

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

YURI MATHEUS RODRIGUES GONÇALVES

**PODE A AÇÃO DO N-ACETILCISTEÍNA SUPRIMIR OS EFEITOS DO
SULFATO DE COBRE SOBRE O RITMO DE PROTEÍNAS DO SISTEMA
ANTIOXIDANTE EM *Danio rerio*?**

CURITIBA, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

YURI MATHEUS RODRIGUES GONÇALVES

**PODE A AÇÃO DO N-ACETILCISTEÍNA SUPRIMIR OS EFEITOS DO
SULFATO DE COBRE SOBRE O RITMO DE PROTEÍNAS DO SISTEMA
ANTIOXIDANTE EM *Danio rerio*?**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Ferreira Randi

CURITIBA, 2018

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família, ao apoio incondicional e incentivo no decorrer da minha vida. Sem ela, eu jamais chegaria onde estou e não almejaria ir mais longe;

Ao Prof. Marco Antonio Ferreira Randi, que nos últimos dois anos me orientou, sendo inclusive um dos melhores professores que tive no curso. Sua paciência e astúcia foram, sem dúvida, muito importantes para minha formação;

À minha coorientadora, no meu primeiro ano de estágio, Dr^a. Halina Binde Doria que me ensinou os primeiros passos e me introduziu ao tema da minha monografia. Sem sua ajuda não estaria trabalhando nesta área;

Aos meus amigos que fiz durante a graduação Andreas, Bruno, Karen, João, Luiza, Eduardo, Fernanda, Letícia, Giovano, Gabriela, Júnyor, Teles, Leticia, Ana e Carol. Vocês são os melhores amigos e espero tudo de melhor para todos;

As amigas do Laboratório de Toxicologia Celular Joelma, Nilce, Maristela, Patricia, Ana e todos os demais. Pela ajuda na coleta, nos ensaios, dúvidas e outras coisas. Muito obrigado por tudo;

Ao Dr. Prof. Francisco Filipak Neto por me explicar melhor sobre os protocolos de ensaio bioquímico e por aceitar participar da minha banca avaliadora;

Ao Prof. Fernando Mazzilli Louzada, por compartilhar seu tempo me ensinando um pouco sobre cronobiologia, que é a uma área não tão bem conhecida por mim. E também por aceitar participar da minha banca avaliadora;

Ao pessoal da farmacologia e fisiologia da UFPR que me ensinaram a mexer nos equipamentos e ajudaram nos teste, possibilitando a obtenção dos meus dados;

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas que tive a experiência de apredizado na minha formação. O conhecimento que obtive a partir deles me possibilitou ser uma pessoa mais esclarecida e menos ignorante;

À coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Prof. Edson Antonio Tanhoffere
Leandro Thomacheski;

E por fim, em especial, gostaria de agradecer a minha mãe, que é a pessoa que
mais amo e que sei que senti muito orgulho da minha realização. Obrigado mãe,
por sempre acreditar no meu potencial.

RESUMO

A exposição de *Danio rerio* ao sulfato de cobre leva à supressão de alguns parâmetros relacionados à coordenação de ritmicidade circadiana, mais especificamente algumas enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo. N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante que auxilia no combate a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como precursor de síntese da glutathione (GSH), impedindo que ocorram danos oxidativos nas células. Para verificar o papel protetivo do NAC contra os efeitos do Cu, espécimes adultos de *Danio rerio* foram expostos por 72 horas a 45 µg/L de sulfato de cobre (CuSO₄) em coexposição ao NAC (1,0 mg/L), por via hídrica, em condições controladas de luz/escuro, para posterior coleta de fígado e cérebro. Foi verificado, em ambos os tecidos, o padrão de atividade catalítica das enzimas que atuam no sistema antioxidante, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e os níveis de tióis não proteicos, compostos em sua maioria pela glutathione (GSH) no decorrer de 24 horas. Constatou-se que a suplementação com NAC atuou positivamente contra os efeitos causados pelo CuSO₄, retomando o horário de acrofase e coordenação entre as enzimas, além de estar aumentando as taxas de GSH. O conjunto desses resultados corrobora com a hipótese de que a exposição ao Cu é responsável pela desregulação no ritmo de proteínas do sistema antioxidante em *D. rerio*, com conseqüente prejuízo no combate ao excesso de EROs, além de alterar o funcionamento do relógio circadiano. Dessa forma, o uso de NAC pode auxiliar na proteção contra a desregulação desses biomarcadores, diminuindo os efeitos causados pelo Cu, principalmente aumentando os níveis de GSH, mas também auxiliando ao nível de atividade enzimática das proteínas do sistema antioxidante.

Palavra-chave: cobre, N-acetilcisteína, ritmo circadiano, sistema antioxidante, *Danio rerio*.

ABSTRACT

Danio rerio exposure to copper sulfate leads to the suppression of some parameters related to the coordination of circadian rhythmicity, more specifically some enzymes involved in the oxidative metabolism. N-acetylcysteine (NAC) is an antioxidant that assists in combating the formation of species reactive oxygen species (ROS) as precursors of glutathione synthesis (GSH), preventing oxidative damage to cells. To verify the protective role of NAC against the effects of Cu, adult specimens of *Danio rerio* were exposed for 72 hours to 45 µg/L copper sulfate (CuSO₄) in coexposure to NAC (1,0 mg/L), waterway, under controlled conditions of light-dark, for subsequent collection of liver and brain. In both tissues, the catalytic activity pattern of the enzymes acting on the antioxidant system, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and levels of non-protein thiols, composed mainly of glutamate (GSH) were verified within 24 hours. It was verified that the supplementation with NAC acted positively against the effects caused by the CuSO₄, resuming the time of acrophase and coordination between the enzymes, besides being inducing the GSH rates. These results together corroborate the hypothesis that exposure to Cu is responsible for the modification of the protein rhythm of the antioxidant system in *D. rerio*, with consequent damage in the fight against excess ROS, and alter the functioning of the circadian clock. Thus, the use of NAC can help protect against the deregulation of these biomarkers, reducing the effects caused by Cu, mainly by increasing the levels of GSH, but also helping to the level of enzymatic activity of the proteins of the antioxidant system.

Keyword: copper, N-acetylcysteine, circadian rhythm, antioxidant system, *Danio rerio*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Modelo de funcionamento da ritmicidade circadiana	13
FIGURA 2: Detoxificação de ânion superóxido	14
FIGURA 3: Interconversão de glutathiona.....	17
FIGURA 4: Rotas derivadas das atividades biológicas do NAC.....	20
FIGURA 5: Exemplar de <i>Danio rerio</i> adulto	21
FIGURA 6: Esquema do desenho experimental	23
FIGURA 7: Respostas biológicas da defesa antioxidante encontradas em fígado	27
FIGURA 8: Respostas biológicas da defesa antioxidante encontradas em cérebro.....	28
FIGURA 9: Comparação das respostas biológicas - CAT e SOD.....	30
FIGURA 10: Comparação das respostas biológicas - GSH.....	31

LISTA DE TABELA

TABELA 1: Acrofase encontrada em fígado e cérebro - CAT e SOD.....	29
--	----

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS

CAT – catalase

Cu – cobre

CuSO₄ – sulfato de cobre

EROs – espécies reativas de oxigênio

GPx – glutathione peroxidase

GR – glutathione reductase

GSH – glutathione reduzida

GSSG – glutathione dissulfeto

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

NAC – N-acetilcisteína

O₂^{•-} – ânion superóxido

SOD – superóxido-dismutase

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO GERAL	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. RITMO CIRCADIANO	12
1.2. SISTEMA ANTIOXIDANTE E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	13
1.3. RITMO CIRCADIANO E PROCESSOS DE SINALIZAÇÃO REDOX	15
1.4. GLUTATIONA	16
1.5. COBRE.....	17
1.6. N-ACETILCISTEÍNA.....	18
1.7. PEIXE-ZEBRE (<i>Danio rerio</i>).....	20
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. DESENHO EXPERIMENTAL	22
3.2. ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	24
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
3.4 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	26
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES.....	35
7. BIBLIOGRAFIA.....	36

INTRODUÇÃO GERAL

O oxigênio é essencial para que organismos aeróbicos realizem vários processos metabólicos. No entanto, a dependência pelo oxigênio leva inevitavelmente à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são tóxicas para os organismos. O estresse oxidativo, devido ao ataque das EROs, ocorre quando as defesas antioxidantes não são eficazes no combate dessas substâncias. A exposição de animais aquáticos a alguns compostos tóxicos induz o quadro de estresse oxidativo gerando EROs, como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (KIM et al., 2015). Peixes são organismos capazes de combater o aumento na geração de EROs através de enzimas antioxidantes, como a superóxido-dismutase (SOD) e a catalase (CAT), que convertem ânions superóxido em H_2O_2 e em H_2O e O_2 , respectivamente (CRAIG et al., 2007).

Ritmos biológicos podem ser definidos como oscilações bioquímicas, fisiológicas ou comportamentais que a quase totalidade dos organismos apresenta (HIRAYAMA et al., 2007). O ritmo circadiano é um ritmo biológico que oscila dentro de aproximadamente 24 horas, através de proteínas chave, sendo importante para tornar em fase organismo e ambiente (KULCZYKOWSKA et al., 2010). Alterações na ritmicidade biológica podem levar a prejuízos para o metabolismo e a vida dos organismos. Tais alterações podem ser decorrentes da exposição a condições de estresse ambiental e podem afetar o funcionamento do relógio circadiano.

Recentemente, surgiu a abordagem de enzimas do sistema antioxidante participarem do controle de expressão de proteínas do ritmo circadiano. HIRAYAMA et al., (2007) demonstraram em *Danio rerio* que a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) está correlacionada com o controle do ritmo circadiano, sugerindo uma íntima ligação entre enzimas antioxidantes e componentes do ritmo circadiano endógeno.

A poluição por metais em sistemas aquáticos ocorre por muitos processos da indústria e agricultura (JAVED et al., 2015). A exposição a altas concentrações do metal leva à acumulação desses nos tecidos de peixes, de tal

forma que pode acarretar em reações que geram EROs, levando ao quadro de estresse oxidativo (FAROMBI et al., 2007). Entre os vários metais tóxicos, o cobre (Cu) é amplamente utilizado na aquicultura como bactericida e fungicida, sendo normalmente utilizado em concentrações muito acima das definidas pelas leis brasileiras (CONAMA, 2005; MACFARLANE et al., 1986; PAQUIN et al., 2002).

