.*, 2000). É uma espécie resistente ao inverno e apresenta rápido crescimento no verão (BARCELLOS *et al.*, 2003).

A coloração do jundiá varia de marrom avermelhado claro a cinza ardósia. A pigmentação da parte inferior da cabeça é variável. A *Rhamdia quelen* vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, a procura de alimento (GUEDES, 1980). Em experimentos com larvas e alevinos dessa espécie em cativeiro, observou-se uma acentuada aversão à luz e a busca por locais escuros (PIAIA *et al.*, 1999).

1.4 BIOMARCADORES

Biomarcadores têm por definição qualquer alteração biológica detectável que expresse uma resposta à exposição de poluentes presentes no ambiente. Através dos biomarcadores é possível investigar o impacto à integridade do DNA em organismos bioindicadores de substâncias e elementos tóxicos. São consideradas ferramentas importantes em programas de monitoramento ambiental, pois apresentam grande susceptibilidade, alta sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo para análise (McCARTHY e SHUGART, 1990; STEGEMAN *et al.*, 1992; BAINY, 1993).

1.4.1 BIOMARCADORES GENÉTICOS

Biomarcadores genéticos são utilizados como ferramenta para a detecção de exposição e avaliação de efeitos de poluentes. Podem ser analisadas aberrações

cromossômicas, aductos de DNA, quebras no DNA, frequência de micronúcleo e anomalias nucleares (BOMBAIL *et al.*, 2001).

1.4.1.1 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa, SCGE (Single-Cell Gel Eletrophoresis), é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA em células individualizadas (FERRARO, 2003). O ensaio avalia danos no DNA em nível celular individual, através da medida da migração em gel do DNA de células após corrida de eletroforese (SINGH *et al.*, 1988). O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL *et al.*, 2001).

A técnica baseia-se no fato de que o DNA da célula que não possuir dano migrará em conjunto, caracterizando-se como um círculo. As células que possuem danos em seu DNA, podendo ser de fita simples ou fita dupla, durante a corrida eletroforética, serão formadas fragmentos diversos. Fragmentos menores tendem a migrar com mais velocidade que fragmentos maiores. Ocorrendo danos intensos, muitos fragmentos de tamanhos variados serão formados, e migrarão em velocidades diferentes, formando então a figura típica de um cometa (OLIVE *et al.*, 1990).

Uma das metodologias para avaliar o dano é realizada através da relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pelos fragmentos de DNA. Esta classificação varia entre Classe 0, onde não ocorreu dano, até a Classe 4, em que ocorreu muitos danos ao DNA, sendo possível observar uma extensão maior da cauda (COLLINS *et al.*, 1997).

O ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos no DNA, causados por diferentes classes de agentes mutagênicos em peixes (BELPAEME *et al.*, 1998). Uma das vantagens do ensaio cometa é que este não depende de proliferação celular para ser realizado, portanto pode ser utilizado com qualquer tipo celular. Uma vez que substâncias genotóxicas, com frequência, são tecido-específicas, com esta técnica, podem ser analisados diretamente nos tecidos dos organismos (PANDRANGI *et al.*, 1995; ROJAS *et al.*, 1999; FERRARO, 2003).

A técnica foi desenvolvida por Osteling e Johanson (1984), utilizando células misturadas em agarose de baixo ponto de fusão, depositadas sobre uma lâmina com agarose normal. Posteriormente, as células presentes na lâmina passariam por um processo de lise celular, por detergentes e soluções salinas concentradas. A lise permitiria a liberação do DNA. As lâminas eram submetidas à eletroforese em tampão neutro. Porém, havia algumas limitações, pois só era capaz de detectar quebras de fita duplas de DNA, e que poderia ser confundido com o RNA ainda presente no núcleo (ROJAS *et al.*, 1999).

Singh *et al.* (1988) fizeram uma variação da técnica, substituindo o tampão neutro utilizado na corrida eletroforética por um tampão cujo pH era superior a 13. Com esta modificação, foi possível detectar no DNA quebras de fita simples, sítios alcali-lábeis e sítios de reparo tardio.

Originalmente, a técnica do ensaio cometa foi desenvolvida para detectar efeitos genotóxicos em mamíferos, porém foi de grande eficiência na detecção de substâncias genotóxicas em organismos de ambiente aquático, além de ser muito empregada na área clínica em estudos de reparo do DNA no biomonitoramento ambiental e no monitoramento humano (FERRARO, 2003).

1.4.1.2 ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA

O ensaio de difusão do DNA foi primeiramente desenvolvido por Sestili *et al.* (1999), chamado Alkali-Halo Assay (AHA). Esta técnica permite a detecção de quebras de cadeia simples do DNA em células isoladas, e apresenta sensibilidade semelhante ao ensaio cometa. Há algumas semelhanças entre a técnica do ensaio de difusão e do ensaio cometa, porém o ensaio de difusão não apresenta a etapa de eletroforese para separar os fragmentos de DNA danificados dos não danificados, somente é realizada incubação das lâminas pós-lise em tampão alcalino.

Com o ensaio de difusão é possível identificar os processos de apoptose e necrose, que podem ser causados devido à fatores secundários, ou seja, causados por fatores não necessariamente genotóxicos, como, por exemplo, produção de espécies reativas de oxigênio ou atividade enzimática (PARK *et al.*, 1991; SPEIT *et al.*, 1995). As células apoptóticas apresentam elevada fragmentação do DNA, apresentando halo mais extenso comparado a células sem danos, e as células

necróticas caracterizam-se por apresentar um espaço entre o halo e o núcleo remanescente (SESTILI, 2006).

1.4.1.3 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES

O teste do micronúcleo (MN) foi desenvolvido por Boller e Schmid (1970) em eritrócitos de medula óssea e sangue de hamster, atualmente é um ensaio *in vivo* amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos (HAYASHI *et al.*, 1994), sendo a aplicação do teste em medula óssea e sangue periférico um dos mais estabelecidos ensaios citogenéticos *in vivo* no campo da genética toxicológica (FENECH, 2000).

O teste do micronúcleo foi adaptado para eritrócitos de peixes por Hooftman e Raat (1982). Diversos tipos de anomalias nucleares ainda não apresentam sua origem completamente compreendida e, Carrasco *et al.* (1990), descreveram e fotografaram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes e classificaram como: blebbed; lobbed; vacuolated e notched.

Segundo Heddle (1973), o teste do micronúcleo serve como substituição às técnicas citogenéticas, que necessitam boas preparações e requerem considerável experiência.

A formação de micronúcleos (MN) ocorre devido a danos induzidos em células parentais, que formam fragmentos cromossômicos, ou perda de cromossomos inteiros, que não são incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Esses fragmentos são revestidos por membrana nuclear, ficando visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula (RIBEIRO e ANDRADE, 2003).

A técnica de micronúcleo com coloração fluorescente de laranja de acridina é comumente aplicada em mamíferos, sendo modificada para peixes por Ueda *et al.* (1992). Esta técnica possibilita clara identificação de micronúcleos e distinção entre eritrócitos imaturos e maduros. Eritrócitos imaturos apresentam tempo de vida relativamente curto e diferem de eritrócitos maduros por apresentar citoplasma com fluorescência (RIBEIRO e ANDRADE, 2003).

1.4.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Indicadores de alterações em sistemas bioquímicos são mais sensíveis que outros níveis mais elevados de alterações biológicas, como células, organismos e populações (STEGEMAN *et al.*, 1992). Alterações relacionadas ao estresse em funções bioquímicas e fisiológicas usualmente precedem o início de efeitos mais sérios nos níveis populacionais e de comunidade (BUCHELI e FENT, 1995) e são tidas como biomarcadores precoces de contaminação ambiental (PAYNE *et a.*, 1987).

1.4.2.1 METALOTIONEÍNA

A metalotioneína (MT) é uma estrutura protéica, considerada um forte quelante de metais, e quando um organismo é exposto a contaminantes que contenham metais, pode ocorrer indução da síntese de MT (VALLEE, 1991; KIME, 1999; ANDREWS, 2000).

A função fundamental da MT inclui a ação como metalochaperona para transportar, estocar e armazenar íons metálicos, controle da concentração de elementos traços livres como zinco (Zn) e cobre (Cu), ação como agente de detoxificação para metais como cádmio (Cd) e mercúrio (Hg), e também um papel protetor por sequestro de metais e proteção contra condições de estresse. Por isso, a MT é uma importante proteína no metabolismo intracelular de Cu e Zn e na proteção contra danos oxidativos resultantes da exposição excessiva a metais (MUTO *et al.*, 1999).

1.4.2.2 SUPERÓXIDO-DISMUTASE

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado devido à redução do O_2 durante as reações enzimáticas intracelulares ou devido à radiação ionizante. A enzima superóxido dismutase (SOD), que pertence ao grupo de metalenzimas, realiza a conversão, ou dismutação, do $O_2^{\cdot-}$ com produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que mais tarde é convertido em água e oxigênio através da ação das enzimas CAT e/ou glutathiona peroxidase (GPx) (HAYES *et al.*, 1997).

A importância da atuação da SOD se deve a evitar que o $O_2^{\cdot-}$ atue na oxidação dos constituintes celulares, ou na formação de outros radicais livres como o radical hidroxil (OH^{\cdot}), e que pode causar danos em macromoléculas como lipídios e proteínas, devido a sua alta reatividade (HAYES *et al.*, 1997; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

1.4.2.3 CATALASE

A catalase é uma enzima tetramérica que é encontrada em todos os organismos vivos e tem a capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000). Além disso, ela é a única entre as enzimas degradantes de H_2O_2 , que não consome equivalentes redutores celulares e possui um mecanismo muito eficiente para remover o peróxido de hidrogênio formado nas células sob condições de estresse (MALLICK e RAI, 1999).

1.4.2.4 GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A glutathione S-transferase é uma enzima essencial para a proteção aos danos de compostos potencialmente reativos, conjugando-os para posteriormente serem eliminados do organismo (GEORGE, 1993; MARIONNET *et al.*, 2006). Está associada à metabolização de compostos xenobióticos e toxinas (GEORGE, 1993; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000). Além disso, participa de processos de desintoxicação formando conjugados com a glutathione reduzida (GSH) e possui papel no metabolismo de produtos secundários, incluindo a estabilização de flavonoides, e também, atua como peroxidase na redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcool durante o estresse oxidativo (DIXON e LAPTHORN, 2002).

1.5 METAIS

Metais são componentes naturais do ambiente, e estão presentes em montantes variáveis na geosfera, atmosfera, hidrosfera e biosfera. Plantas, animais e humanos dependem de alguns metais (ex: cobre, ferro e zinco) como micronutrientes, enquanto outros metais (ex: cádmio, chumbo e mercúrio) podem ser tóxicos mesmo em quantidades relativamente pequenas. Metais são originários de recursos geológicos naturais e sua liberação no ambiente pode ser acelerado por nossa sociedade moderna, incluindo mineração e processamento mineral, queima de combustíveis fósseis, e vida urbana. Atividades humanas alteraram drasticamente o balanço natural e o ciclo de metais em muitos locais, resultando na contaminação ambiental e sério impacto no ecossistema, assim como na saúde humana (B. I. O., 2003; ESTEVES, 1988; KRUUS *et al.*, 1991).

As indústrias de fabricação de aço, fundições, construção e lançamento de barcos, ferros-velhos, extração de minerais, minas, zonas de aterros, curtumes, fábricas de pneus e instalações militares são exemplos de setores responsáveis pela contaminação ambiental por metais (DD 175/1988).

Metais constituem uma importante classe de poluentes, e derivam tanto de fontes pontuais, como efluentes industriais e rejeitos de mineração, como de recursos difusos, como enxurradas (ZIELHUIS, 1984). A toxicidade de um dado metal depende da espécie e propriedades químicas, assim como fatores ambientais como adsorção em superfícies sólidas, complexação e precipitação (ANWAR, 1997; BERNARD e LAUWERYS, 1989; CIESIELSKI *et al.*, 1994; LAHDETIE, 1995; NORPPA *et al.*, 1995). Esta toxicidade interfere em importantes processos, incluindo degradação aeróbia e anaeróbia de matéria orgânica (AVERY *et al.*, 1996; ROSIN, 1992; WOLFE *et al.*, 1970).

A especiação de metais tóxicos nos ecossistemas aquáticos compreende a distribuição de várias formas físico-químicas nos compartimentos (coluna d'água e seus particulados suspensos, sedimentos e água intersticial). Os metais podem estar presentes nas seguintes formas: livre e dissolvida (metálicos, mono e polivalentes-hidratados); complexada pela matéria orgânica dissolvida (geopolímero, ácidos húmicos e fúlvicos); complexos solúveis, na fração de lipídios presentes na água; adsorvidos nas partículas coloidais e nos particulados orgânicos e inorgânicos

suspensos na água; e insolubilizada, usualmente como sulfetos e carbonatos (ZAGATTO e MOZETO, 2006).

A toxicidade dos metais está relacionada com pelo menos três tipos de influência: bloqueio de grupos funcionais essenciais na atuação de uma biomolécula, deslocamento de outros metais presentes no sistema, modificações na conformação de sítios ativos e na estrutura quaternária de proteínas (GUTHRIE e PERRY, 1980; HAMOND e BELILES, 1980).

Em pelo menos alguma forma ou em algumas condições ambientais, muitos metais são capazes de induzir tumores ou interagem com material genético (COSTA, *et al.*, 1984; KAZANTZIS e LILLY, 1986; NORSETH, 1988; WOO *et al.*, 1988). A distribuição do metal entre suas diferentes formas químicas e físicas, as quais podem apresentar diferentes potenciais carcinogênicos, dão uma nova dimensão a esta incerteza. Experimentos com animais podem determinar se o metal em uma certa forma, dose e via de administração podem induzir câncer (MAGOS, 1991).

Existe uma toxicidade relativa dos metais mais comuns no meio ambiente, em ordem decrescente de periculosidade: mercúrio, prata, cobre, zinco, níquel, Chumbo, cádmio, arsênio, cromo, estanho, ferro, manganês, alumínio, berílio e lítio (XIMENES, 2006).

1.5.1 CHUMBO

O chumbo é encontrado naturalmente na natureza, porém, é um elemento não-essencial. E devido suas propriedade químicas e físicas, é amplamente utilizada pelo homem desde os tempos antigos (HERNBERG, 2000). Apesar do controle do uso do chumbo, este ainda permanece presente em muitas atividades industriais, como na reparação de automóveis, fabricantes e reciclagem de baterias, tintas a base de chumbo, refino e oficina de fundição, assim como, manutenção de estruturas como pontes, em soldas de latas de alimentos e bebidas, cerâmica, tubulações de água potável e fumo do tabaco (PATRICK, 2006; SPIVEY, 2007).

Sabe-se dos efeitos adversos que o chumbo causa à saúde, sendo considerado neutotóxico, nefrotóxico e com efeitos deletérios no sistema cardiovascular e hematológico (ATSDR, 2007). Além de, efeitos positivos em testes

de inibição enzimática, fidelidade da síntese de DNA, mutações, aberrações cromossômicas, câncer e teratogenia (JOHNSON, 1998).

A ação genotóxica do chumbo parece ser indireta, através da inibição do sistema de reparo do DNA e a produção de radicais livres, porém os dados ainda são conflitantes, apesar de saber que há evidências do risco genético associado à exposição do chumbo (GARCÍA-LESTÓN *et al.*, 2010).

1.6 NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas apresentam dimensão entre 1 e 100 nm, e estão agrupadas de acordo com sua composição química, como nanomateriais de carbono (fulerenos e nanotubos), óxidos metálicos (por exemplo, TiO₂ e ZnO), nanomateriais metálicos (por exemplo, Au e Ag), semicondutores (quantum dots) e nanomateriais orgânicos poliméricos (White Book on Nanotechnologies, 2008). Por suas singularidades em propriedades físico-químicas, como grande capacidade de penetração, grande área de superfície e atividade química, tornam-se potencialmente atrativas em tecnologias industriais e medicinais, porém, possuem elevado prejuízo para o ambiente e para os seres vivos (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005a;. BORM *et al.*, 2006;. KREYLING *et al.*, 2006; LAM *et al.*, 2006; MAYNARD, 2007).

A internalização celular de nanopartículas ocorre principalmente por endocitose mediada por proteínas presentes na membrana celular, como clatrina e caveolina, sendo que partículas com 50 nm de tamanho são mais rapidamente internalizadas comparando com partículas menores (abaixo de 14 nm) e maiores (até 500 nm) (REJMAN *et al.*, 2004; CHITHRANI *et al.*, 2006).

1.6.1 NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO

As nanopartículas de Dióxido de Titânio (NPTiO₂) estão presentes em tintas, protetores solares, cosméticos, capacitores, materiais de construção, catalisador, depurador de ar, anti-bactericidas, virais, fungos e algas, revestimento de pisos e banheiras e equipamentos esportivos, segundo The Project on Emerging Nanotechnologies (2013).

Em estudos realizados com Daphnias, mantidas em suspensões de nanopartículas por 48 horas, detectou-se acumulação no intestino (ZHU, *et al.*, 2009), além de rápida acumulação de NPTiO₂, com permanência de parte considerável de nanopartículas por 72 horas posteriores. Em exposição crônica, as NPTiO₂ inibiram o crescimento e a reprodução das daphnias em baixas concentrações (ZHU, *et al.*, 2010). Porém, em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) não foi detectada acumulação em órgãos internos (FEDERICI *et al.*, 2007; JOHNSTON *et al.*, 2010). Em carpa (*Cyprinos carpio*), houve acúmulo de titânio no músculo e no fígado quando mantidos em água contendo NPTiO₂ (SUN *et al.*, 2007).

Tratamento agudo realizado com truta arco-íris, em concentração de até 1mg/L, não causaram toxicidade, mas foram detectados efeitos subletais, como patologias de órgãos internos e alterações bioquímicas e respiratórias (FEDERICI *et al.*, 2007). Em ensaio trófico, adicionando NPTiO₂ nas concentrações de 10 e 100 mg/kg no alimento de truta arco-íris juvenis por dois meses não influenciou seu crescimento nem as características hematológicas (RAMSDEN *et al.*, 2009).