A consequente promoção do estresse oxidativo, acarretado pela contaminação por Cu, é bem reportado para organismos aquáticos (AKBARY et al., 2018; DÍAZ-DE-ALBA et al., 2018). A perturbação causada pela exposição ao sulfato de cobre (CuSO₄) em proteínas do sistema antioxidante, indica que este interfere com o funcionamento de algumas enzimas que atuam no combate às EROs. Perturbações na coordenação entre as enzimas SOD e CAT, demonstram a desregulação provocada pela exposição ao metal. Além disso, alterações na ritmicidade das duas enzimas antioxidantes corroboram com a hipótese de estar ocorrendo prejuízo entre a sincronização do organismo com o ambiente, devido a exposição ao Cu (DORIA, 2018).

N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante tiol, que pode agir através de vários mecanismos contra degeneração celular. Ele é um precursor para a síntese de glutathiona (GSH) e protege a célula de danos oxidativos por reagir diretamente com EROs (BANACLOCHA, 2001). Além disso, sua suplementação é considerada efetiva no tratamento de intoxicação aguda por metais pesados, tanto como um agente capaz de proteger o fígado e rim de danos, como promotor da eliminação do metal (KELLY, 2008).

O atual estudo busca demonstrar os efeitos da exposição aguda ao CuSO₄ em presença de um agente antioxidante que bloqueia ou reduz as alterações promovidas pelo contaminante em *D. rerio*. Como é conhecido, a desregulação que o cobre provoca nas enzimas está diretamente ligada à alteração do ciclo diário destas (DORIA, 2018). Assim, foi verificado se o padrão de atividade das enzimas SOD e CAT é restaurado quando da coexposição com NAC. Além disso, constatou-se se os níveis de GSH são aumentados quando da suplementação, o que pode indicar que o uso do antioxidante auxilia na defesa contra a desregulação desses biomarcadores, diminuindo os efeitos causados pelo Cu.

1. INTRODUÇÃO

1.1. RITMO CIRCADIANO

Ritmos circadianos são variações bioquímicas, fisiológicas ou comportamentais que oscilam em torno de 24 horas e que quase totalidade dos seres vivos apresentam (KULCZYKOWSKA et al., 2010). Devido à existência de ciclos geofísicos, criados pelo movimento periódico da Terra em torno de seu eixo e ao redor do Sol, desde a origem da vida, os organismos têm desenvolvido mecanismos que permitem estes se ajustarem a mudanças previsíveis do ambiente (VERAS et al., 2013).

É através de marcadores de tempo endógenos (*timekeepers*) que ocorre a sincronização entre organismo e ambiente. Estes são compostos por proteínas relógio que ciclam próximo de 24 horas. Porém, em última instância tanto periodicidade, amplitude e fase dos osciladores endógenos são arrastados por fatores ambientais, como ciclos diários de luz / escuridão (PANDO et al., 2001), temperatura (RENSING et al., 2002) e disponibilidade de alimento (MISTLBERGER et al., 2011). Estes osciladores exógenos, denominados *timegivers*, ajustam a percepção do tempo biológico, de modo que os organismos permanecem em fase com o meio em que vivem.

A característica básica dos ritmos biológicos é a de persistir mesmo em condições ambientais constantes, na ausência de qualquer estímulo externo direto. É através desse tipo de organização temporal endógena que é possível a adaptação e antecipação a ciclos ambientais da natureza, o que proporciona coordenação temporal para atividades fisiológicas e comportamentais ao organismo (KULCZYKOWSKA et al., 2010; ZELINSKI et al., 2014).

Tais ritmos são subordinados à maquinaria existente do relógio circadiano, que consiste em *loops* de *feedback* de transcrição e tradução intracelular envolvendo um conjunto de genes relógio. Esses componentes, que ciclam num intervalo de aproximadamente 24 horas, atuam se auto-regulando negativamente ou positivamente, de forma altamente sincrônica, contribuindo para conferir robustez e precisão sobre o mecanismo do relógio (LOWREY et al., 2000).

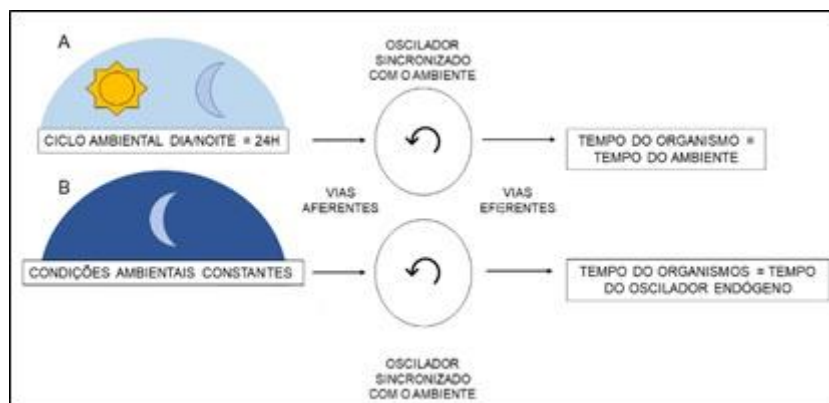


FIGURA 1: Modelo de funcionamento da ritmicidade circadiana. A - sincronizado com ciclos ambientais: O sinal externo (*zeitgeber*) é levado ao relógio endógeno por vias aferentes; esse, uma vez sincronizado, passa a informação para o resto do organismo por vias eferentes, gerando ritmos biológicos sincronizados em sua fisiologia geral. B - Sistema em livre-curso: expressa o período endógeno próprio. FONTE: modificado a partir de CECON & FLÔRES (2010).

1.2. SISTEMA ANTIOXIDANTE E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O oxigênio (O_2) é essencial para que organismos aeróbicos realizem vários processos metabólicos. No entanto, a dependência pelo O_2 leva inevitavelmente a produção de moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados, denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção de EROs é devido a redução incompleta que ocorre quando o oxigênio molecular consumido pela célula é reduzido a água, em processos acoplados à oxidação de alimentos e transformação de energia como, por exemplo, durante o transporte de elétrons (NORDBERG et al., 2001; LIVINGSTONE, 2001; HALLIWELL et al., 2007).

Essas moléculas são continuamente produzidas pelo metabolismo celular normal e desempenham papéis fisiológicos importantes na sinalização intracelular, regulação do estado redox (NORDBERG et al., 2001), controle da ventilação respiratória, apoptose, diferenciação e proliferação celular, aderência de leucócitos a células endoteliais ou mesmo na ativação da resposta imunológica específica contra patógenos no processo inflamatório (DRÖGE,

2002). Mais recentemente foi descrito, em *Danio rerio*, o controle do ritmo circadiano pelo peróxido de hidrogênio e da enzima que o degrada, a catalase (HIRAYAMA et al., 2007).

Os metabólitos do oxigênio como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), radical peroxil ($\cdot O_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são agentes citotóxicos que causam danos oxidativos atacando membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos nas células (LATCHOUMYCANDANE et al., 2002).

Peixes, como muitos vertebrados, tentam reduzir o dano causado pelo estresse oxidativo usando o sistema de defesa antioxidante. A primeira linha de defesa consiste em moléculas antioxidantes, como glutathiona (GSH), vitamina C e E, carotenóides (ALVAREZ et al., 2005). Outro mecanismo de defesa é composto de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), por exemplo (VALAVANIDIS et al., 2006).

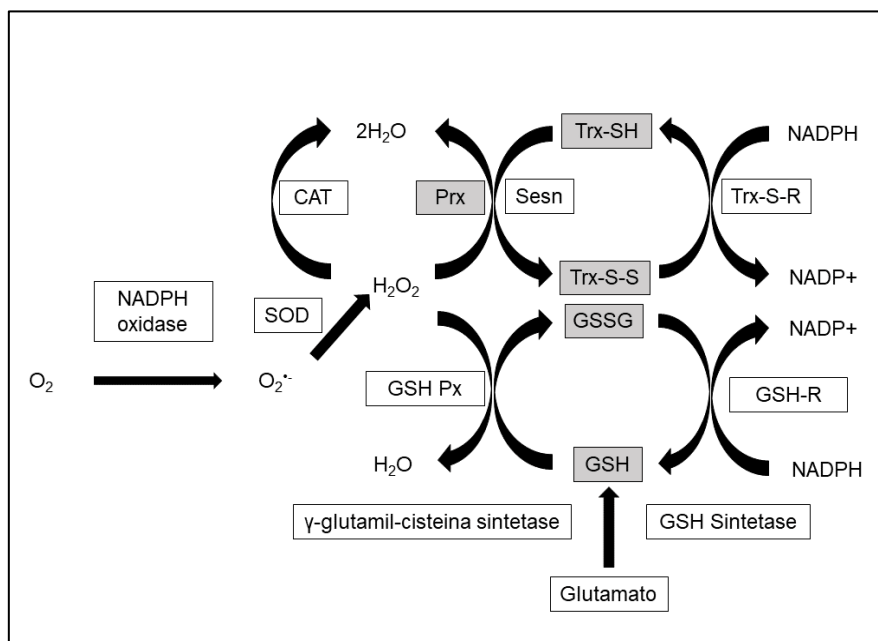


FIGURA 2: Detoxificação de ânion superóxido. $O_2^{\cdot-}$ gerado pelas células é convertido em peróxido de hidrogênio pela SOD. Na sequência, a CAT, PRX ou o sistema antioxidantes dependente de glutathiona continuam a redução do H_2O_2 . As enzimas antioxidantes estão em quadrados brancos, proteínas que servem como substrato para reações redox estão em quadrados cinzas. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GSH e GSSG: glutathiona reduzida e disulfeto; GSH Px e

GSH, R: glutathione peroxidase e redutase; Prx: peroxiredoxinas; Sesn: sestrin; Trx-H e Trx-SS: tioredoxina reduzida e oxidada; Trx-R: tioredoxina redutase. FONTE: modificado a partir de PATEL et al. (2014).

1.3. RITMO CIRCADIANO E PROCESSOS DE SINALIZAÇÃO REDOX

Ritmos diários de enzimas protetoras são descritos para vários organismos filogeneticamente distantes. Essa ligação entre o sistema circadiano e processos fisiológicos de sinalização redox celular decorre muito provavelmente do papel fundamental do ritmo circadiano na modulação de atividades diárias do organismo, como na alimentação, locomoção, atividade cerebral e ciclo sono-vigília (HARDELAND et al., 2003; PATEL et al., 2014).

De modo geral, as principais enzimas antioxidativas são rítmicas em vários organismos e tecidos, podendo ocorrer variações relativas à amplitude e fase. Isso decorre de 2-5% do oxigênio obtido pela respiração ser transitoriamente convertido em radicais livres. Assim, existe uma estreita ligação entre metabolismo e geração de EROs e que resulta num padrão temporal equivalente de produção de moléculas oxidantes (HARDELAND et al., 2003).

Essa relação, que tem origem na geração rítmica de oxidantes pelo organismo, é combatida por uma resposta equivalente da indução da defesa antioxidante (HARDELAND et al., 2003). Assim, as enzimas envolvidas com a cadeia de detoxificação das EROs são refinadamente coordenadas para combater intermediários metabólicos, seguindo uma sequência em que os produtos de uma reação servem como substrato na reação seguinte (PATEL et al., 2014).

Os dados revelam relação de ritmo desses componentes antioxidantes em múltiplos órgãos, como para glutathione reduzida (GSH), glutathione S-transferase (GST), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx), principalmente em fígado, estômago, rins e cérebro (HARDELAND et al., 2003). Ainda, HIDALGO et al., (2017) relata em fígado variações rítmicas diárias das enzimas antioxidante SOD e CAT em *Oncorhynchus mykiss* e *Acipenser naccarii*.

1.4. GLUTATIONA

A glutathiona, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A glutathiona reduzida, um composto que apresenta enxofre de baixo peso molecular, possui a capacidade de ser facilmente oxidado e de se regenerar rapidamente. Essas propriedades permitem que ele desempenhe um papel essencial em muitas reações químicas (JEFFERIES et al., 2003).

Como antioxidante, GSH desempenha papel eliminando diretamente radicais livres além de auxiliar na regeneração de outros antioxidantes celulares, como a vitamina E e ácido ascórbico. Também, GSH atua como doador de elétrons na redução de peróxidos, regulados pela glutathiona peroxidase (GPx), com a concomitante conversão na sua forma oxidada (GSSG). Para que ocorra a ciclagem da sua forma oxidada e reduzida, os níveis da glutathiona dependem tanto da regulação feita por enzimas (MEISTER & ANDERSON, 1983), como também dependem principalmente do balanço entre a taxa de síntese de GSH (pela glutamato : cisteína ligase, GCL), taxa de conjugação (pelas GSTs), taxa de oxidação (de forma não enzimática ou por GPx), e redução de GSSG a GSH (pela GR). A GCL (ou γ -glutamilcisteína sintetase) é uma enzima que catalisa o passo essencial da biossíntese de GSH, no qual o aminoácido L-cisteína está ligado ao L-glutamato. GR reduz GSSG em GSH, com a oxidação de NADPH a NADP⁺, que é reciclado pela via pentose fosfato (PENÃ-LLOPEZ et al., 2003).

A utilização da glutathiona e de enzimas que participam do seu ciclo catalítico podem indicar um desequilíbrio entre a formação e remoção das espécies reativas no organismo, devido a íntima associação com alterações dos estados antioxidantes e aumento do estresse oxidativo (JÚNIOR et al., 2001). Dessa forma, a quantificação de glutathiona pode indicar uma possível correlação entre a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, como a GPx, aumento nos níveis de bases de DNA lesadas e de dano as membranas lipídicas, devido ao estresse oxidativo.

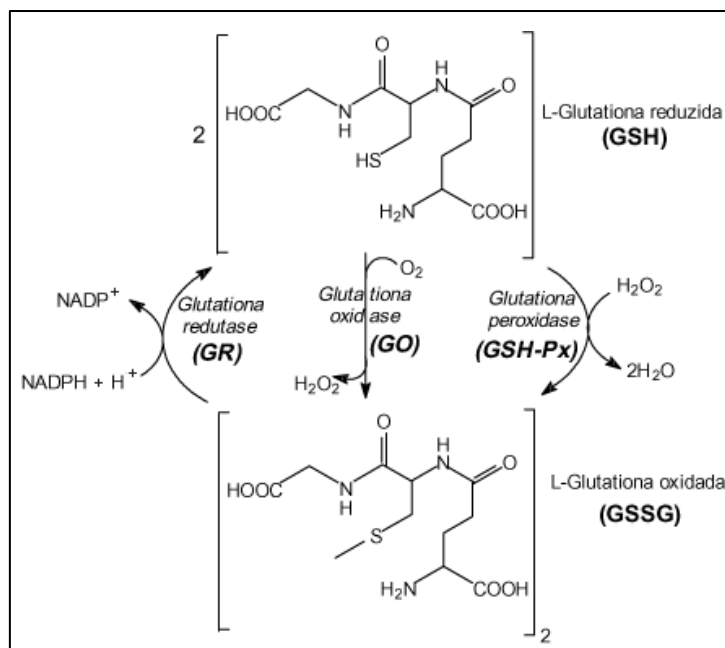


FIGURA 3: Interconversão de glutatona nas suas formas reduzidas (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GPx), glutatona oxidase (GO) e glutatona reductase (GR). FONTE: MEISTER et al., 1983.

1.5. COBRE

O cobre (Cu) é um elemento traço essencial para todos os organismos com inúmeras funções (BURKE & HANDY, 2005). Porém, em altas concentrações é considerado altamente tóxico, afetando o metabolismo dos organismos de múltiplas formas (CARVALHO & FERNANDES, 2008).

O estresse oxidativo é um dos mecanismos conhecidos de toxicidade do Cu em peixes (LUSHCHAK, 2011; 2016; GROSELL et al., 2012). Tanto íon cúprico (Cu²⁺) quanto cuproso (Cu¹⁺) podem participar de reações de oxidação e redução para formar radicais $\cdot\text{OH}$ através da reação de Haber-Weiss (BREMNER, 1998). O radical $\cdot\text{OH}$ é capaz de reagir com praticamente todas as biomoléculas (BUETTNER, 1993). Pode formar adutos com DNA (complexo Cu-DNA), radicais lipídicos ou reagir com proteínas (POWELL, 2000).

O cobre ocorre naturalmente de inúmeras maneiras, através de depósitos geológicos, atividade vulcânica, intemperismo e erosão de rochas e solos. Esses

níveis podem variar de 2 a 30 µg/L. Sendo um dos metais mais comuns que causam poluição, em áreas com atividade antrópica (agricultura e indústria) Cu pode estar presentes em concentrações tóxicas que variam de 50 a 560 µg/L. Particularmente, na aquicultura, nas formas de sulfato, hidróxido, oxicloreto, carbonato, citrato ou gluconato, é um componente de diversos fungicidas e bactericidas (Carvalho & Fernandes, 2008). Os níveis utilizados nessa atividade são bastante altos e variam muito, sendo encontrados relatos de 4.0 mg/L utilizado como bactericida (MACFARLANE et al., 1986) até 6000 mg/L como antifúngico (PAQUIN et al., 2002). No entanto, no Brasil, o CONAMA (2005) define o nível máximo permitido para o Cu dissolvido em águas destinadas ao abastecimento humano (Classe II) como 9 µg/L.

1.6. N-ACETILCISTEÍNA

N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante tiol, que pode agir através de vários mecanismos contra degeneração celular. Ele atua como precursor de síntese da glutathiona (GSH) fornecendo o aminoácido cisteína e estimulando a atividade de enzimas citosólicas envolvidas no ciclo de síntese, o que aumenta a taxa de regeneração de GSH (BANACLOCHA, 2001).

Outra função que NAC possui é regulando a expressão de genes que afetam as respostas mediadas pelo estresse oxidativo (ZAFARULLAH et al., 2003) e a atividade de enzimas antioxidantes (PASTOR et al., 1997). Além de atuar como agente imunomodulador, anti-inflamatório (URAZ et al., 2013) e de ser eficaz contra vários agentes cancerígenos (DE FLORA et al., 1985).

Embora possa eliminar diretamente as EROs, NAC reage muito lentamente com $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 em condições fisiológicas, comparado com a cinética de enzimas antioxidantes, como SOD e CAT. Dessa forma, seu papel nessas reações provavelmente não é essencial para o combate *in vivo*. Ainda assim, NAC pode reagir rapidamente com radicais altamente oxidantes como $\cdot OH$, $\cdot NO_2$ e $CO_3^{\cdot-}$; além de se ligar a íons metálicos redox-ativos (SAMUNI et al., 2013).

Como agente quelante, NAC se liga a íons metálicos através de sua cadeia lateral tiol. Ele consegue ligar com metais de transição, como Cu (II) e Fe (III) (ZHENG et al., 2010) e metais potencialmente tóxicos como Cd (II) (JALILEHVAND et al., 2011), Hg (II) (TRUMPLER et al., 2012) e Pb (II) (CHEN et al., 2012). Sendo relatado como agente capaz de proteger o fígado e rim de danos, promovendo a eliminação de metais tóxicos (KELLY, 1998), NAC forma estruturas complexas com íons metálicos, que são prontamente excretados do corpo, removendo-os dos espaços intracelulares ou extracelulares.

Muitos estudos dedicados a suplementação com NAC em peixes se concentraram, apenas, na investigação de seus efeitos protetores contra pesticidas (PENA-LLOPIS et al., 2003; SEVGILER et al., 2007; PUERTO et al., 2009; ÜNER et al., 2009; GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2012), com o enfoque da contaminação por metais tóxicos sendo pouco discutido. Os resultados mostram ação efetiva do NAC no combate, principalmente, contra intoxicação por compostos organofosforados. Em músculo e cérebro de *A. Anguilla* (PENA-LLOPIS et al., 2003), em fígado de *C. Capio* (SEVGILER et al., 2007), como também em cérebro de *C. carpio* (ÜNER et al., 2009) foram observados efeitos positivos quando da suplementação do NAC.

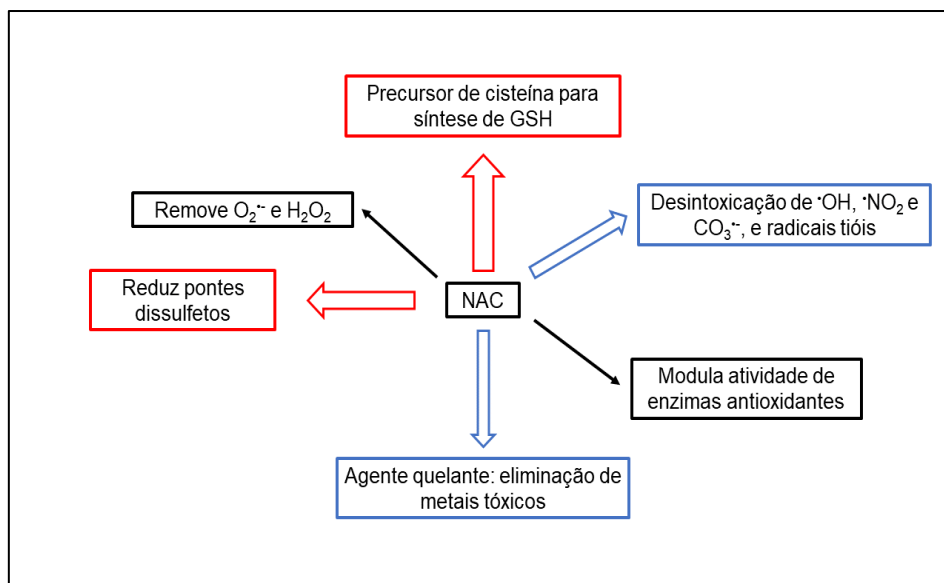


FIGURA 4: Rotas derivadas das atividades biológicas do NAC (cor vermelha - principais rotas, cor azul - rotas plausíveis, cor preta - rotas insignificantes sob condições fisiológicas). FONTE: Modificado de SAMUNI et al., 2013.