1.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS E METAIS

A absorção de metais é mediada por transportadores de íons na membrana biológica (BURY *et al.*, 2003; HANDY e EDDY, 2004; BURY e HANDY, 2010), enquanto que o mecanismo utilizado para a captação de nanopartículas provavelmente é a endocitose, por serem partículas de maior tamanho (CAMPBELL e STOKES, 1985; CAMPBELL, 1995 ; ESCHER e SIGG, 2004).

Há evidências que nanopartículas podem carrear metais, ou seja, quando ocorre associação entre nanopartículas e metais, estes tem a capacidade de adsorção à superfície de algumas nanopartículas (HANDY *et al.*, 2008).

Estudos com *Cyprinus carpio* demonstram que a acumulação de cádmio em vísceras aumentou 146% (ZHANG *et al.*, 2007) e de arsênio aumentou 44% (SUN *et al.*, 2009) na presença de NPTiO₂ após 25 dias de exposição via hídrica.

2 OBJETIVO GERAL

Através da utilização do bioindicador *Rhamdia quelen* e da contaminação via injeção intraperitoneal, avaliar os efeitos tóxicos das nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂), do chumbo inorgânico (PbII) e da associação da nanopartícula com o metal.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar através de bioensaio agudo de 96h com única injeção intraperitoneal de 5ng/g, 50ng/g e 500ng/g de NPTiO₂, de 21µg/g de PbII e da associação entre NPTiO₂ e PbII:

- A citotoxicidade e a genotoxicidade em eritrócitos através do teste de alterações morfológicas nucleares, do ensaio de difusão do DNA e do ensaio cometa.
- A quantidade de chumbo no tecidos hepático de *Rhamdia quelen* com e sem associação às NPTiO₂.
- A quantidade de metalotioneína (MT) em tecido hepático.
- A atividade enzimática da superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase em tecido hepático, para verificar danos oxidativos.
- A citotoxicidade e a genotoxicidade em tecido hepático através do ensaio de difusão do DNA e do ensaio cometa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE NPTiO₂ E PbII

As NPTiO₂ anatase (Sigma-Aldrich®) foram diluídas em água destilada, nas concentrações 0,5mg/L; 5mg/L e 50mg/L. Posteriormente, estas soluções foram homogeneizadas em banho-maria com ultra som (sonicadas) na frequência de 40 Hz por um período de 6 horas. E, antes de aplicar a injeção intraperitoneal nos peixes, as soluções foram novamente sonicadas, por 30 minutos, na frequência de 80 Hz, para garantir a desagregação das nanopartículas.

O PbII (Vetec®) foi diluído em água destilada, na concentração de 2,1g/L.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DE NPTiO₂

A NPTiO₂ apresenta-se na forma de pó, com coloração branca. Apresentou tamanho médio de dispersão de 45nm e partículas agregadas com 107nm de tamanho (FIGURA 1A). A morfologia dos agregados de nanopartículas foi obtida através de microscopia eletrônica de transmissão (FIGURA 1B). A NPTiO₂ apresenta-se na forma de anatase, com uma concentração de 28,42% de Ti e 71,58% de O₂.

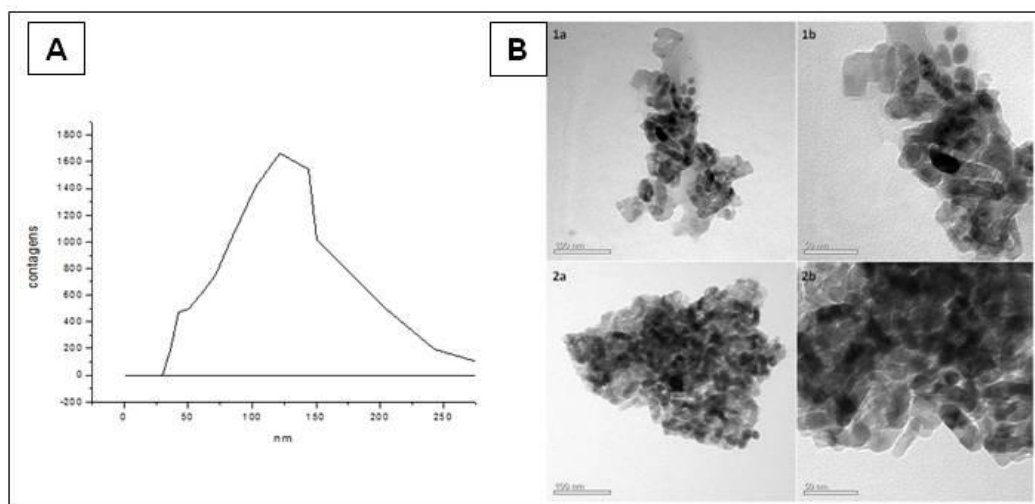


FIGURA 1.: Caracterização da Nanopartícula de Dióxido de Titânio. (A) Gráfico com informações sobre o tamanho médio de NPTiO₂ em pó. (B) Eletromicrografias de NPTiO₂: “1a” e “2a” em escala de 100nm e em “1b” e “2b” em escala de 50nm;

3.3 ACLIMATAÇÃO DE *Rhamdia quelen*

Foram obtidos 140 exemplares de *Rhamdia quelen* em piscicultura sem histórico de contaminação. Estes permaneceram em tanques de 250 litros durante 60 dias. Nos 5 dias iniciais os peixes ficaram à temperatura de 32°C, aproximadamente, e foi adicionado à água cloreto de sódio (5g/L) (SOUZA-BASTOS e FREIRE, 2009), para evitar a infestação por parasitas oportunistas. Posteriormente, a temperatura foi mantida em 27°C, e sem a adição de cloreto de sódio, até que os animais não demonstrassem estresse, sendo possível nesta espécie observar através da coloração, que em situações favoráveis apresentam manchas escuras ao longo do corpo (FIGURA 2). Nas duas últimas semanas antes da contaminação, a temperatura da água foi diminuída gradualmente, até que os animais conseguissem permanecer em temperatura ambiente, sem demonstrar estresse.



FIGURA 2.: Exemplar de *Rhamdia quelen*. Fonte: A autora.

3.4 CONTAMINAÇÃO DOS PEIXES

Depois da aplicação, os peixes (em número de 3 ou 4) foram colocados em caixas de 20L (FIGURA 3B) com aeração constante e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Os exemplares receberam uma injeção intraperitoneal e foram sacrificados após 96 horas (FIGURA 3A). Antes da injeção cada peixe foi anestesiado e pesado, para calcular a quantidade de contaminante a ser aplicado e minimizar o estresse da manipulação.

Um total de 135 peixes foi separado em 10 grupos: [1] controle negativo com uma injeção de água destilada (Controle 1); [2] controle negativo com duas injeções de água destilada (Controle 2); [3] controle positivo com Metil Metano Sulfonato na concentração de 0,5 µg/g (MMS); [4] uma injeção intraperitoneal de 5ng/g de NPTiO₂ (5NP); [5] uma injeção intraperitoneal de 50ng/g de NPTiO₂ (50NP); [6] uma injeção intraperitoneal de 500ng/g de NPTiO₂ (500NP); [7] uma injeção intraperitoneal de 21µg/g de PbII (Pb), [8] uma injeção intraperitoneal de 5ng/g de NPTiO₂ e imediatamente depois uma outra injeção intraperitoneal de 21µg/g de PbII (Pb+5NP); [9] uma injeção intraperitoneal de 50ng/g de NPTiO₂ e imediatamente depois uma outra injeção intraperitoneal de 21µg/g de PbII (Pb+50NP); [10] uma injeção intraperitoneal de 500ng/g de NPTiO₂ e imediatamente depois uma outra injeção intraperitoneal de 21µg/g de PbII (Pb+500NP).

O controle negativo com duas injeções intraperitoneais de água destilada foi realizado para comparação com os grupos que receberam a associação dos contaminantes: 5ng/g de NPTiO₂ + 21µg/g de PbII; 50ng/g de NPTiO₂ + 21µg/g de PbII; e 500ng/g de NPTiO₂ + 21µg/g de PbII, que receberam duas injeções.

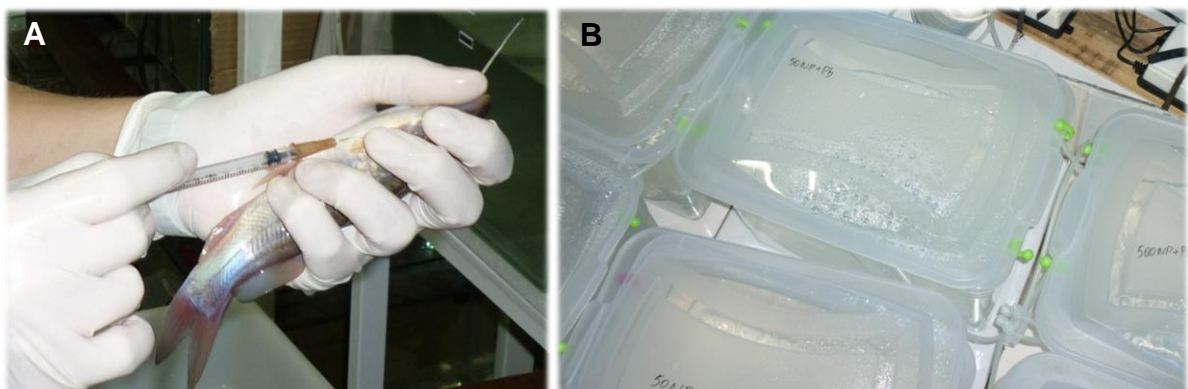


FIGURA 3.: Contaminação dos peixes. (A) Injeção intraperitoneal em *Rhamdia quelen*. (B) Caixas de confinamentos dos peixes contaminados. Fonte: A autora.

3.5 COLETA DAS AMOSTRAS

Ao final das 96 horas, cada exemplar de jundiá foi anestesiado com benzocaina a 20% (GONTIJO *et al.*, 2003), e em seguida pesados, medidos e sexados.

Foi retirada uma amostra de sangue da veia caudal com seringa heparinizada, para a realização do teste de micronúcleo pisco e alterações morfológicas nucleares, do ensaio cometa e ensaio de difusão (FIGURA 4). As amostras de sangue foram mantidas em soro bovino fetal, refrigeradas a 4°C em ausência de luz.

Em seguida, foi feita uma incisão a partir do poro urogenital até aproximadamente à nadadeira peitoral para a retirada do fígado, que foi separado em porções para a realização da quantificação de chumbo, análises bioquímicas, ensaio cometa e ensaio de difusão. Para a análise química de quantificação de chumbo as amostras foram refrigeradas a -20°C, para a análise bioquímica a -80°C, e para o ensaio cometa e o ensaio de difusão as amostras foram colocadas em soro bovino fetal e refrigeradas a 4°C com ausência de luz.

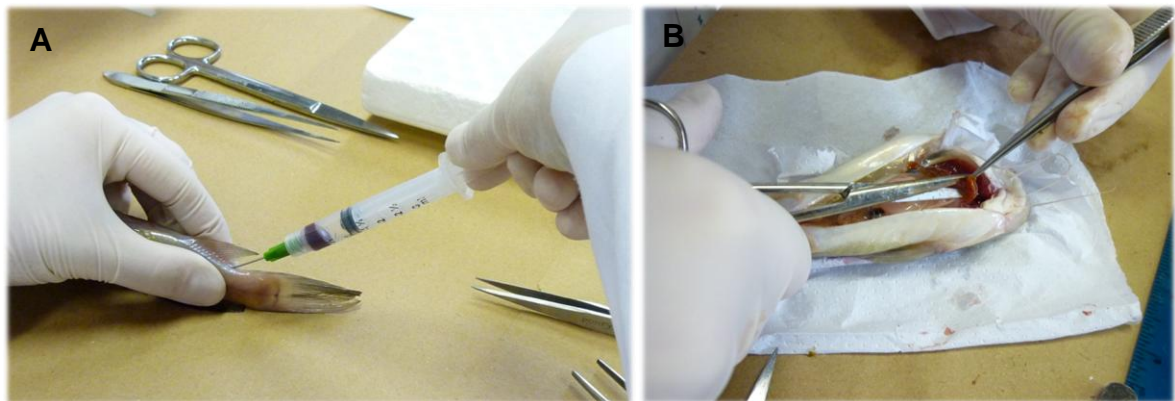


FIGURA 4.: Coleta das amostras. (A) Coleta de sangue da veia caudal. (B) Coleta do fígado. *Fonte: A autora.*

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO EM TECIDO HEPÁTICO

A análise química para a quantificação de chumbo em tecido hepático foi realizada no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (CEPPA-UFPR), através de Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma de Argônio Indutivamente Acoplado (ICP-OES). Devido a quantidade de

tecido necessária para as quantificações (5 gramas), foram feitos *pools* dos peixes pertencentes aos tratamentos controle negativo, 21µg/g de PbII, 5ng/g de NPTiO₂ + 21µg/g de PbII, 50ng/g de NPTiO₂ + 21µg/g de PbII e de 500ng/g de NPTiO₂ + 21µg/g de PbII.

3.7 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

A análise bioquímica em tecido hepático (quantificação de MT, atividade das enzimas SOD, CAT e GST) foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Ambiental, no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

3.7.1 QUANTIFICAÇÃO DE METALOTIONEÍNA

Para a quantificação da MT foi utilizado o método segundo Viarengo *et al.* (1997), adaptado para tecidos de peixes. Este método consiste no monitoramento fotométrico da reação de ELLMAN *et al.* (1961), ocorrida entre as sulfidrilas das MTs e o DTNB. As MTs são purificadas numa extração fracionada a partir do sobrenadante do homogenato tecidual, que após tratado com etanol e clorofórmio sofre adição de HCl para precipitação das proteínas. O precipitado é então centrifugado e lavado para remoção de moléculas de baixa massa que contenham sulfidrilas (-SH).

O método é indireto, pois obtém a concentração de grupamentos sulfidrilas nos tecidos, ao invés de aferir a quantidade absoluta de MTs presente nas amostras.

3.7.2 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO-DISMUTASE

Para a análise da atividade da SOD foi utilizado o método segundo Crouch *et al.* (1981). O princípio da técnica é a inibição da redução do nitrobluetetrazólio (NBT) para azul pela SOD, através do O₂⁻ gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, sendo esta redução medida espectrofotometricamente, a 560 nm, em espectrofotômetro SYNERGY HT.

Na microplaca foram pipetados 20µl de cada amostra (com 25% de etanol), seguidos de 70µl da solução de NBT e 110µl de tampão carbonato de sódio (182

mM, pH 10,2) com hidroxilamina 67mM. A atividade foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$.

3.7.3 ATIVIDADE DA CATALASE

A atividade da catalase foi avaliada segundo o método proposto por Aebi (1984). A técnica mede o consumo do peróxido de hidrogênio exógeno pela catalase, gerando oxigênio e água, podendo ser mensurado por espectrofotometria.

As amostras de fígado foram descongeladas e diluídas na proporção de 1:5 (ou 5% V/V) em tampão fosfato 0,1M; pH 7,2. Em cubetas de quartzo foram pipetados 990 μl de solução reação (Tampão Tris 1M / EDTA 5 mM pH 8,0, peróxido de hidrogênio 20 mM e água MilliQ), seguido de 10 μl de amostra. Foi monitorada a absorbância de três réplicas para cada amostra, em espectrofotômetro ULTROSPECT 4300 PRO, com comprimento de onda a 240nm, por 1 minuto e 30 segundos. A atividade foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$.

3.7.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

As amostras de fígado foram descongeladas e diluídas na proporção 1:10 (V/V) em tampão fosfato 0,1M; pH 6,5. Em microplaca foram pipetados 20 μl de amostra, em 4 réplicas, seguido de 180 μl da solução reação, composta por CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 3,0 mM e GSH (glutaciona reduzida) 3,0 mM.

O método foi proposto por Keen *et al.* (1976), e seu princípio é a conjugação do CDNB com a GSH pela ação da GST, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância. A leitura foi feita em espectrofotômetro SYNERGY HT, a 340 nm e a atividade foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$.

3.8 BIOMARCADORES GENÉTICOS

3.8.1 ENSAIO COMETA

A técnica utilizada para o Ensaio Cometa foi descrita por Speit e Hartmann (1995) com modificações segundo Ferraro *et al.* (2004) e Cestari *et al.*, 2004 para

células eritrocitárias e segundo Ramsdorf *et al.* (2009a) para as células do tecido renal. Para o ensaio cometa com eritrócitos, 10µl de sangue foi misturado a 1ml de soro bovino fetal, enquanto que para realizar o ensaio cometa com células do fígado, aproximadamente 3mm³ do órgão foi acondicionado em um eppendorf com 1ml de soro bovino fetal. Em seguida tecido hepático foi homogeneizado a 1500 rpm (Tecnal – TE-103). Segundo Ramsdorf *et al.* (2009b), o soro bovino fetal é a solução mais adequada para manter a viabilidade celular por até 48 horas e este tipo de homogeneização de tecidos também foi realizado por Ghisi *et al.* (2011), Benincá *et al.* (2012) e Ramsdorf *et al.* (2012). A confecção das lâminas para os dois tecidos seguiu os mesmos procedimentos de Ramsdorf *et al.* (2009a). Onde, foram misturados 40µl de suspensão celular com 120µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMP). O processo segue conforme autores acima citados. As lâminas foram coradas com 20% de brometo de etídio e os 100 nucleóides de cada lâmina foram classificados visualmente, segundo Collins (1997), em um microscópio de epifluorescência Leica, com danos variando de 0 (sem dano aparente) a 4 (dano máximo) (FIGURA 5).

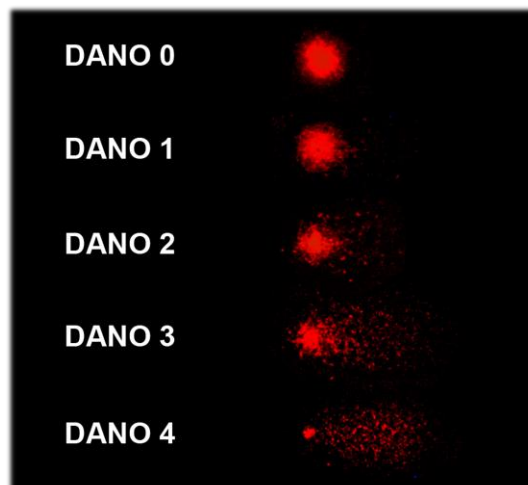


FIGURA 5.: Nucleóides com danos de 0 a 4 detectados através do ensaio cometa. *Fonte: A autora.*

3.8.2 ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA

O ensaio de difusão do DNA foi realizado de acordo com Sestili *et al.* (2006), sendo esta uma técnica modificada do ensaio cometa. As lâminas foram confeccionadas da mesma forma do ensaio cometa, porém não foi realizado o processo de eletroforese, e apenas permaneceram em tampão alcalino por 10

minutos. As lâminas foram coradas com brometo de etídeo, e foram contabilizados 100 nucleóides por exemplar em microscópio de epifluorescência Leica.

Para o ensaio de difusão de DNA em sangue e tecido hepático os nucleóides foram categorizados como “normal”, quando não havia extensão de fragmentos de DNA; “apoptose”, quando havia extensão circular de fragmentos de DNA; e “necrose” quando havia um espaço vazio entre o centro do nucleóide e a extensão de fragmentos de DNA (FIGURA 6).

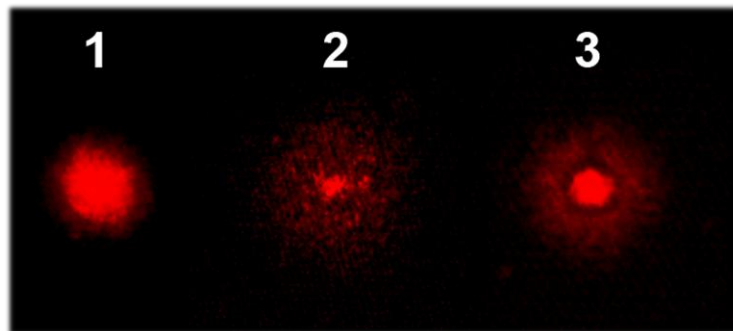


FIGURA 6.: Nucleóides detectados através do ensaio de difusão do DNA. (1) célula normal; (2) célula apoptótica; e (3) célula necrótica. *Fonte: A autora.*

3.8.3 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES

O teste do micronúcleo písceo (MN) e de alterações morfológicas nucleares (AMN) com coloração fluorescente de laranja de acridina (LA) foram realizados de acordo com a técnica descrita por Ueada *et al.* (1992), no entanto, foi utilizada a mesma diluição de sangue e soro bovino fetal preparada para o ensaio cometa. Para cada peixe, foram analisadas 1000 células, sob microscopia de epifluorescência com magnificação de 1000X, sendo avaliada a presença de MN e AMN em eritrócitos e maduros (normocromáticos), pois não foram encontrados eritrócitos imaturos (policromáticos). As AMN foram classificadas de acordo com Carrasco *et al.* (1990).

As técnicas de ensaio cometa, ensaio difusão do DNA e teste do micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares estão descritas detalhadamente nos anexos.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística os tratamentos foram separados em seis grupos: (A) Controle 1, Pb e MMS; (B) Controle 1, 5NP, 50NP, 500NP e MMS; (C) Controle 2, Pb+5NP, Pb+50NP, Pb+500NP e MMS; (D) Pb, Pb+5NP, 5NP e MMS; (E) Pb, Pb+50NP, 50NP e MMS; (F) Pb, Pb+500NP, 500NP e MMS.

Em todos os grupos foi analisada a normalidade dos dados através do teste de Kolmogorov-Smirnov, para determinar a utilização de teste paramétrico ou não-paramétrico.

Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar se havia diferença entre os tratamentos dentro de cada grupo, seguida do teste de Student-Newman-Keuls para comparação entre os tratamentos nas análises do teste de micronúcleo pisco e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos, do ensaio cometa e do ensaio de difusão de fígado e sangue.

O teste paramétrico ANOVA de uma via foi utilizado para determinar se havia diferença entre os tratamentos dentro de cada grupo, seguida do teste *t* (LSD) para comparação entre os tratamentos na análise química do fígado e da análise bioquímica. Nestes grupos não foram utilizados os dados do tratamento com MMS. Este teste também foi utilizado para a frequência de AMN em eritrócitos maduros, quando os dados se mostraram com distribuição normal. Os resultados da análise química de quantificação de chumbo são pseudo-réplica, utilizando este teste estatístico como parâmetro de comparação com os resultados das outras análises.

Consideraram-se valores de $p < 0,05$ como significantes.

4 RESULTADOS

Foram utilizados no experimento 135 exemplares de *Rhamdia quelen* (66 fêmeas e 69 machos), que tiveram peso médio de $31,33 \pm 10,37$ (média \pm desvio padrão) e tamanho médio de $16,29 \pm 1,74$ (média \pm desvio padrão).

4.1 DANOS EM ERITRÓCITOS DE *Rhamdia quelen*

4.1.1 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES

No teste de micronúcleo písceo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN), utilizando coloração com laranja de acridina, dentre os 1000 eritrócitos analisados de cada exemplar, não foram encontrados eritrócitos imaturos. Em eritrócitos maduros somente foram encontradas AMN (Figura 7), e estas do tipo vacuolated (Figura 7B), notched (Figura 7C) e blebbed (Figura 7D).

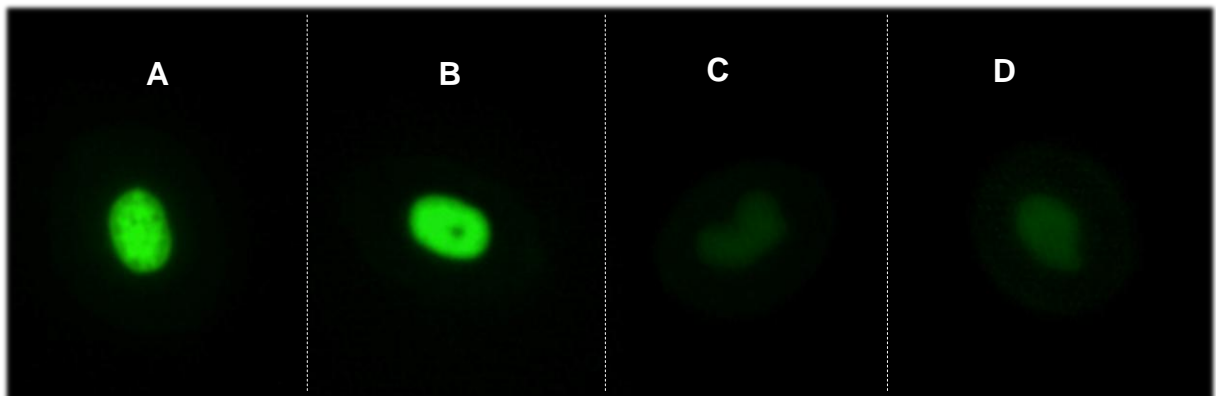


Figura 7.: Alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Rhamdia quelen*. (A) eritrócito sem alteração; (B) eritrócito com AMN do tipo vacuolated; (C) eritrócito com AMN do tipo notched; (D) eritrócito com AMN do tipo blebbed. Fonte: A autora.

Em relação aos tipos de AMN encontradas, somente vacuolated apresentou diferença entre a maioria dos tratamentos, sendo que notched e blebbed não apresentaram frequências significativamente diferentes ($p > 0,05$).

4.1.1.1 FREQUÊNCIA DE VACUOLATED

Não houve diferença na frequência de AMN do tipo vacuolated entre controle negativo e grupo tratado com PbII ($p > 0,05$), e somente este apresentou diferença em relação ao tratamento MMS ($p = 0,0144$) (Tabela 1A).

A dose de 5ng/g de NPTiO₂ apresentou frequência maior de AMN do tipo vacuolated, diferindo do controle negativo ($p = 0,0058$), e houve diferença desta dose em relação às doses de 50ng/g e 500ng/g de NPTiO₂ ($p = 0,028$ e $p = 0,0175$; respectivamente), sendo que estas doses apresentaram frequências menores de vacuolated, não apresentando diferença em relação ao controle negativo e positivo ($p > 0,05$) (Tabela 1B).

A frequência de vacuolated foi menor nos tratamentos associados de PbII com 50ng/g e 500ng/g, em relação ao controle negativo ($p = 0,0093$ e $p = 0,0021$; respectivamente). Já o tratamento associado de PbII e 5ng/g de NPTiO₂ não apresentou diferença em relação ao controle negativo, tratamentos associados com PbII+50ng/g e 500ng/g de NPTiO₂, e controle positivo ($p > 0,05$) (Tabela 1C).

A dose de 5ng/g de NPTiO₂ teve frequência maior de vacuolated que o tratamento PbII ($p = 0,0019$), porém não diferiu do tratamento de associação entre PbII e NPTiO₂ na mesma dose ($p > 0,05$). E o PbII também não apresentou diferença em relação ao grupo de associação ($p > 0,05$) (Tabela 1D).

A comparação entre 50 ng/g de NPTiO₂, PbII e a associação entre estes não apresentou diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 1E).

E na comparação entre 500ng/g de NPTiO₂, PbII, e a associação entre estes, apenas o PbII e o tratamento associado apresentou diferença em relação ao controle positivo ($p = 0,0208$ e $p = 0,0061$; respectivamente), sendo que a frequência de vacuolated na dose de 500ng/g de NPTiO₂ não diferiu estatisticamente dos tratamentos PbII, PbII+500ng/g de NPTiO₂ e MMS ($p > 0,05$) (Tabela 1F).

4.1.1.2 FREQUÊNCIA TOTAL DE AMN

Considerando a frequência total de AMN, não houve diferença entre os tratamentos PbII e controle negativo ($p > 0,05$), havendo diferença somente do controle positivo (com frequência maior) em relação ao controle negativo e ao tratamento PbII ($p = 0,0093$ e $p = 0,0085$; respectivamente) (Tabela 1A).

A dose de 5ng/g de NPTiO₂ apresentou frequência maior de AMN totais, quando comparada ao controle negativo ($p = 0,0046$) e aos tratamentos 50ng/g e 500ng/g de NPTiO₂ ($p = 0,0169$ e $p = 0,0121$; respectivamente), e não diferiu do tratamento com MMS. As duas doses maiores de NPTiO₂ (50ng/g e 500ng/g) apresentaram menor frequência de AMN, não diferindo do controle negativo ($p > 0,05$) (Tabela 1B).

Os tratamentos de associação entre PbII e 50ng/g e 500ng/g de NPTiO₂ apresentaram menor frequência de AMN totais em relação ao controle negativo ($p = 0,0333$ e $p = 0,0106$; respectivamente). A associação entre PbII e 5ng/g de NPTiO₂ não diferiu do controle ($p > 0,05$). E não houve diferença comparando os grupos tratados entre si ($p > 0,05$) (Tabela 1C).

Comparando a dose de 5ng/g de NPTiO₂ com a associação desta dose com PbII e com somente PbII, foi observada frequência maior de AMN totais na dose de NPTiO₂ isolada em relação ao PbII ($p = 0,0064$). Não houve diferença entre o grupo associado de PbII e NPTiO₂ tanto com o tratamento de 5ng/g de NPTiO₂ e o tratamento com PbII ($p > 0,05$) (Tabela 1D).

Entre os tratamentos com 50ng/g de NPTiO₂, PbII e associação entre estes, somente houve diferença destes com o controle positivo, que apresentou frequência maior de AMN ($p = 0,0383$; $p = 0,0144$ e $p = 0,0122$; respectivamente) (Tabela 1E). O mesmo ocorreu na comparação entre 500ng/g de NPTiO₂, PbII e associação entre estes ($p = 0,0212$; $p = 0,0099$ e $p = 0,0009$; respectivamente) (Tabela 1F).

TABELA 1.: Frequência média de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos maduros de *Rhamdia quelen*, separadas entre vacuolated, notched, blebbed e AMN totais. Comparação entre os tratamentos (Controle 1, Controle 2, Pb, 5NP, 50NP, 500NP, Pb+5NP, Pb+50NP, Pb+500NP e MMS) dentro de cada grupo (A, B, C, D, E e F). Valores expressos em média e erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Frequência de AMN em eritrócitos maduros (Média ± Erro Padrão)					
Tratamentos	Vacuolated	Notched	Blebbed	Total AMN	
A	Controle 1	0,0018 ± 0,0004 ^a	0,0013 ± 0,0004	0,0006 ± 0,0003	0,0034 ± 0,0006 ^a
	Pb	0,0016 ± 0,0007 ^a	0,0014 ± 0,0004	0,0006 ± 0,0003	0,0038 ± 0,0011 ^a
	MMS	0,0040 ± 0,0009 ^b	0,0025 ± 0,0007	0,0010 ± 0,0003	0,0090 ± 0,0016 ^b
B	Controle 1	0,0018 ± 0,0004 ^a	0,0013 ± 0,0004	0,0006 ± 0,0003	0,0034 ± 0,0006 ^a
	5NP	0,0053 ± 0,0008 ^b	0,0025 ± 0,0007	0,0008 ± 0,0003	0,0087 ± 0,0013 ^b
	50NP	0,0031 ± 0,0010 ^a	0,0010 ± 0,0004	0,0005 ± 0,0002	0,0045 ± 0,0012 ^a
	500NP	0,0023 ± 0,0006 ^a	0,0010 ± 0,0002	0,0005 ± 0,0002	0,0038 ± 0,0006 ^a
	MMS	0,0040 ± 0,0009 ^{ab}	0,0025 ± 0,0007	0,0010 ± 0,0003	0,0090 ± 0,0016 ^b
C	Controle 2	0,0051 ± 0,0011 ^a	0,0022 ± 0,0007	0,0003 ± 0,0002	0,0077 ± 0,0014 ^a
	Pb + 5NP	0,0032 ± 0,0009 ^{ab}	0,0017 ± 0,0004	0,0006 ± 0,0004	0,0055 ± 0,0012 ^{ab}
	Pb + 50NP	0,0014 ± 0,0005 ^b	0,0016 ± 0,0007	0,0005 ± 0,0004	0,0037 ± 0,0015 ^b
	Pb + 500NP	0,0010 ± 0,0004 ^b	0,0010 ± 0,0005	0,0005 ± 0,0002	0,0025 ± 0,0007 ^b
	MMS	0,0040 ± 0,0009 ^{ac}	0,0025 ± 0,0007	0,0010 ± 0,0003	0,0090 ± 0,0016 ^a
D	Pb	0,0016 ± 0,0007 ^a	0,0014 ± 0,0004	0,0006 ± 0,0003	0,0038 ± 0,0011 ^a
	Pb + 5NP	0,0032 ± 0,0009 ^{ab}	0,0017 ± 0,0004	0,0006 ± 0,0004	0,0055 ± 0,0012 ^{ab}
	5NP	0,0053 ± 0,0008 ^b	0,0025 ± 0,0007	0,0008 ± 0,0003	0,0087 ± 0,0013 ^b
	MMS	0,0040 ± 0,0009 ^b	0,0025 ± 0,0007	0,0010 ± 0,0003	0,0090 ± 0,0016 ^b
E	Pb	0,0016 ± 0,0007	0,0014 ± 0,0004	0,0006 ± 0,0003	0,0038 ± 0,0011 ^a
	Pb + 50NP	0,0014 ± 0,0005	0,0016 ± 0,0007	0,0005 ± 0,0004	0,0037 ± 0,0015 ^a
	50NP	0,0031 ± 0,0010	0,0010 ± 0,0004	0,0005 ± 0,0002	0,0045 ± 0,0012 ^a
	MMS	0,0040 ± 0,0009	0,0025 ± 0,0007	0,0010 ± 0,0003	0,0090 ± 0,0016 ^b
F	Pb	0,0016 ± 0,0007 ^a	0,0014 ± 0,0004	0,0006 ± 0,0003	0,0038 ± 0,0011 ^a
	Pb + 500NP	0,0010 ± 0,0004 ^a	0,0010 ± 0,0005	0,0005 ± 0,0002	0,0025 ± 0,0007 ^a
	500NP	0,0023 ± 0,0006 ^{ab}	0,0010 ± 0,0002	0,0005 ± 0,0002	0,0038 ± 0,0006 ^a
	MMS	0,0040 ± 0,0009 ^b	0,0025 ± 0,0007	0,0010 ± 0,0003	0,0090 ± 0,0016 ^b

Tratamentos: Controle 1 = uma injeção intraperitoneal com água destilada; Controle 2 = duas injeções intraperitoneais com água destilada; Pb = 21µg/g de PbII; 5NP = 5ng/g de NPTiO₂; 50NP = 50ng/g de NPTiO₂; 500NP = 500ng/g de NPTiO₂; Pb+5NP = 21µg/g de PbII + 5ng/g de NPTiO₂; Pb+50NP = 21µg/g de PbII + 50ng/g de NPTiO₂; Pb+500NP = 21µg/g de PbII + 500ng/g de NPTiO₂ e MMS como controle positivo.

4.1.2 ENSAIO COMETA

Através do ensaio cometa em tecido sanguíneo, foi possível observar danos ao material genético no tratamento com PbII em relação ao controle negativo ($p = 0,0293$), e não demonstrou diferença quando comparado com o tratamento de MMS ($p > 0,05$) (Figura 8A).