1.7. PEIXE-ZEBRE (*Danio rerio*)

O organismo estudado, peixe-zebra (*Danio rerio* Hamilton, 1822), é um teleósteo da família Cyprinidae, que se situa na ordem Cypriniforme. É um dos organismos modelos mais importantes em muitos campos de pesquisa, incluindo genética, neurociência, desenvolvimento, fisiologia, toxicologia e biomedicina, sendo frequentemente usado como modelo de muitas doenças humanas (LÓPEZ-OLMEDA & SÁNCHEZ-VÁSQUEZ, 2011). As características que favorecem seu estudo em diversas áreas pela comunidade científica, advém de ser um vertebrado diplóide com equilíbrio entre complexidade, por apresentar muitos aspectos encontrados em mamíferos, e simplicidade, devido sua anatomia e fisiologia básica (STREISINGER et al., 1981). Também, por já serem bem definidos os métodos de criação em laboratórios, apresentarem rápido ciclo de vida, seu pequeno tamanho e poderem ser facilmente mantidos em aquários o torna um modelo ideal (HILL et al., 2005). Ainda, o genoma de *D. rerio* apresenta alto grau de similaridade com os genomas de humanos e de camundongos, dispondo de sequência genética completa aliada ao crescente

volume de informações moleculares, genéticas e mutagênicas (BARBAZUK et al., 2000., BRIGGS, 2002., VATINE et al., 2011).

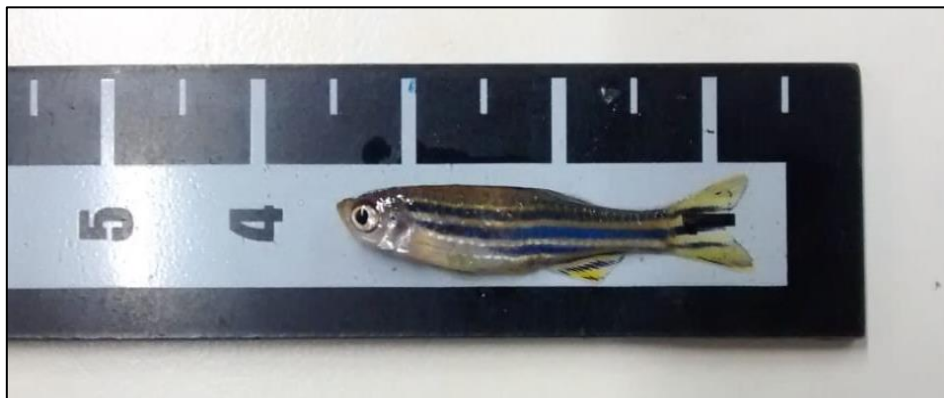


FIGURA 5: Exemplar de *Danio rerio* adulto.. Comprimento médio de 4,0 cm, e pesando aproximadamente 0,3 g. FONTE: O autor.

2. OBJETIVOS

A fim de verificar a desregulação no ritmo de proteínas do sistema antioxidante, o presente estudo buscou demonstrar os efeitos da exposição ao Cu, na forma de sulfato de cobre (CuSO_4), em presença de um agente antioxidante que bloqueia ou reduz os efeitos do contaminante. Foi proposto avaliar se as oscilações das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), além dos níveis do antioxidante GSH, são perturbadas pela exposição ao contaminante quando em coexposição ao N-acetilcisteína (NAC). Os resultados obtidos a partir da coexposição podem comprovar que a desregulação provocada pelo Cu nas enzimas está ligada à desordem do funcionamento do seu ciclo.

Assim, a partir da coleta de cérebro e fígado, num período de 24 horas, de *D. rerio* expostos de forma hídrica na concentração de 45 $\mu\text{g/L}$ de CuSO_4 e 1,0 mg/L de NAC, foi verificada a existência de desregulação no ritmo e período de maior atividade catalítica de SOD e CAT. Também, foi analisado se houve aumento nos níveis de GSH quando da suplementação do antioxidante NAC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DESENHO EXPERIMENTAL

Espécimes adultos de *Danio rerio* (comprimento médio de 4,0 cm, e pesando aproximadamente 0,3 g) foram obtidos a partir de uma piscicultura de peixes ornamentais (Lindóia Peixes; Muriaé-MG) e levados para o laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular da UFPR. Os peixes foram aclimatados durante duas semanas, permanecendo em condições controladas de temperatura e luz em ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro (LD). Para evitar que ocorra o comportamento de antecipação à comida, que é conhecidamente um *zeitgeber* do ritmo circadiano em *D. rerio* (LÓPEZ-OLMEDA et al., 2009) foi adotado um regime de alimentação aleatória, com ração Vipan SERA®. Os peixes foram divididos em três grupos, o controle (em que estavam ausentes as variáveis cobre e N-acetilcisteína), um grupo exposto apenas ao Cu (na concentração de 45 µg/L) e outro exposto ao Cu (45 µg/L) com a adição do N-acetilcisteína (1,0 mg/L). Em cada um dos grupos foram utilizados 4 aquários de 25-30L (Fig. 6).

Após o período de aclimação, ocorreu a exposição aguda ao contaminante (com exceção do controle) e ao antioxidante (grupo exposto ao CuSO₄ + NAC) que se deu via hídrica por 72 horas. Assim foi utilizada no experimento a concentração de 45 µg/L, que é duas doses acima do limite estipulado pelo CONAMA. Para a suplementação de NAC foi adotada a dose de 1,0 mg/L do antioxidante. A concentração foi baseada em experimentos na literatura que obtiveram resultados positivos na prevenção ao quadro de estresse oxidativo (MOCELIN et al., 2015; 2018). Para a contaminação foi usada uma solução mãe de sulfato de cobre (CuSO₄) e água deionizada de 1 mg/L de Cu preparada alguns minutos antes da exposição dos animais. O cobre foi adicionado aos aquários às oito horas da manhã, logo ao acender das luzes. Os peixes começaram a ser coletados de forma randômica ao fim de 72 horas de exposição. Na suplementação com NAC, devido a molécula se apresentar na forma de cristais com a propriedade de ser altamente solúvel em água (ATKURI et al., 2007), foi adotado a exposição direta por via hídrica. Na literatura não

existe nenhuma menção de interação entre o NAC e Cu quando da exposição simultânea de ambos em meio hídrico, dessa forma foi adotada a suplementação do antioxidante 72 horas antes da coleta. Um dia antes do início da coleta, os animais foram deixados em jejum, para evitar que ocorresse a contaminação por material do intestino nos órgãos coletados.

A coleta dos peixes se deu a cada 3 horas, iniciando no tempo zero (T0) às oito horas da manhã, e teve fim às cinco horas da manhã (T7) do outro dia, totalizando oito tempos de coleta. Assim, depois de anestesiados com eugenol e MS222 (1 gr/L), foram coletados 15 organismos em cada tempo de coleta por ciclo, sendo retirados o fígado e cérebro de todos os peixes em cada tempo para posterior análise. Os tecidos destinados para os ensaios de atividade enzimática foram prontamente armazenados em nitrogênio líquido ou gelo seco até o fim do período de coleta e então transferidos para freezer -80 °C até o processamento. As atividades enzimáticas, de CAT e SOD, e o níveis de GSH foram medidos tanto no cérebro quanto no fígado.

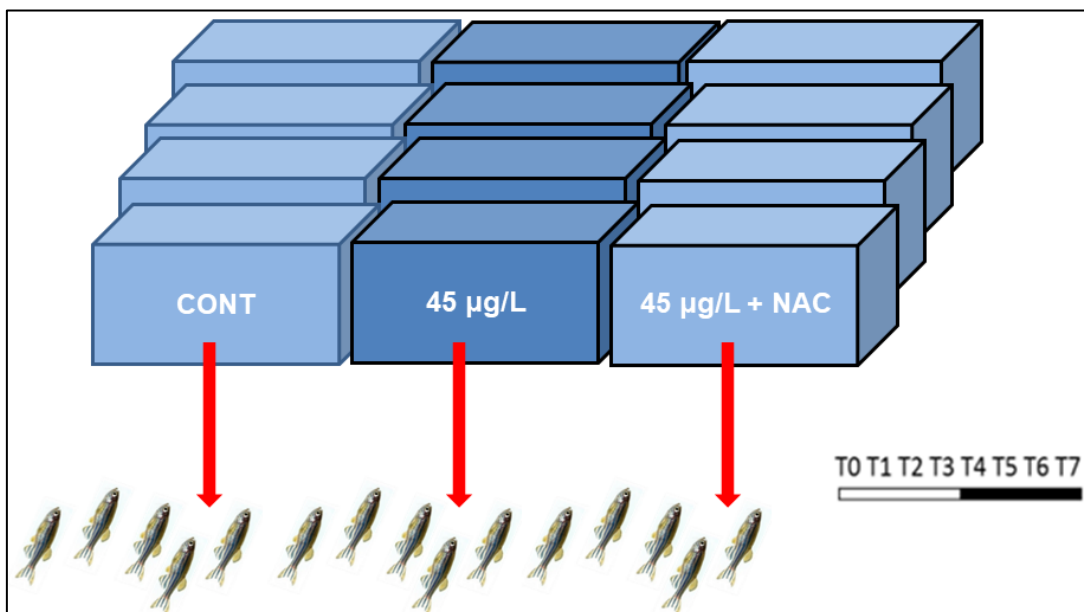


FIGURA 6: Esquema do desenho experimental. Os peixes *Danio rerio* formaram três grupos: CONT- grupo controle; 45 µg/L – grupo exposto ao CuSO₄ (45 µg/L); NAC - grupo exposto ao CuSO₄ (45 µg/L) e suplementados com N-acetilcisteína (1.0 mg/L). Os organismos foram mantidos em aquários sob condições controladas até o fim do experimento. Sendo após

coletados nos tempos T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7 em ciclo claro/escuro com duração de 24 horas. Os organismos foram retirados randomicamente de todos os aquários em todos os tempos de coleta.