A dose de 5ng/g de NPTiO₂ demonstrou causar danos quando comparada com o controle negativo ($p = 0,0093$), e também apresentou diferença em relação às doses de 50ng/g e 500ng/g de NPTiO₂ ($p = 0,0004$ e $p = 0,0058$; respectivamente). Os danos na dose de 5 ng/g de NPTiO₂ foram elevados, não havendo diferença em relação ao controle positivo com MMS ($p > 0,05$). Os tratamentos com 50ng/g e 500ng/g de NPTiO₂ apresentaram menores danos ao DNA de tecido sanguíneo, mostrando diferença em relação ao tratamento com MMS ($p = 0,0018$ e $p = 0,0124$; respectivamente) (Figura 8B).

Quando as doses de 5ng/g, 50ng/g e 500ng/g de NPTiO₂ associadas ao PbII foram comparadas com o controle negativo, não foi observada diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Figura 8C).

Os tratamentos PbII, 5ng/g de NPTiO₂ e associação de PbII+5ng/g de NPTiO₂ não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$) (Figura 8D).

Foi observado maior dano ao DNA na associação entre PbII e 50ng/g de NPTiO₂, quando comparadas com a NPTiO₂ na mesma dose ($p = 0,0127$), porém a associação não apresentou diferença em relação ao tratamento somente com PbII ($p > 0,05$) (Figura 8E).

A comparação entre o tratamento PbII e associação de PbII+500ng/g de NPTiO₂ não apresentou diferença ($p > 0,05$), somente houve diferença entre PbII e a dose de 500ng/g de NPTiO₂ ($p = 0,0073$), sendo que esta apresentou menores danos ao DNA (Figura 8F).

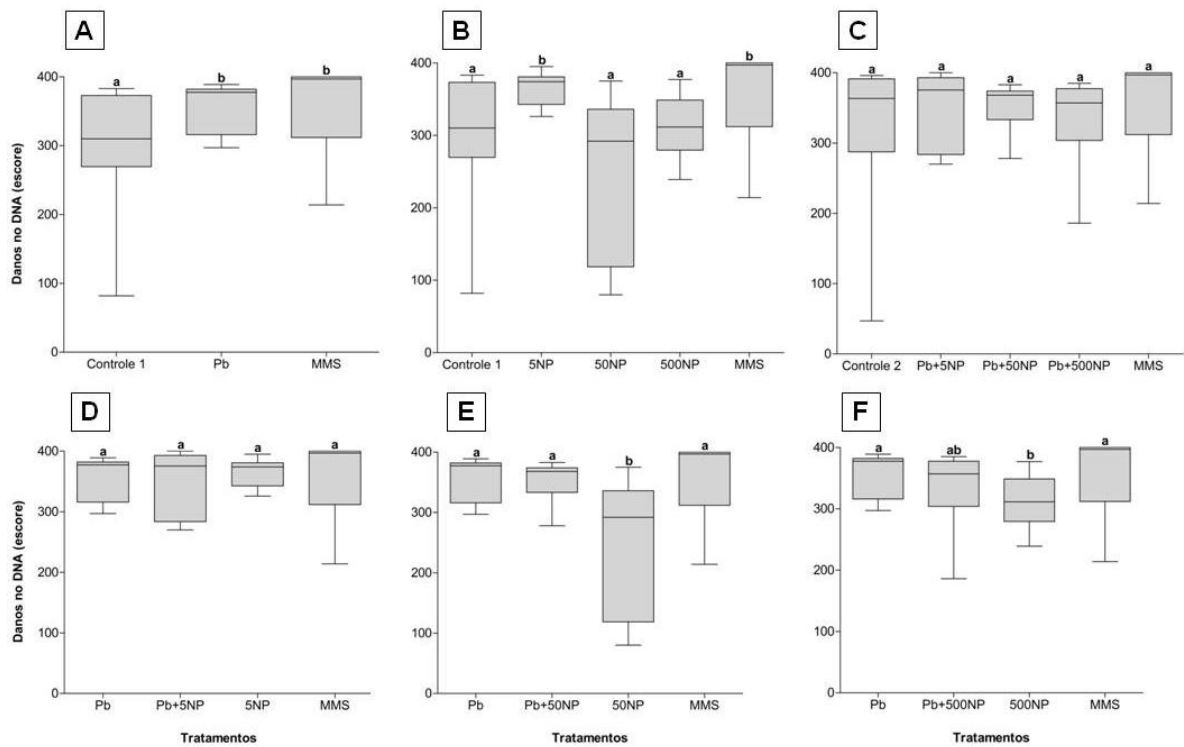


FIGURA 8.: Danos ao DNA de eritrócitos em *Rhamdia quelen*, detectados por ensaio cometa. Comparação entre os tratamentos (Controle 1, Controle 2, Pb, 5NP, 50NP, 500NP, Pb+5NP, Pb+50NP, Pb+500NP e MMS) dentro de cada grupo (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Tratamentos: Controle 1 = uma injeção intraperitoneal com água destilada; Controle 2 = duas injeções intraperitoneais com água destilada; Pb = 21µg/g de PbII; 5NP = 5ng/g de NPTiO₂; 50NP = 50ng/g de NPTiO₂; 500NP = 500ng/g de NPTiO₂; Pb+5NP = 21µg/g de PbII + 5ng/g de NPTiO₂; Pb+50NP = 21µg/g de PbII + 50ng/g de NPTiO₂; Pb+500NP = 21µg/g de PbII + 500ng/g de NPTiO₂ e MMS como controle positivo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

4.1.3 ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA

O processo de apoptose, detectado por ensaio de difusão do DNA, no tratamento com PbII não apresentou diferença em relação ao controle negativo ($p > 0,05$), sendo diferente somente em relação ao controle positivo com MMS ($p = 0,0072$), que obteve maior percentual de apoptose, também diferindo do controle negativo ($p = 0,0038$) (Figura 9A).

A dose de 5ng/g de NPTiO₂ não apresentou diferença em relação ao controle negativo quanto à porcentagem de apoptose ($p > 0,05$), esta apenas diferiu dos grupos tratados com 50ng/g e 500ng/g ($p = 0,0021$ e $p = 0,0031$; respectivamente), que apresentaram percentual menor de apoptose (Figura 9B).

Os tratamentos de associação entre PbII com 5ng/g, 50ng/g e 500ng/g de NPTiO₂ não diferiram do controle negativo ($p > 0,05$). Porém, quando comparadas entre si, foi possível observar maior percentual de apoptose no tratamento de associação entre PbII e 5ng/g de NPTiO₂, apresentando diferença com o tratamento PbII e 50ng/g de NPTiO₂ ($p = 0,0147$), mas estas doses não apresentaram diferença em relação ao tratamento com PbII e 500ng/g de NPTiO₂ ($p > 0,05$) (Figura 9C).

Houve maior percentual de apoptose no tratamento associado de PbII com 5ng/g de NPTiO₂, quando comparado com o tratamento que recebeu somente injeção com PbII ($p = 0,0346$). Mas não houve diferença entre o tratamento de associação e somente NPTiO₂ na mesma dose ($p > 0,05$). Tanto o tratamento associado, quanto o tratamento somente com a dose de 5ng/g de NPTiO₂ não apresentaram diferença em relação ao controle positivo com MMS ($p > 0,05$) (Figura 9D).

O PbII apresentou maior percentual de apoptose quando comparado com a dose de 50ng/g de NPTiO₂ ($p = 0,036$), porém, não houve diferença em relação ao grupo associado na mesma dose ($p > 0,05$) (Figura 9E).

A associação de PbII e 500ng/g de NPTiO₂ apresentou porcentagem maior de apoptose quando comparada somente com a dose de 500ng/g de NPTiO₂ ($p = 0,0084$), mas não diferiu do tratamento somente com PbII ($p > 0,05$) (Figura 9F).

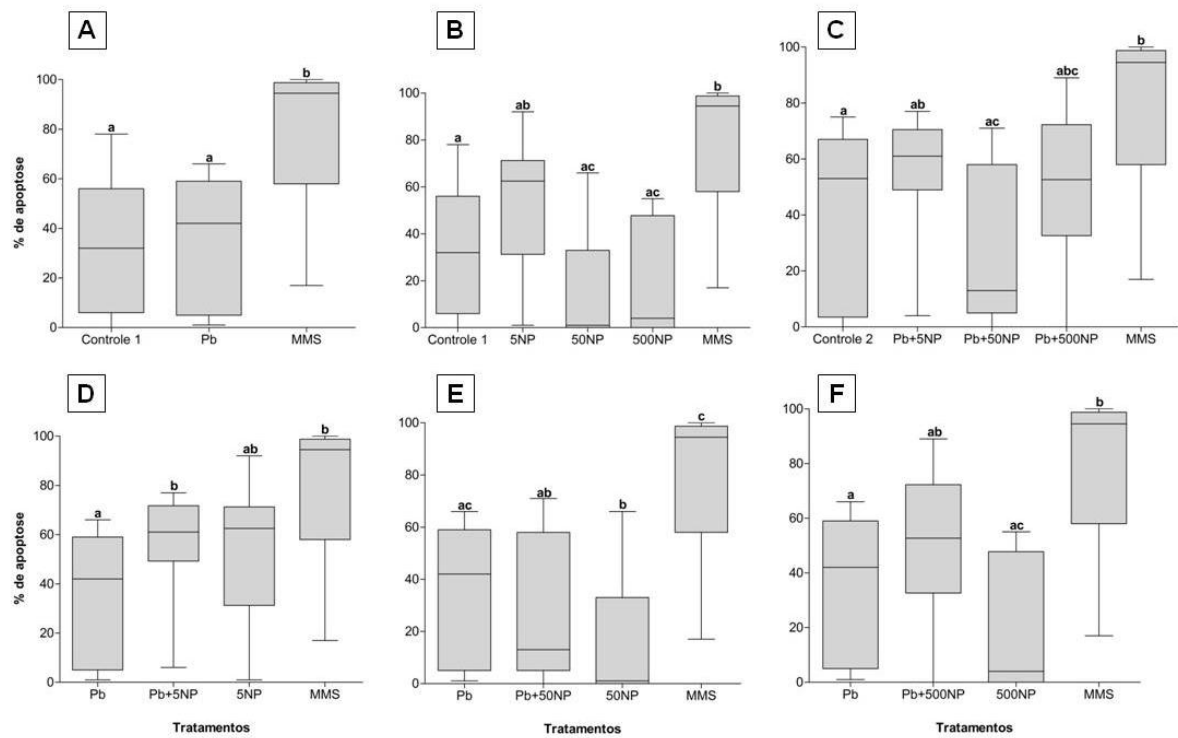


FIGURA 9.: Porcentagem de apoptose em eritrócitos de *Rhamdia quelen*, detectada por ensaio de difusão de DNA. Comparação entre os tratamentos (Controle 1, Controle 2, Pb, 5NP, 50NP, 500NP, Pb+5NP, Pb+50NP, Pb+500NP e MMS) dentro de cada grupo (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Tratamentos: Controle 1 = uma injeção intraperitoneal com água destilada; Controle 2 = duas injeções intraperitoneais com água destilada; Pb = 21 μ g/g de PbII; 5NP = 5ng/g de NPTiO₂; 50NP = 50ng/g de NPTiO₂; 500NP = 500ng/g de NPTiO₂; Pb+5NP = 21 μ g/g de PbII + 5ng/g de NPTiO₂; Pb+50NP = 21 μ g/g de PbII + 50ng/g de NPTiO₂; Pb+500NP = 21 μ g/g de PbII + 500ng/g de NPTiO₂ e MMS como controle positivo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

4.2 DANOS EM TECIDO HEPÁTICO DE *Rhamdia quelen*

4.2.1 QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO

A análise química demonstrou que em relação ao controle negativo, todos os tratamentos com PbII (somente PbII e associação entre PbII e as doses de 5ng/g, 50ng/g e 500ng/g de NPTiO₂) apresentaram diferença ($p < 0,001$; $p = 0,0041$; $p < 0,001$ e $p = 0,0015$; respectivamente), mostrando que houve absorção de chumbo no tecido hepático.

Na comparação entre os tratamentos, os que receberam injeção somente com PbII e associação entre PbII e 50ng/g de NPTiO₂ tiveram maiores concentrações de chumbo no tecido hepático, não havendo diferença entre eles ($p > 0,05$), mas com diferença em relação ao grupo de associação entre PbII e 5ng/g de NPTiO₂ ($p < 0,001$ e $p = 0,0038$; respectivamente) e PbII e 500ng/g de NPTiO₂ ($p = 0,0014$ e $p = 0,0112$; respectivamente). Os grupos de associação entre PbII e 5ng/g de NPTiO₂ e entre PbII e 500ng/g de NPTiO₂ não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$) (Figura 10).

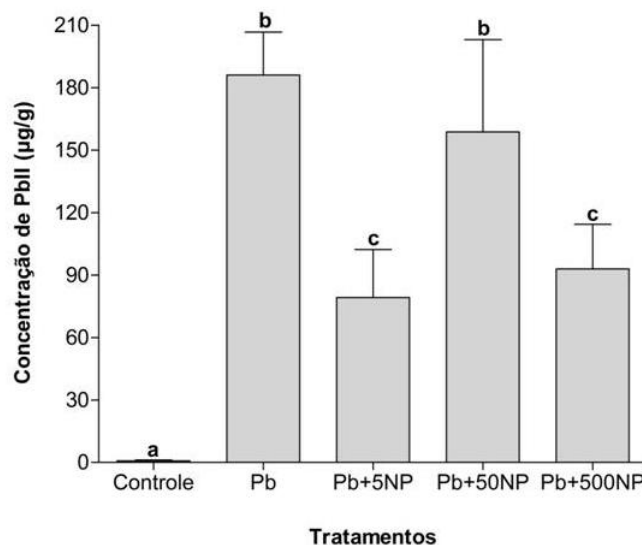


FIGURA 10.: Quantificação de chumbo em tecido hepático de *Rhamdia quelen* nos tratamentos controle negativo (Controle), contaminado somente com PbII na concentração de 21µg/g (Pb), e associação de PbII e NPTiO₂ nas concentrações 5ng/g (Pb+5NP), 50ng/g (Pb+50NP) e 500ng/g (Pb+500NP). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

4.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE METALOTIONEÍNA

Houve aumento na concentração de metalotioneína (MT) no tratamento PbII em relação ao controle negativo ($p = 0,0154$) (Figura 11A).

Nos tratamentos com NPTiO₂, a concentração de MT foi maior nas doses de 5ng/g e 50ng/g, comparando com o controle negativo ($p = 0,0016$ e $p = 0,0291$; respectivamente). E o tratamento com 5ng/g de NPTiO₂ apresentou maior concentração de MT em relação ao tratamento com 500ng/g ($p = 0,0125$), e este não apresentou diferença em relação ao tratamento com 50ng/g de NPTiO₂ ($p > 0,05$) (Figura 11B).

A concentração de MT nos tratamentos de associação entre PbII+50ng/g de NPTiO₂ e PbII+500ng/g de NPTiO₂ quando comparados com o controle negativo ($p = 0,0155$ e $p < 0,001$; respectivamente). E na comparação entre os tratamentos, houve diferença entre associação de PbII+5ng/g de NPTiO₂ e PbII+500ng/g de NPTiO₂ ($p = 0,0142$), sendo que este teve concentração maior de MT (Figura 11C).

Não houve diferença entre os tratamentos somente com PbII, somente com 5ng/g de NPTiO₂ e a associação entre estes ($p > 0,05$) (Figura 11D). O mesmo ocorreu na comparação entre PbII, 50ng/g de NPTiO₂ e a associação entre estes ($p > 0,05$) (Figura 11E). E na comparação entre os tratamentos com PbII, 500ng/g de NPTiO₂ e a associação entre estes, houve maior concentração de MT no tratamento da associação do que nos tratamentos somente com PbII e somente com NPTiO₂ ($p = 0,0092$ e $p = 0,0011$; respectivamente) (Figura 11F).

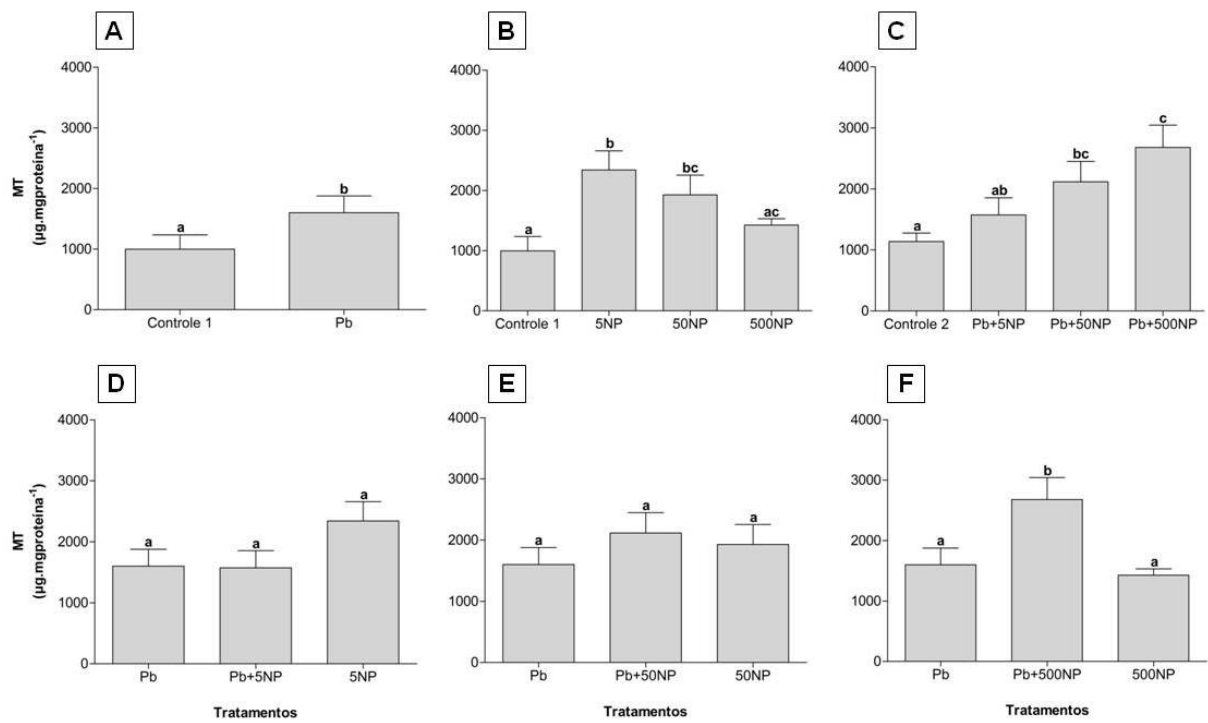


FIGURA 11.: Quantificação de metalotioneína (MT) em tecido hepático de *Rhamdia quelen*. Comparação entre os tratamentos (Controle 1, Controle 2, Pb, 5NP, 50NP, 500NP, Pb+5NP, Pb+50NP, Pb+500NP) dentro de cada grupo (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Tratamentos: Controle 1 = uma injeção intraperitoneal com água destilada; Controle 2 = duas injeções intraperitoneais com água destilada; Pb = 21µg/g de PbII; 5NP = 5ng/g de NPTiO₂; 50NP = 50ng/g de NPTiO₂; 500NP = 500ng/g de NPTiO₂; Pb+5NP = 21µg/g de PbII + 5ng/g de NPTiO₂; Pb+50NP = 21µg/g de PbII + 50ng/g de NPTiO₂ e Pb+500NP = 21µg/g de PbII + 500ng/g de NPTiO₂. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

4.2.3 ATIVIDADE DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO-DISMUTASE (SOD), CATALASE (CAT) E GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A atividade da SOD no tratamento PbII foi maior que no controle negativo ($p = 0,0063$), a CAT não apresentou diferença de atividade ($p > 0,05$) e a GST foi inibida ($p = 0,0376$) (Tabela 2A).