3.2. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Um pool de cinco animais foi homogeneizado em 300 µl de tampão Tris-HCl, pH 7,2 para fígado, enquanto para cérebro em 150 µl do mesmo tampão. Os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 4 °C, a 12.000 RCF. Alíquotas dos sobrenadantes foram primeiramente analisadas pelo método de BRADFORD (1976) para normalização de concentração de proteínas para as análises bioquímicas, utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como padrão. Em seguida, os seguintes biomarcadores foram analisados:

- Atividade de SOD: realizada pelo método proposto por KONO et al. (1978), que se baseia na capacidade da SOD em inibir a redução do NBT (p-nitro blue tetrazolium chloride) para formazan pelo $O_2^{\cdot-}$ gerado pela hidroxilamina em solução alcalina. As amostras foram normalizadas para 0,2 mg/ml de proteína para fígado e 0,5 mg/ml de proteína para cérebro e então foi adicionado etanol de modo que ficassem com concentração de 25% desse último; as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos a 12.000 x g. Na microplaca foi adicionado o “branco” (15 µl de etanol) e 15 µl das amostras do sobrenadante centrifugado. Após, 70 µl da solução de NBT 285 mM e EDTA 0,05 mM foram acrescentadas. Por último, adicionou-se 100 µl de tampão carbonato de sódio (182 mM, pH 10,2) e hidroxilamina 67 mM para iniciar a reação. Todas as soluções foram mantidas a 27 °C em banho-maria. A leitura foi feita a 560 nm em espectrofotômetro com temperatura constante de 27 °C logo após a pipetagem, em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos. A atividade enzimática foi expressa em U/mg proteína.
- Atividade de CAT: realizada baseada no método descrito por AEBI (1984) que mensura a atividade da catalase através do consumo de peróxido de

hidrogênio. As amostras foram normalizadas em 0,2 mg/ml de proteína para fígado e 0,5 mg/ml de proteína para cérebro. A análise foi realizada em microplaca especial para leitura na faixa UV com 96 poços; nesta foram adicionados 5 µl das amostras de fígado e 215 µl de meio de reação (2,5 ml de tampão Tris-HCl 1,0 M EDTA 5,0 mM em pH 8,0; 47,32 ml de água; 180 µl de H₂O₂). Como a atividade da catalase é uma reação enzimática rápida, a pipetagem e leitura em 240 nm foi realizada de coluna em coluna da microplaca. A atividade enzimática foi expressa em µml/min/mg proteína.

- Concentração de tióis não protéicos (glutationa e outros tióis): segundo método proposto por SEDLAK e LINDSAY (1968) que se baseia na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não protéicos com o Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) gerando um produto que absorve luz a 415 nm. Em 100 µl do sobrenadante (previamente homogeneizado, centrifugado e congelado), das amostras de fígado e cérebro, foi adicionado 50 µl de ácido tricloroacético (25%) e centrifugado a 5.000 x g. Na microplaca foi adicionado, em triplicata, 50 µl do “branco” (50 µl de ácido tricloroacético em 200 µl de PBS), 50 µl da curva-padrão (diluição em série da solução de GSH em tampão tris-base 0,4 M pH 8,9) e 50 µl do sobrenadante. Após, foi pipetado em todos os poços 230 µl de Tampão tris-base 0,4 M pH 8,9 e em seguida, 20 µl da solução de DTNB. Aguardou-se 5 a 10 minutos antes da leitura, sendo esta feita a 415 nm. A concentração de tióis foi expressa em nanomoles de tióis x mg de proteína⁻¹.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises das atividades enzimáticas foram expressos como média ± erro padrão da média. A normalidade dos dados foi testada com o teste de Kolmogorov–Smirnov. Utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Bonferroni. Para confirmação da existência de ritmicidade circadiana foi usado o Software Acro (disponível em:

<http://www.circadian.org/software.html>). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.4 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O projeto atende às normativas éticas nacionais e internacionais, sendo que todos os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/ BIO – UFPR). Certificado Nº 962; Processo Nº 23075.118616/2016-33.

4. RESULTADOS

Nenhuma mortalidade ou patologia foi observada durante todo o experimento realizado. Os tempos nos gráficos estão representados com as horas após o acender das luzes. Assim, T0 é o exato momento em que as luzes se acendem e T12 quando elas se apagam.

Os resultados obtidos quando comparado o grupo controle com o exposto ao contaminante, indicam a desregulação causada pelo sulfato de cobre, em ambas as enzimas antioxidantes. Para os dois órgãos, fígado e cérebro, se observaram alterações tanto no ritmo e horário de maior atividade catalítica (FIGURA 7 e 8). Quando foi comparada a resposta no grupo suplementado com o antioxidante NAC, se observou que o padrão de atividade foi retomado parcialmente, tanto para SOD como para CAT (FIGURA 7 e 8). Isso porque os picos de maior atividade foram retomados, porém a ritmicidade das enzimas não foi alterada. Já a concentração nos níveis de GSH foram aumentadas significativamente nesse mesmo grupo, quando comparado aos organismos controle. Os resultados estão apresentados mais detalhadamente a seguir.

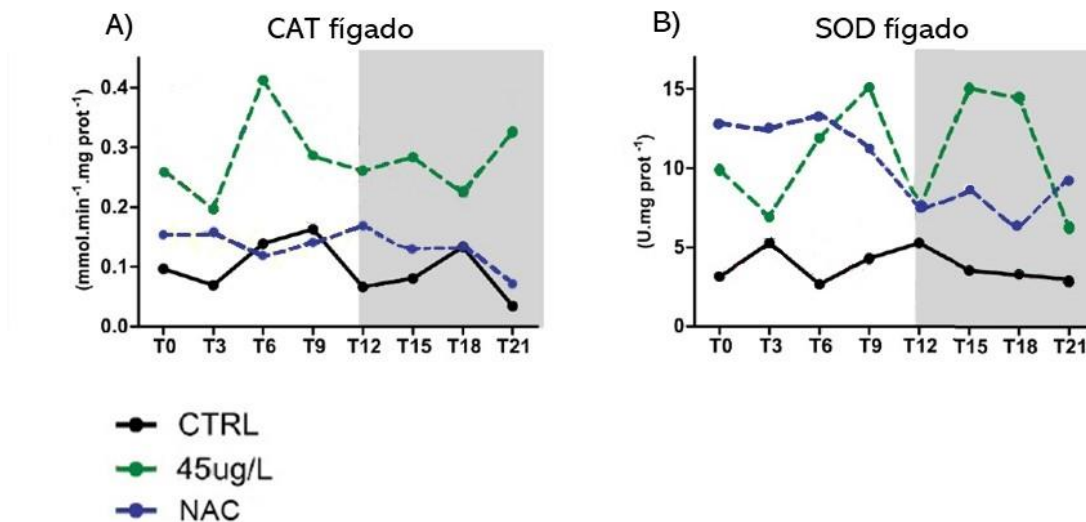


FIGURA 7: Respostas biológicas da defesa antioxidante encontradas em fígado dos peixes *Danio rerio*. A área em cinza representa o período escuro. CTRL - grupo controle (linha preta); 45 $\mu\text{g/L}$ - grupo exposto ao CuSO_4 na concentração de 45 $\mu\text{g/L}$ (linha verde); NAC - grupo exposto ao CuSO_4 na concentração de 45 $\mu\text{g/L}$ e coexposto ao N-acetilcisteína (1,0 mg/L) (linha azul). Estão representadas as atividades das enzimas CAT e SOD, em A e B, respectivamente.

Para os organismos do grupo controle, a atividade da CAT não apresentou ritmicidade circadiana em fígado. Sendo observado um pico de maior atividade às 17:00 horas (Fig. 7a). Já a atividade da SOD no mesmo órgão, exibe ritmo circadiano, com acrofase ocorrendo às 09:15 horas (Fig. 7b).

Quando expostos à concentração de 45 $\mu\text{g/L}$ de cobre, o mesmo órgão apresenta evidências de perturbação no padrão de 24 horas de CAT, sendo observado ritmo circadiano, com acrofase ocorrendo às 15:30 horas (Fig. 7a). A atividade catalítica de SOD foi arrastada para o período da tarde, quando comparado com o controle. Sendo que houve ritmo circadiano da enzima, com a acrofase às 17:00 horas (Fig. 7b).

No grupo exposto ao CuSO_4 (45 $\mu\text{g/L}$) e coexposto ao N-acetilcisteína (1,0 mg/L), se observou o restabelecimento parcial no padrão de atividade da CAT em fígado. Tendo sido o pico de maior atividade retomado, novamente, no horário da tarde, às 13:42 horas (Fig. 7a). A atividade da SOD também apresentou ritmo circadiano, como nos grupos anteriores, com a acrofase às

11:00 horas (Fig. 7b). Ambos os horários de pico são relativamente próximos com aqueles observados no grupo controle.

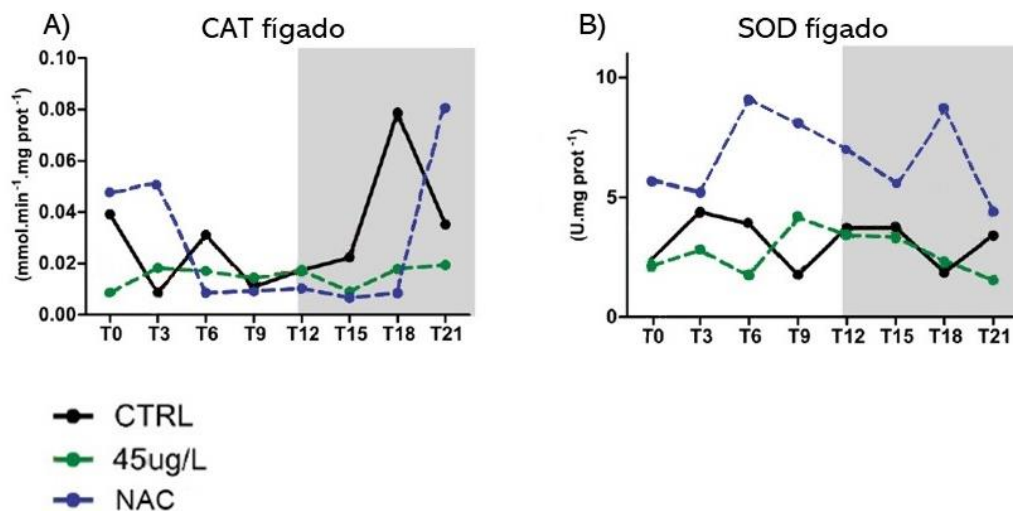


FIGURA 8: Respostas biológicas da defesa antioxidante encontradas em cérebro dos peixes *Danio rerio*. A área em cinza representa o período escuro. CTRL - grupo controle (linha preta); 45 µg/L - grupo exposto ao CuSO₄ na concentração de 45 µg/L (linha verde); NAC - grupo exposto ao CuSO₄ na concentração de 45 µg/L e coexposto ao N-acetilcisteína (1,0 mg/L) (linha azul). Estão representadas as atividades das enzimas CAT e SOD, em A e B, respectivamente.