Comparando as doses de NPTiO₂ com o controle negativo, houve aumento da atividade da SOD nas doses de 50ng/g e 500ng/g ($p < 0,001$ e $p = 0,0012$; respectivamente), inibição da CAT nas doses de 5ng/g e 50ng/g ($p = 0,0054$ e $p = 0,0208$; respectivamente), e inibição da GST nas doses de 5ng/g e 500ng/g ($p < 0,001$ e $p = 0,0165$; respectivamente) (Tabela 2B).

Nos tratamentos de associação entre PbII e NPTiO₂, a atividade da SOD aumentou no PbII+50ng/g de NPTiO₂ ($p = 0,0168$) e no PbII+500 ng/g de NPTiO₂ ($p < 0,001$) em relação ao controle, e PbII+500ng/g de NPTiO₂ apresentou maior atividade da SOD que PbII+50ng/g de NPTiO₂ ($p < 0,001$). A atividade de CAT não apresentou diferença entre os tratamento e controle negativo ($p > 0,05$), mas na dose de PbII+500ng/g de NPTiO₂ houve inibição quando comparado com o tratamento PbII+50ng/g de NPTiO₂ ($p = 0,0056$). E a atividade da GST foi inibida no tratamento PbII+5ng/g de NPTiO₂, em comparação com o controle negativo ($p = 0,005$) (Tabela 2C).

Entre os tratamentos somente com PbII, 5ng/g de NPTiO₂ e associação entre estes, houve inibição da SOD no associação PbII+5ng/g de NPTiO₂ em relação ao tratamento somente com PbII ($p = 0,0098$), e não houve diferença em relação ao tratamento somente com NPTiO₂ na mesma dose ($p > 0,05$). A atividade da CAT foi inibida no tratamento de 5ng/g de NPTiO₂ comparando com o tratamento PbII ($p = 0,0062$), e não houve diferença do tratamento associado em relação aos tratamentos com os contaminantes isolados ($p > 0,05$). A atividade de GST foi inibida no grupo tratado somente com NPTiO₂, quando comparado com o grupo de associação entre PbII e NPTiO₂ ($p = 0,0074$) (Tabela 1D).

Entre os tratamentos somente com PbII, 50ng/g de NPTiO₂ e associação entre estes, foi observada menor atividade da SOD no tratamento de associação comparando como tratamento de 50ng/g de NPTiO₂ ($p = 0,007$). A CAT foi inibida no tratamento de 50ng/g de NPTiO₂ em relação ao tratamento de associação ($p =$

0,0172), e a GST não apresentou diferença entre esses tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 2E).

Não houve diferença na atividade da SOD entre os tratamentos com somente PbII, somente 500ng/g de NPTiO₂ e o tratamento de associação destas doses ($p > 0,05$). Mas houve inibição da CAT no tratamento de associação entre PbII e NPTiO₂, em relação aos tratamentos somente com PbII ($p = 0,0406$) e somente com NPTiO₂ ($p = 0,0313$). Não houve diferença na atividade de GST na comparação entre esses tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 2F).

TABELA 2.: Atividade das enzimas Superóxido-Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S-Transferase (GST) em tecido hepático de *Rhamdia quelen*. Comparação entre os tratamentos (Controle 1, Controle 2, Pb, 5NP, 50NP, 500NP, Pb+5NP, Pb+50NP e Pb+500NP) dentro de cada grupo (A, B, C, D, E e F). Valores expressos em média e erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Atividade enzimática em tecido hepático (Média ± Erro Padrão)						
Tratamentos	SOD		CAT		GST	
	(μmol.min ⁻¹ .mgproteína ⁻¹)		(μmol.min ⁻¹ .mgproteína ⁻¹)		(μmol.min ⁻¹ .mgproteína ⁻¹)	
A	Controle 1	0.882 ± 0.3662 ^a	370.4 ± 30.77		91.83 ± 5.846 ^a	
	Pb	1.044 ± 0.0432 ^b	399.7 ± 70.89		71.04 ± 7.003 ^b	
B	Controle 1	0.882 ± 0.3662 ^a	370.4 ± 30.77 ^a		91.83 ± 5.846 ^a	
	5NP	0.938 ± 0.0441 ^a	232.2 ± 25.79 ^b		63.91 ± 3.762 ^b	
	50NP	1.109 ± 0.0466 ^b	260.6 ± 31.20 ^b		81.96 ± 5.095 ^{ac}	
	500NP	1.096 ± 0.0445 ^b	391.3 ± 42.23 ^a		74.03 ± 4.952 ^{bc}	
C	Controle 2	0.804 ± 0.0189 ^a	314.5 ± 27.78 ^a		65.47 ± 3.246 ^a	
	Pb + 5NP	0.875 ± 0.0343 ^{ab}	322.3 ± 20.66 ^a		83.80 ± 4.409 ^b	
	Pb + 50NP	0.930 ± 0.0418 ^b	370.1 ± 28.86 ^{ab}		75.84 ± 3.385 ^{ab}	
	Pb + 500NP	1.162 ± 0.0512 ^c	245.3 ± 37.16 ^{ac}		71.90 ± 5.696 ^{ab}	
D	Pb	1.044 ± 0.0432 ^a	399.7 ± 70.89 ^a		71.04 ± 7.003 ^a	
	Pb + 5NP	0.875 ± 0.0343 ^b	322.3 ± 20.66 ^{ab}		83.80 ± 4.409 ^{ab}	
	5NP	0.930 ± 0.0418 ^{ab}	232.2 ± 25.79 ^b		63.91 ± 3.762 ^{ac}	
E	Pb	1.044 ± 0.0432 ^a	399.7 ± 70.89 ^a		71.04 ± 7.003	
	Pb + 50NP	0.930 ± 0.0418 ^{ab}	370.1 ± 28.86 ^{ab}		75.84 ± 3.385	
	50NP	1.109 ± 0.0466 ^{ac}	260.6 ± 31.20 ^{ac}		81.96 ± 5.095	
F	Pb	1.044 ± 0.0432	399.7 ± 70.89 ^a		71.04 ± 7.003	
	Pb + 500NP	1.162 ± 0.0512	245.3 ± 37.16 ^b		71.90 ± 5.696	
	500NP	1.096 ± 0.0445	391.3 ± 42.23 ^a		74.03 ± 4.952	

Tratamentos: Controle 1 = uma injeção intraperitoneal com água destilada; Controle 2 = duas injeções intraperitoneais com água destilada; Pb = 21μg/g de PbII; 5NP = 5ng/g de NPTiO₂; 50NP = 50ng/g de NPTiO₂; 500NP = 500ng/g de NPTiO₂; Pb+5NP = 21μg/g de PbII + 5ng/g de NPTiO₂; Pb+50NP = 21μg/g de PbII + 50ng/g de NPTiO₂; e Pb+500NP = 21μg/g de PbII + 500ng/g de NPTiO₂.

4.2.4 ENSAIO COMETA

Foi possível demonstrar através do ensaio cometa em tecido hepático a genotoxicidade do PbII na concentração de 21µg/g, que apresentou maiores danos ao DNA quando comparado com o controle negativo ($p = 0,0253$). E tanto o controle negativo, quanto o grupo tratado com PbII mostraram diferença em relação ao controle positivo com MMS ($p < 0,0001$ e $p = 0,0111$; respectivamente), sendo que este causou danos elevados ao material genético (Figura 12A).

A dose de 50ng/g de NPTiO₂ apresentou maiores danos ao DNA em relação ao controle negativo ($p = 0,0455$), e diferiu em relação ao tratamento com a dose de 5ng/g ($p = 0,0166$), que demonstrou causar menos dano em tecido hepático, pois não apresentou diferença em relação ao controle negativo ($p > 0,05$). O tratamento com 500ng/g de NPTiO₂ não apresentou diferença em relação do controle e tratados com 5ng/g e 50ng/g de NPTiO₂ ($p > 0,05$). E, todos os tratamentos (controle negativo, 5ng/g, 50ng/g e 500ng/g de NPTiO₂) apresentaram diferença em relação ao controle positivo com MMS ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p = 0,031$ e $p = 0,0002$; respectivamente) (Figura 12B).

Os tratamentos de associação entre PbII e as NPTiO₂ não apresentaram diferença em relação ao controle negativo ($p > 0,05$) e também não houve diferença entre eles ($p > 0,05$) (Figura 12C).

Comparando o tratamento com 5ng/g de NPTiO₂, PbII e a associação entre estes, foi observado menores danos no grupo tratado somente com NPTiO₂ em relação ao tratado somente com PbII ($p = 0,0226$). Enquanto que o tratamento de associação entre PbII e NPTiO₂ não apresentou diferença entre os tratamentos somente com PbII e somente com NPTiO₂ na mesma dose ($p > 0,05$) (Figura 12D).

Os tratamentos com somente PbII, 50ng/g de NPTiO₂ e associação entre estes não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$) (Figura 12E).

E o tratamento de associação entre PbII e 500ng/g de NPTiO₂ apresentou maiores danos em relação ao tratamento somente com NPTiO₂ na mesma dose ($p = 0,0431$), mas não apresentou diferença em relação ao tratamento somente com PbII ($p > 0,05$) (Figura 12F).

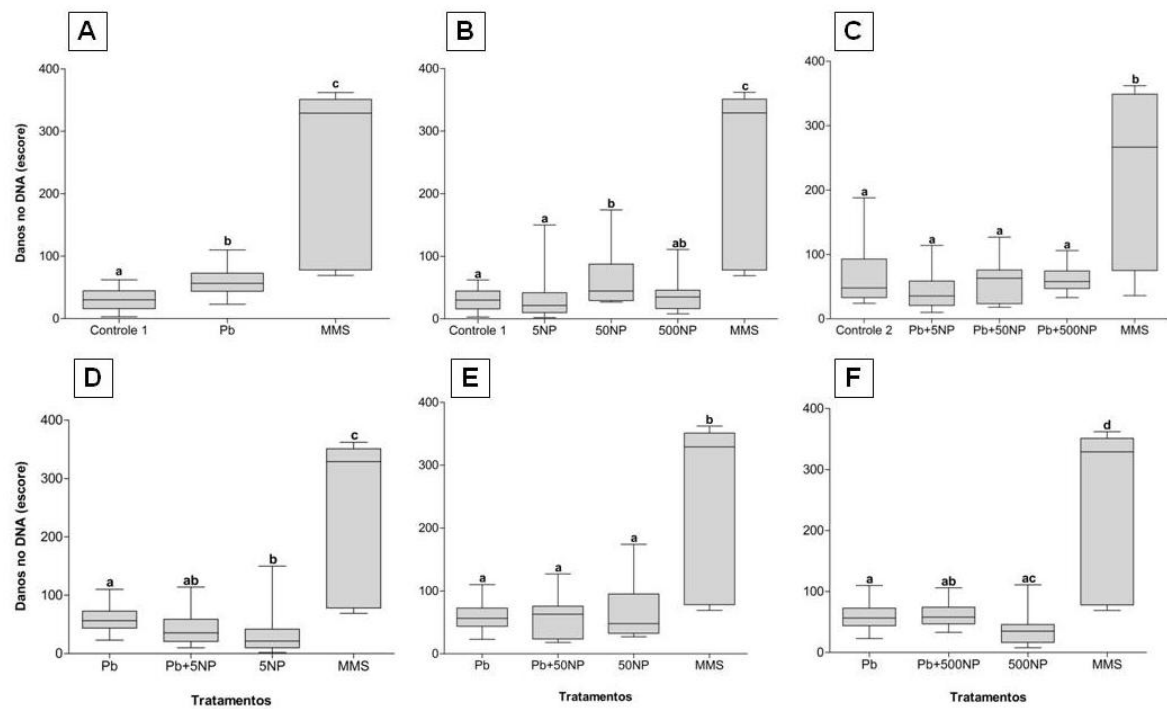


FIGURA 12.: Danos ao DNA no tecido hepático de *Rhamdia quelen*, detectados por ensaio cometa. Comparação entre os tratamentos (Controle 1, Controle 2, Pb, 5NP, 50NP, 500NP, Pb+5NP, Pb+50NP, Pb+500NP e MMS) dentro de cada grupo (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Tratamentos: Controle 1 = uma injeção intraperitoneal com água destilada; Controle 2 = duas injeções intraperitoneais com água destilada; Pb = 21 μ g/g de PbII; 5NP = 5ng/g de NPTiO₂; 50NP = 50ng/g de NPTiO₂; 500NP = 500ng/g de NPTiO₂; Pb+5NP = 21 μ g/g de PbII + 5ng/g de NPTiO₂; Pb+50NP = 21 μ g/g de PbII + 50ng/g de NPTiO₂; Pb+500NP = 21 μ g/g de PbII + 500ng/g de NPTiO₂ e MMS como controle positivo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

4.2.5 ENSAIO DE DIFUSÃO DO DNA

Através do ensaio de difusão de DNA, foi possível demonstrar que o PbII na dose de 21 μ g/g não induziu o processo de apoptose em células do tecido hepático, pois a porcentagem de apoptose no tratamento com PbII não diferiu do controle negativo ($p > 0,05$). Tanto o controle negativo, quanto o grupo tratado com PbII apresentaram diferença em relação ao controle positivo com MMS ($p < 0,0001$ e $p = 0,0018$; respectivamente), sendo que este teve elevado percentual de apoptose (Figura 13A).

Comparando as doses de NPTiO₂ com o controle negativo, somente a dose de 50ng/g apresentou maior porcentagem de apoptose ($p = 0,0484$). A dose de 5ng/g apresentou menor porcentagem de apoptose em relação tratamento de 50ng/g ($p = 0,0213$), e estas duas doses não apresentaram diferença em relação ao tratamento de 500ng/g de NPTiO₂ ($p > 0,05$) (Figura 13B).

Somente o tratamento de associação entre PbII e 50ng/g de NPTiO₂ apresentou diferença em relação ao controle negativo ($p = 0,0449$), demonstrando maior porcentagem de apoptose. Não houve diferença entre os tratamentos associados de PbII e NPTiO₂ nas doses 5ng/g, 50ng/g e 500ng/g ($p > 0,05$) (Figura 13C).

Não houve diferença no percentual de apoptose quando comparados os tratamentos com somente PbII, somente 5ng/g de NPTiO₂ e a associação entre estes ($p > 0,05$) (Figura 13D).

O mesmo ocorreu na comparação entre PbII, 50ng/g de NPTiO₂ e associação entre estes ($p > 0,05$) (Figura 13E).

E os tratamentos com somente PbII, 500ng/g de NPTiO₂ e associação também não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$) (Figura 13F).