Em cérebro, a resposta da CAT no grupo controle também não foi ritmica, como observado em fígado. Com pico de maior atividade às 14:00 horas (Fig. 8a). Para SOD, no mesmo grupo, a atividade da enzima apresentou ritmo circadiano com acrofase às 10:42 horas (Fig. 8b).

No grupo exposto apenas ao sulfato de cobre, também em cérebro, a atividade catalítica da CAT apresentou ritmo circadiano, com acrofase às 03:12 horas (Fig. 8a). Já em SOD, a enzima não apresentou ritmo diário na sua atividade, sendo detectado pico às 17:00 horas antes do apagar das luzes (Fig. 8b).

Quando da contaminação pelo CuSO₄ em coexposição com NAC, a resposta enzimática de CAT continuou aritmica. Com pico da atividade

ocorrendo às 19:00 horas (Fig. 8a). Para SOD, não foi encontrado o mesmo padrão circadiano visto no controle, sendo o pico de maior atividade ocorrendo às 14:40 horas (Fig. 8b).

Enzima / órgão	Horário acrofase		
	CONTROLE	COBRE 45 µl	COBRE + NAC
CAT fígado	—	15:30 h	—
SOD fígado	9:15 h	17:00 h	11:00 h
CAT cérebro	—	3:12 h	—
SOD cérebro	10:42 h	—	—

Tabela 1: Acrofase encontrada em *Danio rerio*, no período de 24 horas, para CAT e SOD. CONTROLE- grupo controle não exposto a nenhuma das variáveis; COBRE 45 µg/L – grupo exposto ao cobre na concentração de 45 µg/L; COBRE + NAC - grupo exposto ao cobre na concentração de 45 µg/L e coexposto ao N-acetilcisteína (1,0 mg/L); — : representa ausência de ritmo. Estão representadas as atividades das enzimas CAT e SOD em fígado e em cérebro.

Na tabela 1 estão resumidos todos os horários que ocorreram a acrofase nos três grupos, tanto para fígado como para cérebro. Mostrando as alterações causadas pelo cobre no grupo exposto ao contaminante e a restauração parcial, quando da suplementação com NAC, como observado no grupo controle.

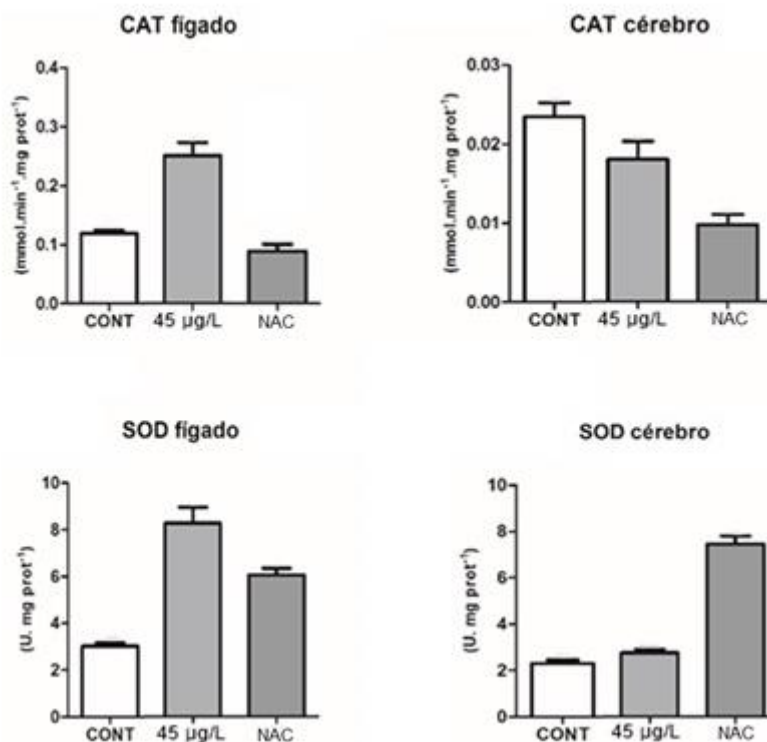


FIGURA 9: Comparação das respostas biológicas gerais da defesa antioxidante encontradas em fígado e cérebro dos peixes *Danio rerio*. CONT- grupo controle não exposto a nenhuma das variáveis; 45 µg/L – grupo exposto ao cobre na concentração de 45 µg/L; NAC - grupo exposto ao cobre na concentração de 45 µg/L e coexposto ao N-acetilcisteína (1,0 mg/L). Estão representadas as atividades das enzimas CAT e SOD em fígado e em cérebro na primeira e segunda coluna, respectivamente.

Quando foram comparadas as respostas dos grupos expostos ao CuSO₄ e suplementados com NAC, sem considerar os horários de coleta, se observa aumento na resposta catalítica nos organismos expostos ao Cu, sendo melhor visualizado no fígado. No grupo coexposto ao NAC alterações no nível de atividade em ambas as enzimas foram verificados, quando comparado ao grupo contaminado.

Em fígado, a atividade da SOD e CAT aumenta no grupo exposto ao contaminante, em relação ao controle. Já em cérebro, não foi possível observar o mesmo padrão esperado de resposta, sendo tal variação não significativa. Se constata o decréscimo na CAT e o aumento nos níveis de SOD, em ambos os órgãos, no grupo coexposto ao NAC (FIGURA 10). Em cérebro, assim como

ocorrido com o grupo tratado com o Cu, os níveis de atividade de ambas as enzimas não proporcionou o mesmo padrão observado para fígado (FIGURA 10).

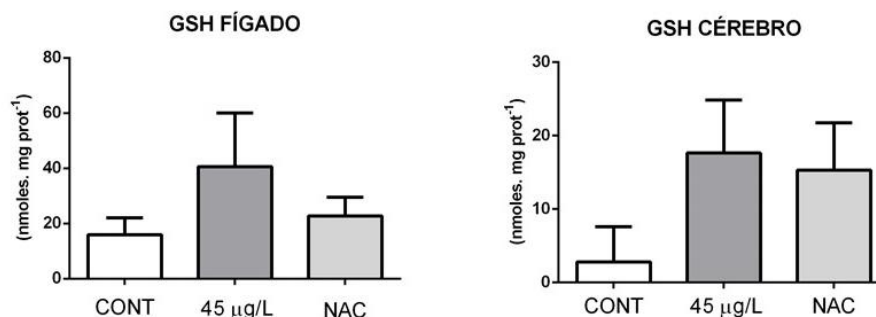


FIGURA 10: Comparação das respostas biológicas gerais da defesa antioxidante encontradas em fígado e cérebro dos peixes *Danio rerio*. CONT- grupo controle não exposto a nenhuma das variáveis; 45 µg/L – grupo exposto ao cobre na concentração de 45 µg/L; NAC - grupo exposto ao cobre na concentração de 45 µg/L e coexposto ao N-acetilcisteína (1,0 mg/L). Estão representadas as concentrações de tióis não protéicos (GSH), em fígado e cérebro, respectivamente.

Por fim, as concentrações de tióis não protéicos, compostos principalmente pela glutathiona (GSH), foram aumentadas nos grupos expostos ao CuSO₄ quando comparados a resposta do controle. Tanto em fígado quanto em cérebro se observaram alterações significativas ocasionadas pela contaminação por Cu (FIGURA 11). Já na resposta dos organismos coexpostos ao NAC, se verifica a indução dos níveis de GSH, em ambos os órgãos. Com a resposta sendo mais acentuada em cérebro, quando comparada ao controle (FÍGURA 11).

5. DISCUSSÃO

Mudanças significativas na atividade das enzimas antioxidantes puderam ser constatadas quando da exposição aguda a 45 µg/L de CuSO₄. Para ambos os tecidos analisados foram observadas alterações tanto na ritmicidade, amplitude e acrofase em CAT e SOD.

A atividade da SOD, em fígado e cérebro, apresenta ritmo circadiano com acrofase às 9:15 e 10:42h respectivamente, no grupo controle. Já quando da exposição ao contaminante, se observa atividade com ritmo circadiano apenas em fígado, com a acrofase sendo atrasada para às 14:00h. Como SOD é a primeira linha de defesa contra radicais livres, variações na sua atividade, no decorrer do período de 24 horas, protegem o organismo de danos causados pelos altos níveis de EROs (HARDELAND et al., 2003; KONDRATOV, 2007). Assim, Cu altera primeiro o funcionamento de SOD, mudando o padrão de atividade durante o período de 24 horas. Esse resultado fica mais claro quando comparado a resposta enzimática sem ser considerado o horário de coleta. Ocorrendo a indução nos níveis de atividade em fígado, provocada pela exposição ao Cu. Em estudo recente com robalo (*Dicentrarchus labrax*), DÍAZ-DE-ALBA et al (2017) observaram em três órgãos (músculo, brânquia e fígado) o aumento da atividade de SOD, estimulado por Cu. O mesmo ocorreu com *Gasterosteus aculeatus*, em que houve a indução nos níveis hepáticos da enzima (SANCHEZ et al., 2005). Além disso, a mudança no padrão de atividade da SOD, verificada no atual experimento, pode estar relacionada ao maior custo energético dos organismos em resposta a contaminação. Trabalhando com o mesmo modelo, DORIA (2018) verificou aumento nos níveis de ATP intracelulares concomitantes a maior atividade da SOD. Esses resultados demonstram que a exposição ao cobre pode contribuir com um pequeno aumento do custo energético do organismo e estar ativando a primeira linha de defesa contra as EROs.

Para a CAT, em condições ideais, apesar de não ser observada ritmicidade circadiana em nenhum dos órgãos analisados, em fígado, um pico de atividade foi verificado, ocorrendo ao final da tarde às 17:00h, sendo antecipado ao horário de acrofase da SOD. No grupo exposto ao contaminante, além das perturbações observadas no decorrer de 24 horas, em fígado, a enzima apresentou ritmo circadiano, com acrofase às 15:30h. CAT em associação com

outras enzimas antioxidantes (peroxidases, superóxido dismutase) é capaz de remover, neutralizar, ou eliminar óxidos intermediários e atua, em conjunto com o ciclo redox de GSH, como o sistema primário de defesa enzimática celular contra o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dessa forma, sua atividade responde diretamente aos níveis de H_2O_2 , e como Cu participa diretamente das reações de Fenton e Haber Weiss, catalisando a geração de produtos altamente reativos dentro da célula (REGOLI et al., 2014), a indução provocada por Cu nos níveis de produção de EROs pode interferir na atividade da CAT, sendo observadas alterações na ritmicidade e horário de maior atividade da enzima.

Como já discutido, SOD e CAT são importantes para controlar a produção em excesso de pró-oxidantes e sua coordenação é essencial para manter a homeostase do sistema antioxidante. Ainda, oscilações na atividade enzimática atuam para combater a geração rítmica de oxidantes no organismo (HARDELAND et al., 2003; PATEL et al., 2014). Se observou que o pico de maior atividade da SOD, que se antecipa a acrofase da CAT no grupo controle, visualizado no tecido hepático, é perdido quando da exposição ao contaminante. Esse desacoplamento pode estar indicando alterações na sincronização entre as enzimas, que é essencial para o funcionamento ideal do sistema antioxidante, e pode estar acarretando prejuízo no combate as EROs, com provável dano ao organismo devido ao quadro de estresse oxidativo.

A depleção de glutathiona é considerada um biomarcador de estresse ambiental, como acontece em peixes estressados por poluentes químicos ou naturais (CHATTERJEE & BHATTACHARYA, 1983, ALLEN et al., 1988, GALLAGHER et al., 1992, HASSPIELER et al., 1994, ALMAR et al., 1998, VAGLIO & LANDRISCINA, 1999, PEÑA-LLOPIS et al., 2001). Por possuir papel fundamental no combate as EROs (por exemplo, na reação catalisada por GPx) a relação entre o estado reduzido e oxidado da glutathiona, a razão GSH/GSSG, ou seu status redox podem ser considerados um índice do status redox celular e um biomarcador de dano oxidativo (PEÑA-LLOPIS et al., 2003). O atual estudo demonstrou o contrário, a exposição ao $CuSO_4$ induz ao aumento tanto dos níveis hepáticos como cerebrais de GSH quando comparado ao controle. Este aumento na síntese de glutathiona pode estar ocorrendo devido a interação do contaminante com a enzima GSL (que atua em sua biossíntese). A exposição ao

Cu aumenta a atividade catalítica da GSL, e conseqüentemente eleva GSH além dos níveis de controle, como é observado em outros estudos com peixes (STEIN et al., 1992, HASSPIELER et al., 1994, PEÑA et al., 2000, PEÑA-LLOPIS et al., 2001). Vários trabalhos demonstram os efeitos protetores do NAC contra os processos de estresse oxidativo por meio de um aumento na síntese de glutathiona (PENA-LLOPIS et al., 2003; GUTIÉRREZ-PRAENA et al., 2012). Além disso, a suplementação do antioxidante previne a oxidação de GSH, causa aumento da relação GSH/GSSG e reduz os níveis de GSSG (ÜNER et al., 2009). No atual trabalho, se observou que o uso do NAC melhora os níveis de glutathiona, em ambos os órgãos, demonstrando seu efeito protetor. Em modelo teleósteo, doses mais elevadas de NAC aumentaram a ação redox-redutora de GSH, tanto em cérebro quanto em fígado de *C. carpio*. (SAVGILER et al., 2007; ÜNER et al., 2009).

Quando foi analisada a resposta no decorrer de 24 horas, se verificou ação protetora parcial do NAC contra a promoção pró-oxidante do CuSO_4 nos organismos suplementados com o antioxidante. Neste grupo, apenas a SOD em fígado apresentou ritmo circadiano, não sendo observada ritmicidade na enzima CAT em ambos os órgãos. Porém, o padrão de maior atividade catalítica das duas enzimas foi restaurado, como verificado no grupo controle. Sendo que para CAT, em fígado, o pico de maior atividade se deu novamente no horário da tarde às 13:42h e, em cérebro, no final da tarde às 19 horas. Para a SOD foi encontrado padrão circadiano, apenas em fígado, com a acrofase no órgão ocorrendo às 11:00h da manhã e em cérebro às 14:40h da tarde. A ação protetora do N-acetilcisteína reside em suas propriedades antioxidantes. Em menor grau reduzindo diretamente radicais livres e pró-oxidantes, como $\text{OH}\cdot$ e H_2O_2 , mas também servindo como fonte de cisteína para síntese de glutathiona, além de ser um agente quimioprotetor contra os efeitos tóxicos de muitos compostos (MCLELLAN et al. 1995, GILLISSEN et al., 1997). Estudos recentes também reportam que o tratamento com NAC pode reverter o quadro de estresse oxidativo em ratos e hamsters expostos a outro metal tóxico, chumbo (ERCAL et al., 1996, GURER et al., 1998). O mesmo pode ser observado para células neurais de ratos, em que a coexposição do NAC com Cu protegeu as culturas

contra o quadro de estresse oxidativo causado pela geração de radicais tiol (STELMASHOOK et al., 2017).

Mesmo não sendo observado o restabelecimento completo da ritmicidade para os dois órgãos analisados, quando foram comparadas as respostas enzimáticas, sem ser considerado o horário de coleta, os níveis de atividade da SOD aumentaram e os da CAT diminuíram em decorrência à suplementação com NAC. Apesar do padrão não ser bem estabelecido para o cérebro, em fígado a resposta é melhor visualizada. Esse aumento na atividade da SOD e decréscimo na atividade da CAT pode estar correlacionado com o conteúdo de GSH, isso devido ao NAC atuar como precursor de síntese da glutathiona, regenerando os níveis de GSH (BANACLOCHA, 2001). Segundo WINTERBOURN (1993), a indução da SOD causada pelos níveis de GSH decorre da atuação em conjunto dos dois componentes do sistema redox para prevenir o dano oxidativo. Nessa proposta, radicais gerados biologicamente (R^{\cdot}) oxidam GSH, que forma radicais tióis (GS^{\cdot}). Este produto não é biologicamente benigno e pode sofrer reações potencialmente prejudiciais para a célula. A reação de GS^{\cdot} com o ânion glutathiona (GS^-) produz o ânion radical glutathiona dissulfeto ($GSSG^{\cdot-}$), que por sua vez, reduz o oxigênio molecular, formando ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e glutathiona dissulfeto (GSSG). Em esforço conjunto, a SOD catalisa a dismutação do superóxido, que serve como seu substrato, encerrando o radical livre gerado biologicamente. Além disso, a produção excessiva de radicais $O_2^{\cdot-}$ pode inibir a atividade da CAT (KONO e FRIDOVICH, 1982). Devido a necessidade de síntese proteica contínua para manter sua atividade catalítica, sob condições de estresse, como na exposição ao Cu que prejudica a síntese de proteínas, se observa uma diminuição na atividade da CAT, que pode ser acompanhada por maior teor de GSH.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do atual projeto mostraram que a exposição aguda ao $CuSO_4$ modifica o funcionamento do sistema antioxidante em *D. rerio*. Tanto em fígado como em cérebro, foram observadas alterações no período de 24 horas do ritmo das enzimas CAT e SOD. O que pode indicar a ocorrência de dano

devido ao quadro de estresse oxidativo. Além disso, quando foram comparados os níveis de GSH, a presença do contaminante aumenta suas concentrações em ambos os órgãos. Isso, devido ao Cu interagir com a enzima GSL, que atua em sua síntese, e conseqüentemente eleva GSH além dos níveis de controle.

O estudo também mostrou que a suplementação com NAC (1.0 mg/L) protege de forma parcial os organismos contra a promoção pró-oxidante do CuSO₄ nos peixes coexpostos ao antioxidante. Isso porque, os picos de maior atividade foram retomados, porém o ritmo das enzimas não se alterou. Também foi possível verificar a partir das respostas enzimáticas, sem ser considerado o tempo de coleta, aumento da SOD e decréscimo da CAT. Essas alterações podem estar correlacionadas com o conteúdo de GSH, induzido pela suplementação com NAC. Esses resultados comprovam que a desregulação provocada por Cu nas enzimas está relacionada à desregulação do ritmo das proteínas. Dessa forma, o uso do NAC pode auxiliar na proteção contra a desregulação desses biomarcadores, diminuindo os efeitos causados pelo Cu, principalmente aumentando os níveis de GSH, mas também auxiliando ao nível de atividade enzimática das proteínas do sistema antioxidante.

7. BIBLIOGRAFIA

AEBI H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, 105:121-126, 1984.

AKBARY P., SARTIPI Y., SAHAR., JAHANBAKHSI A. Hematological, hepatic enzymes' activity and oxidative stress responses of gray mullet (*Mugil cephalus*) after sub-acute exposure to copper oxide. **Environmental Science and Pollution Research**, 25(2): 1800-1808, 2018.

ALLEN P., MIN S.Y., KEONG W.M. Acute effects of mercuric chloride on intracellular GSH levels and mercury distribution in the fish *Oreochromis aureus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, 40: 178-184, 1988.

ALMAR M., OTERO L., SANTOS C., GONZALEZ G. J. Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. **J. Environ. Sci. Health**, 33B: 769-783, 1998.

ALVAREZ R. M., MORALES A. E., SANZ A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. **Rev. Fish Biol. Fisher**, 15: 75-88, 2005.