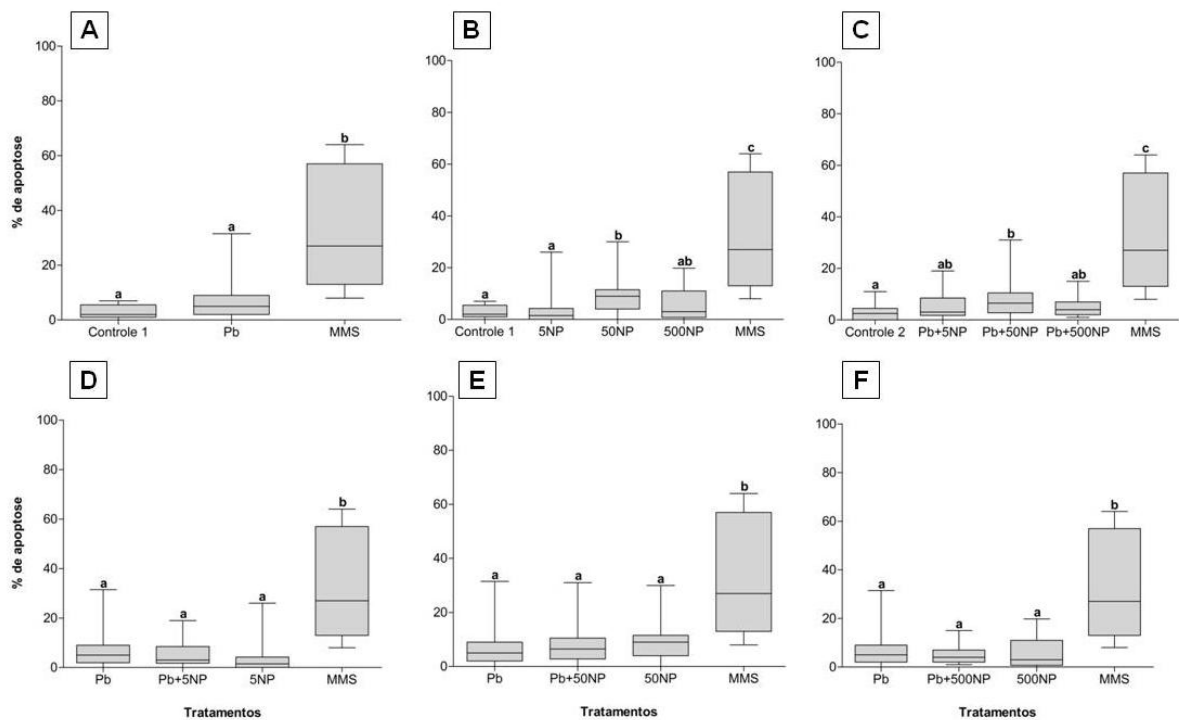


FIGURA 13 .: Porcentagem de apoptose no tecido hepático de *Rhamdia quelen*, detectada por ensaio de difusão de DNA. Comparação entre os tratamentos (Controle 1, Controle 2, Pb, 5NP, 50NP, 500NP, Pb+5NP, Pb+50NP, Pb+500NP e MMS) dentro de cada grupo (Gráficos: A, B, C, D, E e F). Tratamentos: Controle 1 = uma injeção intraperitoneal com água destilada; Controle 2 = duas injeções intraperitoneais com água destilada; Pb = 21 μ g/g de PbII; 5NP = 5ng/g de NPTiO₂; 50NP = 50ng/g de NPTiO₂; 500NP = 500ng/g de NPTiO₂; Pb+5NP = 21 μ g/g de PbII + 5ng/g de NPTiO₂; Pb+50NP = 21 μ g/g de PbII + 50ng/g de NPTiO₂; Pb+500NP = 21 μ g/g de PbII + 500ng/g de NPTiO₂ e MMS como controle positivo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

5 DISCUSSÃO

Estudos demonstram que o fígado é um órgão bastante susceptível à NPTiO₂, apresentando acumulações e alterações enzimáticas. Em ensaio hídrico com *Cyprinus carpio* foi detectado por Hao *et al.* (2009) depleção de enzimas antioxidantes e aumento de peroxidação lipídica, causando necrose e apoptose e promovendo patologias hepáticas. Em ratos, contaminados via injeção intraperitoneal durante 14 dias, o fígado também demonstrou ser mais susceptível à acumulação de NPTiO₂ (LI *et al.*, 2010). Baixas quantidades de titânio foram detectadas em fígado de truta-arco-íris, quando contaminadas com a dose média de 1,3 mg/kg de NPTiO₂ via injeção intravenosa (SCOWN *et al.*, 2009). Em ratos contaminados com 5 mg/kg de NPTiO₂ foi encontrada elevada quantidade de TiO₂ no fígado, mas não foi detectado efeitos tóxicos, e os autores sugerem que em doses baixas, NPTiO₂ podem ser utilizadas de forma segura (FABIAN *et al.*, 2008). Em plantas e linfócitos humanos, NPTiO₂ apresentaram efeitos genotóxicos em dose baixa de 0,25 mM, e houve diminuição de danos no DNA em concentrações mais elevadas (GOSH *et al.*, 2010). Diversos trabalhos demonstram que o provável mecanismo de danos ao DNA e apoptose por contaminação com NPTiO₂ pode ser o estresse oxidativo (PARK *et al.*, 2008; HUSSAIN *et al.*, 2009; SHUKLA *et al.*, 2011; XIONG *et al.*, 2011; SAQUIB *et al.*, 2012; HAMZEH e SUNAHARA, 2013).

As doses utilizadas no atual trabalho foram na ordem de nanogramas por grama do peso do peixe, e demonstraram efeitos tóxicos. As doses de NPTiO₂ apresentaram efeitos diferentes tanto no sangue, quanto no fígado. A dose de 5ng/g de NPTiO₂ causou efeitos citotóxicos e genotóxicos no sangue, mas não induziu à apoptose. No fígado houve absorção de NPTiO₂, demonstrada pela alta concentração de metalotioneína, inibição de CAT e GST, mostrando que houve estresse oxidativo, mas que provavelmente houve resposta celular à este dano, uma vez que não foi observado efeitos genotóxicos e indução de apoptose. Em contraste, a dose de 50ng/g de NPTiO₂ não causou danos em eritrócitos, mas foi absorvida no fígado, demonstrada através do aumento da concentração de metalotioneína. Houve aumento na atividade da SOD e inibição de CAT, demonstrando possível estresse oxidativo excessivo, que por consequência causou danos ao DNA e induzindo ao

mecanismo de apoptose. E a dose de 500ng/g apresentou concentração normal de metalotioneína, mas apresentou aumento de atividade da SOD e inibição de GST, mostrando também que pode ter ocorrido estresse oxidativo, mas que esses danos não foram excessivos, pois não causaram danos ao DNA e nem induziram ao mecanismo de apoptose.

Segundo Bainy *et al.* (1996), quando há produção excessiva de espécies reativas de oxigênio na célula, pode haver diminuição da atividade da CAT. E Sun *et al.* (2006) propõem que a inibição de CAT altera a homeostase celular, podendo gerar mais espécies reativas de oxigênio que provocam reações em cascata, causando danos em células ou danos sistêmicos em peixes condicionados à situações de estresse. Além disso, estudos demonstram diminuição da expressão gênica de enzimas e proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, como a SOD, CAT, GST e MT em tecido hepático de ratos expostos à NPTiO₂ (CUI *et al.*, 2010)

Há dificuldade para avaliar que concentrações causam danos ao organismo, devido à complexidade das propriedades físico-químicas de nanopartículas. Fluidos corporais apresentam elevada força iônica, e a agregação de nanopartículas é influenciada por esta, pois quanto maior a força iônica da solução, maior a capacidade de agregação de nanopartículas (PATRI *et al.*, 2009). Como os estudos com NPTiO₂ em peixes ainda apresentam dados controversos, testamos três doses em pequenas concentrações, a fim de verificarmos quais suas respostas *in vivo* após contaminação aguda. As concentrações utilizadas no presente trabalho foram menores que a maioria das concentrações já testadas até agora para peixes, por sabermos que as nanopartículas possuem a propriedade de se agregarem em altas concentrações ou em soluções com força iônica maior.

Sabe-se dos efeitos adversos que o chumbo causa à saúde, sendo considerado neurotóxico, nefrotóxico e com efeitos deletérios no sistema cardiovascular e hematológico (ATSDR, 2007). Além de, efeitos positivos em testes de inibição enzimática, fidelidade da síntese de DNA, mutações, aberrações cromossômicas, câncer e teratogenia (JOHNSON, 1998). Danos ao DNA em exposição ao chumbo ocorrem provavelmente devido a propriedade do chumbo em inibir o sistema de reparo do DNA (OBE *et al.*, 2002). Em experimento com *Halobatrachus didactylus*, também com única injeção intraperitoneal de PbII na

concentração de 1ng/g, houve indução da síntese de metalotioneína no fígado após sete dias da aplicação (CAMPANA *et al.*, 2003).

Em estudos com *Hoplias malabaricus* contaminados com PbII nas concentrações de 7, 21, 63 e 100µg/g, Ramsdorf *et al.* (2009) detectaram danos no DNA de eritrócitos por contaminação via injeção intraperitoneal e tempo de exposição de 96 horas nas concentrações de 21µg/g e 63µg/g. No estudo realizado por Ferraro *et al.* (2004) e Cestari *et al.* (2004) utilizando 21µg/g de PbII, em ensaio subcrônico via trófica demonstraram, através do ensaio cometa e aberrações cromossômicas, que longos tempos de contaminação promovem danos no DNA. Através dos resultados de genotoxicidade comprovados nos trabalhos acima citados, o presente trabalho objetivou utilizar uma espécie diferente de peixe (*Rhamdia quelen*), a fim de verificar se uma dose única de 21µg/g de PbII, com apenas 96 horas de exposição causaria danos ao DNA. Foi detectado danos ao material genético tanto em eritrócitos quanto em células do tecido hepático, comprovado através do ensaio cometa. Além disso, houve absorção de chumbo no tecido hepático, que conseqüentemente aumentou a concentração de metalotioneína e a atividade de SOD, que provavelmente reduziram danos causados por espécies reativas de oxigênio, evitando a indução de mecanismo de apoptose.

O presente trabalho deu também importância na realização de estudos com associação de compostos químicos, por isso foi testada a interação entre PbII e diferentes doses de NPTiO₂. Como resposta, foram obtidos diferentes resultados, que podem estar relacionados à capacidade de adsorção de metais em NPTiO₂ (HANDY *et al.*, 2008), alterando o mecanismos de entrada de chumbo ou facilitando a eliminação dos contaminantes em células do tecido hepático.

Foi observado que a mistura PbII + 5ng/g de NPTiO₂ induziu à apoptose de eritrócitos quando comparada com o grupo tratado somente com PbII. Houve absorção de chumbo no tecido hepático, porém em concentração menor quando comparada ao grupo com PbII sozinho. Conseqüentemente, esta mistura teve menor concentração de metalotioneína e aumento de atividade de GST, demonstrando possivelmente que os contaminantes foram mais rapidamente eliminados, não causando danos ao DNA e apoptose.

A mistura PbII + 50ng/g de NPTiO₂, apresentou maiores danos ao DNA de eritrócitos quando comparada à NPTiO₂ sozinha na mesma dose. No fígado houve

grande absorção de chumbo no tratamento com esta associação, conseqüentemente, apresentou maior concentração de metalotioneína, indução da atividade da SOD, mas sem alteração na atividade da CAT e da GST, demonstrando um possível estresse oxidativo, induzindo o mecanismo de apoptose. Possivelmente por causa do excesso de morte celular, não foi detectado danos ao DNA na técnica do ensaio cometa, pois esta analisa apenas nucleóides com “cabeça” e não “ghosts”.

A mistura de PbII + 500ng/g de NPTiO₂ não causou efeitos citotóxicos e genotóxicos no sangue. Mas houve aumento de metalotioneína no tecido hepático, demonstrando uma possível interação PbII e NPTiO₂, que conseqüentemente pode ter facilitado a eliminação dos contaminantes do fígado, demonstrado por uma menor concentração de chumbo obtido na análise química. Além disso, houve um aumento da atividade da SOD, indicando estresse oxidativo, porém não houve alteração da CAT e da GST, demonstrando que não houve um estresse excessivo, não causando danos ao DNA, nem induzindo ao mecanismo de apoptose.

Além disso, foi observado um aumento de metalotioneína dependente do aumento das doses das misturas no fígado dos peixes, demonstrando uma possível interação entre a nanopartícula e o metal.

A ausência de eritrócitos imaturos pode ser explicada devido ao estresse da aplicação dos contaminantes, pois o perfil hematológico de peixes pode sofrer alteração através da ação de toxinas (LUMBERTDACHA *et al.*, 1995). Segundo Schmid (1975) e Suzuki *et al.* (1989), a redução da proporção de eritrócitos imaturos pode indicar efeitos mutagênicos e citotóxicos. Em estudo com *Hoplias malabaricus* não foi observada diferença na frequência de eritrócitos maduros e imaturos quando contaminados via trófica com metil-mercúrio por 70 dias (VICARI *et al.*, 2012). Considerando que todos os tratamentos, no presente estudo, receberam injeção intraperitoneal, os padrões hematológicos podem ter sofrido alteração, não sendo possível observar eritrócitos imaturos após 96 horas da aplicação.

Podemos confirmar que a espécie *Rhamdia quelen* pode ser considerada um bom bioindicador em testes de genotoxicidade, como já afirmado por Ferraro (2009). O peixe jundiá (*Rhamdia quelen*) foi utilizado em diversos estudos de genotoxicidade, com o fripronil, naftaleno e nitrato de chumbo por contaminação subcrônica (RAMSDORF, 2011). Ghisi *et al.*, em 2011, realizaram o teste de

genotoxicidade após contaminação subcrônica do inseticida Fipronil em *Rhamdia quelen*. E, Pamplona *et al.*(2011), utilizou o *Rhamdia quelen* como bioindicador para verificar os efeitos genéticos e bioquímicos da administração subcrônica de dipirona. Esta espécie também foi utilizada como bioindicadora em ensaio hídrico de toxicidade do cobre, utilizando biomarcadores histopatológicos e bioquímicos (MELA *et al.*, 2013). O presente estudo pode ser considerado como primeiro relato de bioensaio via injeção intraperitoneal com a espécie *Rhamdia quelen*, e demonstrou que esta apresenta sensibilidade, pois respondeu a baixas doses dos contaminantes.

Sendo assim, este estudo demonstra uma preocupação com a utilização desenfreada de nanomateriais em processos industriais, tecnológicos e medicinais, uma vez que, ainda não há legislação que controle a utilização de nanomateriais, e não há dados esclarecedores do impacto que estes podem causar no ambiente e nos seres vivos.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂) aplicadas em baixas doses com exposição aguda apresentaram capacidade de alterar atividades enzimáticas, causando danos ao DNA e induzindo apoptose em eritrócitos e tecido hepático de *Rhamdia quelen*. Além disso, na associação entre NPTiO₂ e PbII, foi possível observar alteração da absorção de PbII em tecido hepático, demonstrando uma possível interação entre nanopartícula e metal, que conseqüentemente apresentou diferentes respostas quando comparada com os grupos tratados somente com PbII ou NPTiO₂.

Este trabalho teve como importância o estudo de NPTiO₂ em baixas doses, sendo que os dados observados na literatura ainda são muito controversos, devido à complexidade das propriedades físico-químicas de nanopartículas.

E a sensibilidade da espécie *Rhamdia quelen* frente às baixas doses de contaminantes, demonstrou que é um bom bioindicador. Sendo possível sua utilização por diversas vias de contaminação. Até o momento, este trabalho é o primeiro relato da utilização de contaminação via injeção intraperitoneal em *Rhamdia quelen*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. American Fisheries Society, Bethesda , Maryland, USA, 2002.
- AEBI, H. **Catalase *in vitro***. Academia Press, New York. p. 121-126, 1984.
- AKAISHI, F.M. **Aplicação de Biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Curitiba, 2003.
- ALCARAZ, G. Relevant stress indices in aquatic ecotoxicology. **Revista internacional de contaminación ambiental**, v. 16, p. 75-81, 2000.
- ANDREWS, G. K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 95–104. 2000.
- ANDRIEVSKY, G.V.; KLOCHKOV, V.K.; DEREVYANCHENKO, L.I. Is C60 Fullerene Molecule Toxic? **Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostructures**, vol. 13, no. 4, pp. 363–376. 2005.
- ANWAR, W.A. Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environmental Health Perspectives*, v.105, Suppl 4, p.801-806, 1997.
- ATSDR. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**. Toxicological Profile for Lead. Atlanta, Georgia, USA: ATSDR; 2007.
- AVERY, S. V.; HOWLETT, N. G.; RADICE, S. Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence of plasma membrane fatty acid composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p.3960–3966, 1996.
- BAINY, A. C. D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. **Ciência e Cultura**, v.45, p.10-11, 1993.
- BAINY, A. C. D.; SAITOB, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRAB, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, 151–162 (1996).
- BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; RODRIGUES, L. B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R. M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A. B.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, 34: 1565-1469, 2003.

BAWDEN, D. Chemical toxicology databanks. **ASLIB Proceedings**, v. 40(3), 79—85, 1988.

BEDFORD INSTITUTE OF OCEANOGRAPHY. **BIO 2002 in Review: Fisheries and Oceans Canada and Natural Resources Canada**. Bedford Institute of Oceanography. Her Majesty the Queen in Right of Canada, 2003.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v. 415 (3), p. 167-184, 1998.

BENINCÁ, C.; RAMSDORF, W.; VICARI, T.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; DE ALMEIDA, M.I.; SILVA DE ASSIS, H.C.; CESTARI, M.M. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in estuarine lakes at Santa Catarina coast--southern of Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 184, 2045–56, 2012.

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Cadmium NAG activity, and 2-microglobulin in the urine of cadmium pigment workers. **British journal of industrial medicine**, v. 46, p.679-680, 1989.

BERTOLETTI, E. **Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio* (Pisces: Cyprinidae)**. 117 p. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.

BOLLER, K.; SCHMID, W. Chemische Mutagenese beim Sauger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als *in vivo*-Test system. Hamatologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon. **Humangenetik**, v. 2, p. 35-54, 1970.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p.383-392, 2001.

BORM, P.J.; ROBBINS, D.; HAUBOLD, S.; KUHLEBUSCH, T.; FISSAN, H.; DONALDSON, K.; SCHINS, R.; STONE, V.; KREYLING, W.; LADEMANN, J.; KRUTMANN, J.; WARHEIT, D.; OBERDORSTER, E. The Potential Risks of Nanomaterials: A Review Carried out for ECETOC. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 3, no. 1, pp. 1743–8977, 2006.

BUCHELI, T.D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology** . Vol. 25, Iss. 3, 1995

BURY, N.R.; HANDY, R.D. Copper and iron uptake in teleost fish. In: BURY, N.R.; HANDY, R.D.; editors. Surface chemistry, bioavailability and metal homeostasis in aquatic organisms: An integrated approach. **Essential Reviews in Experimental Biology**, vol. 2, Society for Experimental Biology Press, London, UK, pp. 107–127, 2010.

BURY, N.R.; WALKER P.A.; GLOVER, C.N. Nutritive metal uptake in teleost fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 206:11–23, 2003.

CAMPANA, O.; SARASQUETE, C.; BLASCO J. Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 55, p. 116–125. 2003.

CAMPBELL, P.G.S. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: TESSIER, A.; TURNER, D.R.; editors. **Metal speciation and bioavailability in aquatic systems**. New York, USA: Wiley; p. 45–102, 1995.

CAMPBELL, P.G.S.; STOKES, P.M. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 42:2034–49, 1985.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123 -2136, 1990.

CAS. **CHEMICAL ABSTRAT SERVICE**. Disponível em: www.cas.org. Acesso em: 05/10/2012.

CESTARI, M.M. ; LEMOS, P.M.M.; RIBEIRO, C.A.O.; COSTA, J.R.M.A.; PELETIER, E.; FERRARO, M.V.; MANTOVANI, M.S.; FENOCCHIO, A.S. Genetic damage induced by trophic doses of lead evaluated by means of the comet assay and chromosomal aberrations in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n.2, p. 270-274, 2004

CHITHRANI, B.D.; GHAZANI, A.A.; CHAN, W.C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. **Nano Letters**, v. 6:662–8, 2006.

CIESIELSKI, S.; LOOMIS, D.P.; MIMS, S.R.; AUER, A. Pesticide exposures, cholinesterase depression, and symptoms among North Carolina migrant farmworkers. **American Journal of Public Health**, v. 84(3), p.446-51, 1994.

COLLINS A. R.; DOBSON V. L.; DUSINSKA M.; KENNEDY G.; STETINA R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research** 376:183–193, 1997.

COLLINS, A. R. The Comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p. 249-60, 2004.

CONNELL, D.; LAM, P.; RICHARDSON, B.; WU, R. (Eds): **Introduction to Ecotoxicology**. Blackwell Science, Oxford, Reino Unido. 165p.,1999.

COSTA, M.; KRAKER, A. J.; PATIERNO, S. R. Toxicity and carcinogenicity of essential and non-essential metals. In: FOREMAN, D. T. (Ed). **Progress in Clinical Biochemistry**, v. 1, Springer-Verlag, Berlin, p. 1-45, 1984.

CROUCH, R.K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**. 35, 235-41. 1981.

CUI, Y.; GONG, X.; DUAN, Y.; LI, N.; HU, R.; LIU, H.; HONG, M.; ZHOU, M.; WANG, L.; WANG, H; Hepatocyte apoptosis and its molecular mechanisms in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183(1-3):874-80, 2010.

CUI, Y.; LIU, H.; ZE, Y.; ZENGLI, Z.; HU, Y.; CHENG, Z.; CHENG, J.; HU, R.; GAO, G.; WANG, L.; TANG, M.; HONG, F. Gene expression in liver injury caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in mice. **Toxicological sciences**, v. 128, 171–85, 2012.

DIXON, D.P.; LAPTHORN, A. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, v. 3, 1-10, 2002.

DRAFT FOR DEVELOPMENT. **Code of Practice for the Identification of Potentially Contaminated Land and its Investigation**. DD 175/1988.

ELLMAN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7:88-95, 1961.

ESCHER. B.I.; SIGG, L. Chemical speciation of organics and of metals at biological interfaces. In: VAN LEEUWEN, H.P.; KÖSTER, W.; editors. **Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces**. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2004. p. 205–69.

ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos de limnologia**. FINEP. Ed intercência. Rio de Janeiro, 575 p. 1988.

FABIAN, E.; LANDSIEDEL, R.; MA-HOCK, L.; WIENCH, K.; WOHLLEBEN, W.; VAN RAVENZWAAY, B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titaniumdioxide nanoparticles in rats. **Archives of Toxicology**, v. 82, 151–157, 2008.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. *Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects*. **Aquatic Toxicology**, vol. 84, no. 4, pp. 415–430, 2007.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research** 455, 81-95, 2000.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. O.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FERRARO, M.V.M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FERRARO, M.V.M. **Avaliação do efeito mutagênico do tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (PbII) em *Hoplias malabaricus* (Pisces) através dos ensaios: Cometa, Micronúcleo e de Aberrações Cromossômicas.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

GARCÍA-LESTÓN, J.; MÉNDEZ, J.; PÁSARO, E.; LAFFON, B. Genotoxic effects of lead: an updated review. **Environment international**, v. 36, 623-36, 2010.

GEORGE, S.G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic – conjugating enzymes in fish. In: **Aquatic Toxicology**. Malins, C.D., Ostrander, G.R. (Eds) Boca Ranton, London, 1993.

GHISI, N. C.; RAMSDORF, W.A.; FERRARO, M.V.; DE ALMEIDA, M.I.; RIBEIRO, C.A.; CESTARI, M.M. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180(1-4):589-99, 2011.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. **Chemosphere**, v. 81, 1253–62, 2010.

GOKSOYR, A.; ANDERSON, T.; BUHLER, D.R.; STEGEMAN, J.J.; WILLIAMS, D.E.; FORLIN, L. Immunochemical cross-reactivity os β -naphthoflavone – inducible cytochrome P450 in liver microsomes from different fish species and rat. **Fish Physiology**, v. 9, p. 1-13, 1991.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, 30 (1): 179-185, 2000.

GONTIJO, Á.M.M.C., BARRETO, R.E., SPEIT, G., REYES, V.A.V., VOLPATO, G.L., SALVADORI, D.M.F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research.: Genetic Toxicology and Environmental**, v. 534, p. 165-172, 2003.

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

GUTHRIE, F. E.; PERRY, J.J. **Introduction to Environmental Toxicology**, Elsevier, N. Y., 484, 1980.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, 136–47, 2000.

HAMOND, P. B.; BELILES, R. P. Casarett and Doull's Toxicology, **The Basic Science of Poisons**, R. Doull et al (eds), Macmillan, N. Y, 406-467, 1980.

HAMZEH, M.; SUNAHARA, G. I. In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, 864–873, 2013.

HANDY, R.D.; EDDY, F.B. Transport of solutes across biological membranes in eukaryotes: an environmental perspective. In: van Leeuwen HP, Köster W, editors. **Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces**. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd; p. 337–56, 2004.

HANDY, R.D.; HENRY, T.B.; SCOWN, T.M.; JOHNSTON, B.D.; TYLER, C.R. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish — a mechanistic analysis. **Ecotoxicology**, v.17: 396–409, 2008.

HAO, L.; WANG, Z.; XING, B. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, 1459–1466, 2009.

HAYASHI, M.; MAcGREGOR, J. T.; GATEHOUSE, D. G.; ADLER, I. D.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; KRISHNA, G.; MORITA, T. RUSSO, A.; SUTOU, S. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 312, p. 293–304, 1994.

HAYES, M.A.; TIMMINS, A.C.; YAU, E.H.; PALAZZO, M.; WATSON, D.; HINDS, C.J. Oxygen transport patterns in patients with sepsis syndrome or septic shock: influence of treatment and relationship to outcome. **Critical Care Medicine**, v. 25, 926–936, 1997.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p.187-190, 1973.

HERNBERG, S. Lead poisoning in a historical perspective. **American journal of industrial medicine**, v. 38, 244–54, 2000.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, p.147-152, 1982.

HUSSAIN, S.; BOLAND, S.; BAEZA-SQUIBAN, A.; HAMEL, .R.; THOMASSEN, L.C.; MARTENS, J.A.; BILLON-GALLAND, M,A.; FLEURY-FEITH, J.; MOISAN, F.; PAIRON, J.C.; MARANO, F. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. **Toxicology**, v. 260, 142–9, 2009.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, p. 207-221, 2008.

JOHNSON, F. M. The genetic effects of environmental lead. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 410: 123-140, 1998.

JOHNSTON, B.D.; SCOWN, T.M.; MOGER, J. Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to Fish. **Environmental Science Technology**, v.44, no.3, pp. 1144 – 1151, 2010.

KAZANTZIS, G.; LILLY, L. J. Mutagenic and carcinogenic effects of metals. *In*: FRIBERG, L., NORDBERG, F., VOUK, V. (Eds). **Handbook on the Toxicology of Metals**, 2a ed., v. 2, Elsevier, Amserdam, pp. 319-390, 1986.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferase. **Journal Biological Chemistry** 251: 6183-6188, 1976.

KIME, D. E. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. **The Science of the Total Environment**. v.225, p.3-11. 1999.

KOLESNICHENKO, A.V.; TIMOFEEV, M.A.; AND PROTOPOPOVA, M.V. Toxicity of Nanomaterials: 15 Years of Studies. **Ros. Nanotekhnol**, vol. 3, no. 34, pp. 54–61, 2008.

KREYLING, W.; SEMMLER-BEHNKE, M.; MULLER, W. Health Implications of Nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 8, no. 5, pp. 543–562, 2006.

KRUUS, P.; DEMMER, M.; McCAW, K. Chemicals in the environment. **Polyscience pubs**. Montreal, p. 104-128, 1991.

KRYSANOV, E. Y.; PAVLOV, D. S.; DEMIDOVA, T. B.; DGEBUADZE, Y. Y. Effect of nanoparticles on aquatic organisms. **Biology Bulletin**, v. 37, 406–412, 2010.

LAHDETIE, J. Occupation- and exposure-related studies on human sperm. **Journal of Occupational Medicine**, v. 37, p.922-930, 1995.

LAM, C.W.; JAMES, J.T.; McCLUSKEY, R.; AREPALLI, S.; HUNTER, R.L. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. **Critical Reviews in Toxicology**, vol. 36, no. 3, pp. 189–217, 2006.

LI, N.; DUAN, Y.; HONG, M.; ZHENG, L.; FEI, M.; ZHAO, X.; WANG, J.; CUI, Y.; LIU, H.; CAI, J.; GONG, S.; WANG, H.; HONG, F. Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. **Toxicology letters**, v. 195, 161–8, 2010.

LUMLERTDACHA, S.; LOVELL, R. T.; SHELBY, R. A.; LENZ, S. D.; KEMPPAINEN, B. W. Growth, hematology, and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. **Aquaculture**, v. 130, p.201-218, 1995.

MAGOS, L. Epidemiological and Experimental Aspects of Metal Carcinogenesis: Physicochemical Properties, Kinetics, and the Active Species. **Environmental Health Perspectives.**, v. 95, p. 157-189, 1991.

MALLICK, N.; RAI, L.C. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing *Cyanobacterium anabaena dociolum* to copper. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, 30-34, 1999.

MARIONNET, D.; DESCHAUX, P.; REYNAUD, S. Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 21, 80-91, 2006.

MAYNARD, A.D. Nanotechnology: the next big thing, or much ado about nothing?. **Annals of Occupational Hygiene**, vol. 51, no. 1, pp. 1–12, 2007.

MELA, M.; GUILOSKI, I.C.; DORIA, H.B.; RABITTO, I.S.; DA SILVA, C.A.; MARASCHI, A.C.; PRODOCIMO, V.; FREIRE, C.A.; RANDI, M.A.; RIBEIRO, C.A.; DE ASSIS, H.C. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 88, 108–16, 2013.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, v. 367, p. 245-251, 1996.

MUTO, N.; REN, H.W.; HWANG, G.S.; TOMINAGA, S.; ITOH, N.; TANAKA, K. Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by airpumping stress, dexamethasone, and metals. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 122: 75–82, 1999.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4 ed., John Wiley & Sons, 2006.

NORPPA, H.; HIRVONEN, A.; JARVENTAUS, H.; UUSKULA, M.; TASA, G.; OJAJARVI, A.; SORSA, M. Role of GSTT1 and GSTM1 genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. **Carcinogenesis**, v. 16(6):1261-4, 1995.

NORSETH, T. Metal carcinogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, p. 377-386, 1988.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A., DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation research**, v. 504, 17–36, 2002.

OBBERDORSTER, G. Biokinetics and Effects of Nanoparticles, in **Nanotechnology—Toxicological Issues and Environmental Safety**, SIMEONOVA, P.P.; OPOPOL, N.; AND LUSTER, M.I.; pp. 15–51, 2007.

OBBERDORSTER, G.; MAYNARD, A.; DONALDSON, K.; *et al.* Principles for Characterizing the Potential Human Health Effects from Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy. **Particle and Fibre Toxicology**, vol. 2, pp. 1–8, 2005a.

OBBERDORSTER, G.; OBBERDORSTER, E.; AND OBBERDORSTER, J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. **Environmental Health Perspectives**, vol. 113, no. 7, pp. 823–839, 2005b.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiation Research**, v. 122, p. 86-94, 1990.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. L. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.123, p. 291-298, 1984.

PAMPLONA J.H.; DA SILVA T.A.; RAMOS L.P.; RAMSDORF, W.A.; CESTARI M.M.; OLIVEIRA RIBEIRO C.A.; ZAMPONIO A.R.; SILVA DE ASSIS H.C. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 74: 342–349, 2011.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline Single Cell Gel (Comet) Assay and genotoxicity monitoring using Bullheads and Carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 345-356, 1995.

PARK J.K.; LEE, J.S.; LEE, H.H.; CHOI, I.S.; PARK, S.D. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced single strand breaks is attributed to slower rejoining

processes by DNA polymerase inhibitor, cytosine arabinoside in CHO-K1 cells. **Life Sciences**, v. 48, p.1255–1261, 1991.

PARK, E.J.; YI, J.; CHUNG, K.H.; RYU, D.Y.; CHOI, J.; PARK, K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. **Toxicology Letters**, v. 180, p. 222–229, 2008.

PATRI A.; UMBREIT, T.; ZHENG, J.; NAGASHIMA, K.; GOERING, P.; FRANCKE-CARROLL, S.; GORDON, E.; WEAVER, J.; T. MILLER, T.; N. SADRIEH, N. Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, p. 662–672, 2009.

PATRICK, L. Lead toxicity, a review of the literature. Part I: exposure, evaluation, and treatment. **Alternative Medicine Review**, v. 11:2-22, 2006.

PAYNE, J.F.; FANCEY L.; RAHIMTULA, A.; PORTER, E. Review and perspective on the use of mixed function oxygenase enzymes in biological monitoring. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 86, 233-240, 1987.

PIAIA, R.; TOWNSEND, C.R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes. **Aquaculture International**, v. 7, p. 201- 205, 1999.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: **Revista Brasileira de Genética**, 1991.

RAMSDEN, C.S.; SMITH, T.J.; SHAW, B.J.; AND HANDY, R.D. Dietary Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): No Effect on Growth, but Subtle Biochemical Disturbances in the Brain. **Ecotoxicology**, v. 18, no. 7, pp. 939–951, 2009.

RAMSDORF, W. ; VICARI, T. ; ALMEIDA, M. I. M. ; ARTONI, R. F. ; CESTARI, M. M. Handling of *Astyanax sp.* for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. **Environmental Monitoring and Assessment** (Dordrecht. Online), v. 184, p. 5841-5849, 2012.

RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A; COSTA, J. R. M; CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environ Monit Assess.** 158(1-4):77-85, 2009a.

RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

RAMSDORF, W.; GUIMARAES, F.; FERRARO, M.; GABARDO, J.; TRINDADE, E.; CESTARI, M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, p. 78-81, 2009b.

RAMSDORF, W.A.; FERRARO, M.V.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; COSTA, J.R.; CESTARI, M.M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environ Monit Assess**, v. 158:77–85, 2008.

REJMAN, J.; OBERLE, V.; ZUHORN, I.S.; HOEKSTRA, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. **Biochemical Journal**, v. 377:159–69, 2004.

RIBEIRO, L. R.; ANDRADE, H. H. R. Métodos para o diagnóstico da exposição genotóxica ambiental e ocupacional. In: MARQUES, E. K (org). **Diagnóstico Genético-Molecular**, Ed. Da ULBRA, 2003.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 225-254, 1999.

ROSIN, M.P. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemotherapeutic agents. **Mutation Research**, v. 267, p.265-276, 1992.

SAQUIB, Q.; AL-KHEDHAIRY, A.A.; SIDDIQUI, M,A.; ABOU-TARBOUSH, F.M.; AZAM, A.; MUSARRAT, J. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 26, 351–61, 2012.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, 9–15, 1975.

SCOWN, T.M.; AND AERLE, R.; JOHNSTON, B.D.; CUMBERLAND, S.; LEAD, J.R.; OWEN, R.; TYLER, C.R. High doses of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles accumulate in the kidneys of rainbow trout but with no observable impairment of renal function. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 109, 372–80, 2009.

SESTILI P.; CANTONI O. Osmotically driven radial diffusion of single-stranded DNA fragments on an agarose bed as a convenient measure of DNA strand scission. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 1019–1026, 1999.

SESTILI, P.; MARTINELLI, C.; STOCCHI, V. The fast halo assay: an improved method to quantify genomic DNA strand breakage at the single-cell level. **Mutation research**, v. 607, 205–14, 2006.

SHUGART, L. Biological monitoring: testing for genotoxicity, In: J.F. McCarthy, L.R. Shugart (Eds.), **Biomarkers of Environmental Contamination**. Lewis Publishers, Chelsea, p. 217-227, 1990.

SHUKLA, R.K.; SHARMA, V.; PANDEY, A.K.; SINGH, S.; SULTANA, S.; DHAWAN, A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 25, 231–41, 2011.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockholm, Sweden, 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.

SINGH, N.; MANSHIAN, B.; JENKINS, G.J.; GRIFFITHS, S.M.; WILLIAMS, P.M.; MAFFEIS, T.G.; WRIGHT, C.J.; DOAK, S.H. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. **Biomaterials**, v. 30, 3891–914, 2009.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SOUZA-BASTOS, L.; FREIRE, C.A. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 289: 167–174, 2009.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. **Methods in Molecular Biology**, v. 291, p. 85-95, 2005.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). **Mutagenesis**, v 10, p 555-559, 1995.

SPIVEY, A. The weight of lead. Effects add up in adults. **Environ. Health Perspect.**, v.115: A31–6, 2007.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.M. JR.; BERGMAN, H.L. **Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological markers of antropogenic stress**. Eds. Lewis Publishers, p.235-334, 1992.

SUN, H.; ZHANG, X.; NIU, Q.; *et al.* Enhanced Accumulation of Arsenate in Carp in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles. **Water Air Soil Pollut.**, v. 178 P, pp. 245–254, 2007.

SUN, H.; ZHANG, X.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.; CRITTENDEN, J. C. Influence of titanium dioxide nanoparticles on speciation and bioavailability of arsenite. **Environmental pollution**, v. 157, 1165–70, 2009.

SUN, Y.; YU, H.; ZHANG, J.; YIN, Y.; SHI, H.; WANG, X. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. **Chemosphere**, v. 63, 1319–27, 2006.

SUZUKI, Y.; NAGAE, Y.; LI, J.; SABAKA, H.; MAZOWA, K.; TAKAHASHI, A.; SHIMUZU, H. The micronucleus test and erythropoiesis: effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio). *Mutagenesis* 4,420–424, 1989.

The Project on Emerging Nanotechnologies. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/>>. Acesso em 17/03/2013.

TRUHAUT, R. Dangers de l'ère chimique. *J. Chim. Pure Appl.*, 18, 111-128, 1969.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 1, 151–73 (1977).

UEADA, T.; HAYASHI, M.; KOIDE, N.; SOFUNI, T.; KOBAYASHI, J. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Water Science and Technology**, v. 25, p. 235-240, 1992.

VALLEE, B. L. Introduction to metallothionein. **Methods in Enzymology**. v. 205, p.3-7. 1991.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, v. 44, n. 1, p. 69-84. 1997.

VICARI, T.; FERRARO, M.V.; RAMSDORF, W.A.; MELA, M.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; CESTARI, M.M. Genotoxic evaluation of different doses of methylmercury (CH_3Hg^+) in *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 82, 47–55, 2012.

White Book on Nanotechnologies. Studies in Nanoparticles, Nanostructures, and Nanocomposites in the Russian Federation, in Mater. Pervogo vseros. soveshch. uchenykh, inzhenerov i proizvoditelei v oblasti nanotekhnologii (Proc. First All Russia Congress of Scientists, Engineers, and Manufacturers in Nanotechnology), Moscow: LKI, p. 344, 2008.

WOLFE, H.R.; DURHAM, W.F.; ARMSTRONG, J.F. Urinary excretion of insecticide metabolites. Excretion of para-nitrophenol and DDA as indicators of exposure to parathion. **Arch Environ Health**, v. 27, p.711-716, 1970.

WOO, Y.-T.; LAI, D. J.; ARCOS, J. C.; ARGUS, M. F. Chemical Induction of Cancer, Structural Bases and Biological Mechanisms. **Academic Press**, San Diego, CA, 1988.

XIMENES, J. F. **Enciclopédia Ambiental – Poluição Industrial**. Disponível em: <http://www.encyclopediambiental.hpg.ig.com.br>.

XIONG, D.; FANG, T.; YU, L.; SIMA, X.; ZHU, W. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. **The Science of the total environment**, v. 409, 1444–52, 2011.

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

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E.; GOLDSTEIN, E. G. Toxicidade de efluentes industriais da bacia do rio Piracicaba. **Revista Ambiente**, v. 2, p. 39-42, 1988.

ZAGATTO, P. A.; MOZETO, A. A. Introdução de Agentes Químicos no Ambiente. *In*: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (eds).: **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. Ed Rima, São Carlos-SP, 2006.

ZHANG, X.; HONGWEN, S.; ZHANG, Z.; NIU, Q.; CHEN, Y.; CRITTENDEN, J.C. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. **Chemosphere**, v. 67:160–6, 2007.

ZHU, X.; CHANG, Y.; CHEN, Y. Toxicity and Bioaccumulation of TiO₂ Nanoparticle Aggregates in *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 78, no. 3, pp. 209–215, 2010.

ZHU, X.; ZHU, L.; CHEN, Y.; TIAN, S. Acute Toxicities of Six Manufactured Nanomaterial Suspensions to *Daphnia magna*, **J. Nanopart. Res.**, v. 11 P, pp. 67–75, 2009.

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

ANEXOS

ENSAIO COMETA

Ensaio cometa com células do sangue

Procedimento para montagem e análise das lâminas:

- a) Coletar 10 µl de sangue de cada animal e misturar com 1 ml de soro bovino fetal; Desta solução, coletar 10 µl de suspensão celular e misturar com 120 µl de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C);
- b) Colocar sobre uma lâmina com a cobertura de agarose normal;
- c) Cobrir a lâmina com uma lamínula e levar a geladeira por 15 minutos;
- d) Depois de decorrido o tempo de refrigeração, retirar as lamínulas com cuidado;
- e) Colocar as lâminas em solução de lise dentro de cubetas e manter em refrigerador por 24 horas;
- f) Preparar a cuba de eletroforese mergulhando-a em gelo (4°C) e no escuro;
- g) Colocar as lâminas na cuba horizontal de eletroforese, quando necessário, preencher os espaços vazios com lâminas limpas;
- h) Na cuba de eletroforese, adicionar suavemente o tampão de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir as lâminas;
- i) Manter as lâminas na solução de eletroforese por 30 minutos para a desespiralização do DNA;

- j) Iniciar a corrida de eletroforese a 25V e 300 mA por 25 minutos;
- k) Terminada a eletroforese, retirar as lâminas cuidadosamente e neutralizar com 5 mL de tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos;
- l) Repetir a neutralização por mais duas vezes;
- m) Secar as lâminas na posição inclinada e fixar com etanol por 5 minutos;
- n) Para a coloração, adicionar 20 μ L de brometo de etídeo (20 mg. L⁻¹) em cada lâmina, cobrir com lamínula e analisar imediatamente.

Ensaio cometa com células do fígado

O procedimento para montagem das lâminas com o tecido hepático consiste das seguintes etapas:

- a) Retirar 3 mm³ de cada animal;
- b) Acondicionar o tecido em frasco de microcentrífuga do tipo ependorf contendo 1mL de soro bovino fetal. Armazenar estes frascos sob refrigeração e na ausência de luz;
- c) Desagregar o tecido em micro homogeneizador a 1500 rpm por cerca de 30 segundos;
- d) Coletar 50 µL do homogeneizado obtido e misturar com 120 µL de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C);
- e) Montar as lâminas com a suspensão celular.
- f) Colocar as lâminas em solução de lise dentro de cubetas e manter em refrigerador por 24 horas;
- g) Preparar a cuba de eletroforese mergulhando-a em gelo (4°C) e no escuro;
- h) Colocar as lâminas na cuba horizontal de eletroforese, quando necessário, preencher os espaços vazios com lâminas limpas;
- i) Na cuba de eletroforese, adicionar suavemente o tampão de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir as lâminas;
- j) Manter as lâminas na solução de eletroforese por 30 minutos para a desespiralização do DNA;
- k) Iniciar a corrida de eletroforese a 25V e 300 mA por 25 minutos;

- l) Terminada a eletroforese, retirar as lâminas cuidadosamente e neutralizar com 5 mL de tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos;
- m) Repetir a neutralização por mais duas vezes;
- n) Secar as lâminas na posição inclinada e fixar com etanol por 5 minutos;
- o) Para a coloração, adicionar 20 µL de brometo de etídeo (20 mg. L⁻¹) em cada lâmina, cobrir com lamínula e analisar imediatamente.

Escores

Analisar sob microscópio de epifluorescência com aumento de 400x em teste cego, 100 cometas em cada lâmina.

Classificar os cometas de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida de eletroforese, sendo: 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano moderado), 3 (dano elevado) e 4 (dano máximo). Os cometas em que não é possível visualizar a região da cabeça devem ser desconsiderados da contagem por representarem DNAs totalmente fragmentados, característicos de células inviáveis.

Atribuir escores de danos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

Escores = {(0 x dano 0)+(1 x dano 1)+(2 x dano 2)+(3 x dano 3)+(4 x dano 4)}

ENSAIO DE DIFUSÃO DE DNA

Ensaio de difusão com células do sangue

Procedimento para montagem e análise das lâminas:

- a) Coletar 10 μ l de sangue de cada animal e misturar com 1 ml de soro bovino fetal; Desta solução, coletar 10 μ l de suspensão celular e misturar com 120 μ l de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C);
- b) Colocar sobre uma lâmina com a cobertura de agarose normal;
- c) Cobrir a lâmina com uma lamínula e levar a geladeira por 15 minutos;
- d) Depois de decorrido o tempo de refrigeração, retirar as lamínulas com cuidado;
- e) Colocar as lâminas em solução de lise dentro de cubetas e manter em refrigerador por 24 horas;
- f) Preparar uma bandeja e dentro colocar uma superfície de vidro, manter no escuro;
- g) Colocar as lâminas na superfície de vidro;
- h) Adicionar suavemente o tampão de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir as lâminas;
- i) Manter as lâminas na solução de eletroforese por 10 minutos para a desespiralização do DNA;
- k) Terminado o processo anterior, retirar as lâminas cuidadosamente e neutralizar com 5 mL de tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos;
- l) Repetir a neutralização por mais duas vezes;

m) Secar as lâminas na posição inclinada e fixar com etanol por 5 minutos;

n) Para a coloração, adicionar 20 μ L de brometo de etídeo (20 mg. L⁻¹) em cada lâmina, cobrir com lamínula e analisar imediatamente.

Análise das lâminas

Analisar sob microscópio de epifluorescência com aumento de 400x em teste cego, 100 nucleóides em cada lâmina.

Classificar os nucleóides como: “normal”, quando não há extensão de fragmentos de DNA; “apoptose”, quando há extensão circular de fragmentos de DNA; e “necrose” quando há um espaço vazio entre o centro do nucleóide e a extensão de fragmentos de DNA.

Calcular a porcentagem de cada classificação.

Ensaio de difusão com células do fígado

O procedimento para montagem das lâminas com o tecido hepático consiste das seguintes etapas:

- a) Retirar 3 mm³ de cada animal;

- b) Acondicionar o tecido em frasco de microcentrífuga do tipo ependorf contendo 1mL de soro bovino fetal. Armazenar estes frascos sob refrigeração e na ausência de luz;

- c) Desagregar o tecido em micro homogeneizador a 1500 rpm por cerca de 30 segundos;

- d) Coletar 50 µL do homogeneizado obtido e misturar com 120 µL de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C);

- e) Montar as lâminas com a suspensão celular.

- f) Colocar as lâminas em solução de lise dentro de cubetas e manter em refrigerador por 24 horas;

- g) Preparar uma bandeja e dentro colocar uma superfície de vidro, manter no escuro;

- h) Colocar as lâminas na superfície de vidro;

- i) Adicionar suavemente o tampão de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir as lâminas;

- j) Manter as lâminas na solução de eletroforese por 10 minutos para a desespiralização do DNA;

k) Terminado o processo anterior, retirar as lâminas cuidadosamente e neutralizar com 5 mL de tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos;

l) Repetir a neutralização por mais duas vezes;

m) Secar as lâminas na posição inclinada e fixar com etanol por 5 minutos;

n) Para a coloração, adicionar 20 μ L de brometo de etídeo (20 mg. L⁻¹) em cada lâmina, cobrir com lamínula e analisar imediatamente.

Preparação das lâminas com cobertura de agarose

- a) Dissolver 1,5 g de agarose normal em 100 mL de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas;
- b) Colocar para aquecer;
- c) Após fervura, deixar solidificar a temperatura ambiente;
- d) Picar a agarose em e ferver;
- e) Repetir as etapas “c” e “d”;
- f) Levar para banho-maria a 70°C, o banho deve ficar no nível da agarose;
- g) Mergulhar as lâminas, previamente limpas com etanol, na agarose até alcançar a parte esmerilhada. Procurar fazer uma camada fina de agarose;
- h) Retirar a lâmina e limpar com papel o lado oposto da parte esmerilhada;
- i) Secar “overnight” em temperatura ambiente. Estas lâminas podem ser estocadas por várias semanas.

Preparação da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)

- a) Dissolver 0,1 g de agarose de baixo ponto de fusão em 20 mL de PBS;
- b) Colocar para aquecer com agitação constante;
- c) Desligar o aquecedor quando levantar fervura e manter a agitação até diminuir a temperatura da agarose;
- d) Desligar o agitador e deixar solidificar a temperatura ambiente;
- e) Manter na geladeira até o momento do uso.

PBS

- 0,2 g de cloreto de potássio – KCl (PM 74,55).
 - 0,2 g de fosfato de potássio monobásico – KH₂HPO₄ (PM 136,09).
 - 8 g de cloreto de sódio - NaCl (PM 58,44).
 - 1,15 g de hidrogênio-fosfato disódico anidro - NaHPO₄ (PM 141,96).
 - 1000 mL de água deionizada.
- a) Fazer em balão volumétrico de 1000 mL;
 - b) Acrescentar a água até alcançar a marca do balão volumétrico;
 - c) Acertar o pH para 7,4;
 - d) Estocar em refrigerador;

Solução de Lise – Estoque

Para 1000 mL:

- 890 mL de água destilada.
- 146,1 g de Cloreto de Sódio - NaCl (2,5 M).
- 37,2 g de Ácido Etilenodiaminotetracético - EDTA (100 mM; PM 372,24).
- 1,2 g TRIS 10 mM (PM 121,14).
- 8 g de Hidróxido de Sódio sólido (NaOH PM 40,0).

a) Dissolver os reagentes em 890 mL de água;

b) Acertar o pH com NaOH até atingir pH 10,

c) Adicionar 10 g de lauril sarcosinato de sódio e misturar bem lentamente para evitar a formação de grumos.

Solução de Lise – Uso

Para 100 mL:

- 1 mL de Triton X – 100.
- 10 mL DMSO.
- 89 mL solução estoque.

a) Adicionar todos os reagentes em uma proveta de 100 mL;

b) Fazer e manter sempre no escuro.

Solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) (300 mM):

- 19,2 g de NaOH.
- 48 mL de água deionizada.

a) Agitar.

Ácido Etilenodiaminotetracético - EDTA (200 Mm) – Estoque

- 14,89 mL de EDTA.
- 200 mL de água deionizada.

a) Acertar o pH para 10 com pastilhas de NaOH;

b) A solução pode ser estocada.

Tampão de Eletroforese

- 1600 mL de água destilada gelada (4°C).
- 8 mL de EDTA (200 Mm).
- 48 mL da solução de NaOH.

a) Agitar;

b) Acertar o pH para maior 13 com pastilhas de NaOH.

Tampão de Neutralização

- 51,04 g de TRIS.
- 1000 mL de água deionizada.

a) Agitar;

b) Acertar o pH para 7,5 com Ácido clorídrico (HCL).

Solução de Coloração – Estoque

- 10 mg de Brometo de Etídio.
- 50 mL de água deionizada.

Solução de Coloração – Uso

- 1 mL de solução estoque.
- 9 mL de água deionizada.

Descontaminação das lâminas

- Deixar as lâminas expostas à luz por uma semana;
- Após este período colocar de molho na solução de descontaminação por 24 horas;
- Neutralizar a solução com bicarbonato de sódio (NaHCO_3);
- Lavar as lâminas utilizando luvas.

a) 1L de água;

b) 13,6 g de nitrito de sódio (NaNO_2);

c) 67 mL de ácido hipofosforoso (H_3PO_2).

TESTE DO MICRONÚCLEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICA NUCLEARES COM COLORAÇÃO FLUORESCENTE DE LARANJA DE ACRIDINA

O teste do micronúcleo (MN) com coloração fluorescente de laranja de acridina em eritrócitos foi realizado de acordo Ueada *et al* (1992) e utilizada para a determinação da frequência de micronúcleos, de alterações morfológicas nucleares (AMN) e verificação do efeito do contaminante no processo de eritropoiese através da análise da frequência de eritrócitos policromáticos ou imaturos.

- a) Coletar o sangue periférico;
- b) Diluir o sangue com a mesma quantidade de soro bovino fetal;
- c) Fazer esfregaço com a suspensão celular obtida;
- d) Secar as lâminas “overnight”;
- e) Fixar com metanol por 10 minutos;
- f) Corar as lâminas com 20 μ L de laranja de acridina a 0,003% em tampão Sorenson’s com pH 6,8 por 2–3 minutos;
- g) Enxaguar brevemente as lâminas com o tampão ou com água destilada;
- h) Analisar imediatamente em microscópio de epifluorescência, em aumento de 1000x;
- i) Analisar em teste cego 1000 células/peixe.

Identificação de eritrócitos imaturos

A identificação de eritrócitos imaturos e de MN foi realizada segundo Çavas e Ergene-Gözükara (2005). A laranja de acridina cora seletivamente eritrócitos imaturos ou policromáticos. Sob microscópio fluorescente, micronúcleos e os principais núcleos apresentam forte fluorescência verde-amarelo e entre todas as células os eritrócitos imaturos podem ser facilmente identificados pelo seu conteúdo de RNA citoplasmático, apresentando fluorescência vermelha no citoplasma.

O critério para a identificação de eritrócitos jovens micronucleados será o seguinte:

- a) O micronúcleo não pode ultrapassar um terço do tamanho do núcleo principal.

- b) O micronúcleo deve estar claramente separado do núcleo principal.

- c) O micronúcleo deve estar no mesmo plano de foco e ter a mesma cor e refringência do núcleo principal.

As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, também são analisadas, sendo descritas como alterações morfológicas nucleares (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

Classificação das alterações morfológicas nucleares (AMN)

Em peixes, diversos tipos de anomalias nucleares ainda não apresentam sua origem completamente compreendida. Carrasco, Tylbury e Myers (1990), descreveram e fotografaram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes. Essas lesões foram basicamente classificadas em:

- a) *Blebbled*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). O tamanho destas evaginações varia desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal;
- b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os blebbed. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas;
- c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior;
- d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

Análise estatística

Após a obtenção das frequências, compara-se os grupos através do teste de Mann-Whitney para duas amostras e Kruskal Wallis para comparações entre mais amostras.