- ATKURI R. J., MANTOVANI J. J., LEONARD A HERZENBERG A. L. N-Acetylcysteine—a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. **Current Opinion in Pharmacology**. 7: 355-359, 2007.
- BANACLOCHA M. M. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. **Medical hypotheses**, 56(4): 472-7, 2001.
- BARBAZUK W.B., KORF I., KADAVI C., HEYEN J., TATE S., WUN E., BEDELL J.A., MC PHERSON J.D., JOHNSON S.L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Res**. 10: 1351-1358, 2000.
- BRADFORD, M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248–254, 1976.
- BREMNER I. Manifestations of copper excess. **Am. J. Clin. Nutr.**, 67(5):1069S–1073S, 1998.
- BRIGGS J. P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. **American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology**. 282: R3–R9, 2002.
- BUETTNER G. The packing order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. **Arch Biochem Biophys**, 300(2):535–543, 1993.
- BURKE J., HANDY R. D. Sodium-sensitive and -insensitive copper accumulation by isolated intestinal cells of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **J Exp Biol**, 208(2):391–407, 2005.
- CARVALHO C. S., FERNANDES M. N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp Biochem Physiol**, A 151(3):437–442, 2008.
- CHATTERJEE S., BHATTACHARYA S. Ammonia-induced change in the hepatic glutathione level of an air-breathing freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) **Toxicol. Lett.**, 17: 329-333, 1983.
- CHEN W. Q., ERCAL N., HUYNH T., VOLKOV A., CHUSUEI C.C. Characterizing N-acetylcysteine (NAC) and N-acetylcysteine amide (NACA) binding for lead poisoning treatment. **J. Colloid Interface Sci.**, 371:144-149. 2012.
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução no. 357, de 17 de março de 2005. **Ministério do Meio Ambiente**, 23. 2005.
- CRAIG P. M., CLELLAND G. B. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **Am J Physiol: Regul Integr Comp Physiol**, 293:1882-1892, 2007.
- CECON E., FLORES D. E. F. L. Regulação da expressão gênica nas engrenagens do relógio circadiano em mamíferos. **Revista da Biologia – USP**, 4: 28–33, 2010.

CRAIG P. M., WOOD C. M., MCCLELLAND G. B. (2007) Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 293 (5): 1882–R1892, 2007.

DE FLORA S., BENNICELLI C., CAMOIRANO A., SERRA D., ROMANO M., ROSSI G.A., et al. In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. **Carcinogenesis**, 6: 1735-1745, 1985.

DÍAZ-DE-ALBA M., CANALEJO R. A., GRANADO-CASTRO M. D., OLIVA R. M., EL MAI B., CÓRDOBA G. F., TROYANO-MONTORO M., ESPADA-BELLIDO, E., TORRONTERAS S. R. GALINDO-RIAÑO M. D. Biomarker responses of Cu-induced toxicity in European seabass *Dicentrarchus labrax*: Assessing oxidative stress and histopathological alterations. **Marine Pollution Bulletin**, 124(1): 336-348, 2017.

DORIA H. B. Time Does Matter! Acute Copper Exposure Abolishes Rhythmicity of Clock Gene in *Danio rerio*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 155: 26-36, 2018.

DUMAS B., HARDING H. P., CHOI H. S., LEHMANN K. A., CHUNG M., LAZAR M. A., MOORE D. D. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to Rev-Erb. **Mol Endocrinol**, 8:996–1005, 1994.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, 82: 47–95, 2002.

ERCAL N., TREERATPHAN P., LUTZ P., HAMMOND T. C., MATTHEWS R. H. N-acetylcysteine protects Chinese hamster ovary (CHO) cells from lead-induced oxidative stress. **Toxicology**, 108: 57-64, 1996.

FAROMBI E. O., ADELOWO O. A., AJIMOKO Y. R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, 4: 158-165, 2007.

FORMAN B. M., CHEN J., BLUMBERG B., KLIEWER S. A., HENSHAW R., ONG E. S., EVANS R. M. Cross-talk among ROR alpha 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. **Mol Endocrinol**. 8:1253–61, 1994.

GALLAGHER E. P., HASSPIELER B. M., DI GIULIO R. T. Effects of buthionine sulfoximine and diethyl maleate on glutathione turnover in the channel catfish. **Biochem. Pharmacol.**, 43: 2209-2215, 1992.

GIGUÈRE V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. **Endocr Rev**, 20:689–725, 1999.

GILLISSEN A., JAWORSKA M., ORTH M., COFFINER M., MAES P., APP E. M., CANTIN A. M., SCHULTZE-WERNINGHAUS G. Nacystelin a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro. **Respir. Med.**, 91: 159-168, 1997.

GROSELL M., NIELSEN C., BIANCHINI A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. **Comp Biochem Physiol**, 133: 287–303, 2002.

- GROSELL M., Wood C. M., Farrell A. P., Brauner C. A. Homeostasis and toxicology of essential metals. **Elsevier**, 53–133, 2012.
- GURER H., OZGUNES H., NEAL R., SPITZ D. R., N. Ercal. Antioxidant effects of *N*-acetylcysteine and succimer in red blood from lead-exposed rats. **Toxicology**, 128: 181-189, 1998.
- GUTIÉRREZ-PRAENA D., PUERTO M., PRIETO A. I., JOS Á., PICHARDO S., VASCONCELOS V., CAMEÁN A.M. Protective role of dietary *N*-acetylcysteine on the oxidative stress induced by cylindrospermopsin in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environ Toxicol Chem**, 31:1548–1555, 2012.
- HASSPIELER B. M., BEHAR J. V., DI GIULIO R. T. Glutathione-dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameriurus nebulosus*). **Ecotoxicol. Environ. Safety**, 28: 82-90, 1994.
- HILL A., TERAOKA H., HEIDEMAN W., PETERSON R. Zebrafish as a model vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, 86: 6-19, 2005.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. **New York: Oxford University Press**, 4th ed., pp. 851, 2007.
- HARDELAND, R., COTO-MONTES, A., POEGGELER, B. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. **Chronobiology International**, 20:921–962, 2003.
- HIDALGO M. C., TRENZADO C. E., FURNÉ M., BELTRÁN A., MANZANEDA C., GARCÍA-GALLEGO M., DOMEZAIN A., SANZ A. Tissue-specific daily variation in the oxidative status of sturgeon (*Acipenser naccarii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a comparative study. **Fish Physiol Biochem**, 43(4):1105-1115, 2017.
- HIRAYAMA J., CHO S., SASSONI-CORSI P. Circadian control by the reduction/oxidation pathway: Catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 104:15747–15752, 2007.
- IUVONE P. M., TOSINI G., POZDEYEV N., HAQUE R., KLEIN D. C., CHAURASIA S. S. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine *N*-acetyltransferase, and melatonin in the retina. **Proc Retin Eye Res**, 24:433–56, 2005.
- JALILEHVAND F., AMINI Z., PARMA K., KANG E.Y. Cadmium(II) *N*-acetylcysteine complex formation in aqueous solution. **Dalton Trans.**, 40: 12771-12778, 2011.
- JAVED N., USMANI I., AHMAD M., AHMAD. Studies on the oxidative stress and gill histopathology in *Channa punctatus* of canal receiving heavy metal-loaded effluent of Kasimpur Thermal Power Plant. **Environ. Monit. Assess.**, 187: 1-11, 2015.
- JEFFERIES H., BOT J., COSTER J., KHALIL A., HALL JC., MCCAULEY R. D. The role of glutathione in intestinal dysfunction. **J Invest Surg**, 16(6):315-23, 2003.

- JIN Y., ZHANG X., SHU L., CHEN L., SUN L., QIAN H., LIU W., FU Z. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, 78: 846-852, 2010.
- JÚNIOR L. R., HÖEHR N. F., VELLASCO A. P. 2001. sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova**, 24: 1, 2001.
- KELLY G. S., Clinical applications of N-acetylcysteine. **Alter. Med. Rev.**, 3: 114-127, 1998.
- KIM H., KANG J. C. Influence of dietary ascorbic acid on the immune responses of juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegelii* J. **Aquat. Anim. Health**, 27: 178-184, 2015.
- KONDRATOV, R.V. A role of the circadian system and circadian proteins in aging. **Ageing Research Reviews**, 6:12–27, 2007.
- KONO, Y. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 186:189-195, 1978.
- KONO Y., FRIDOVICH I. Superoxide radical inhibits catalase. **Journal of Biological Chemistry**. 257: 5751-5754. 1982.
- KULCZYKOWSKA E., POPEK W., B.G., KAPOOR B.G. Biological clock in fish. 2010.
- LASRAM M. M., DHOUB I. B., ANNABI A., EL FAZAA S., GHARBI N. A review on the possible molecular mechanism of action of N-acetylcysteine against insulin resistance and type-2 diabetes development. **Clinical Biochemistry**, 48: 1200-1208, 2015.
- LATCHOUMYCANDANE C., CHITRA, K. C., MATHUR, P. P. (2002) The Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop-dioxin on the antioxidant system in mitochondrial and microsomal fractions of rat testis. *Toxicology*. 171, 113–118.
- LIVINGSTONE D. R. Contaminant-stimulates reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 656-666, 2001.
- LÓPEZ- OLMEDA J.F, EGEA-ÁLVAREZ, M. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F. J. Glucose tolerance in fish: Is the daily feeding time important? **Physiology and Behavior**, 96: 631–636, 2009.
- LÓPEZ- OLMEDA J.F, SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F. J. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). **Jornal of thermal biology**, 36(2): 91-104, 2011.
- LOWREY P. L., SHIMOMURA K., ANTOCH M. P., YAMAZAKI S., ZEMENIDES P. D., RALPH M. R., MENAKER M., TAKAHASHI J. S. Positional syntetic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. **Science**, 288(5465):483-91, 2000.
- LUSHCHAK V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquat Toxicol**, 101(1):13–30, 2011.

- LUSHCHAK V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiol Biochem**, 42(2):711–747, 2016.
- MCLELLAN L. I., LEWIS A. D., HALL D.J., ANSELL J. D., WOLF C. R. Uptake and distribution of *N*-acetylcysteine in mice: tissue-specific effects on glutathione concentrations. **Carcinogenesis**, 16: 2099-2106, 1995.
- MACFARLANE R. D., BULLOCK G. L., MCLAUGHLIN J. J. A. Effects of five metals on susceptibility of striped bass to *Flexibacter columnaris*. **Trans. A Fish. Soc**, 115: 227–231, 1986.
- MEISTER A., ANDERSON M. E. Glutathione. **Ann. Rev. Biochem.** 52: 711, 1983.
- MISTLBERGER R. E., ANTLE M. C. Entrainment of circadian clocks in mammals by arousal and food. **Essays Biochem**, 49(1):119–36, 2011,
- MOCELIN R., HERRMANN A. P., MARCON M., RAMBO C. L., ROHDEN A., BEVILAQUA F., DE ABREU M. S., ZANATTA L., ELISABETSKY E., BARCELLOS L. J. G., LARA D. R., PIATO A. L. *N*-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 139: 121-126, 2015.
- MOCELIN R., MARCON M., D'AMBROS S., HERRMANN A., ROSA ARAUJO A., PIATO A. Behavioral and Biochemical Effects of *N*-Acetylcysteine in Zebrafish Acutely Exposed to Ethanol. **Neurochemical Research**, 43(2): 458-464, 2018.
- NORDBER J., ARNÉR E. S. J. Reactive oxygen species antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, 31: 1287-1311, 2001.
- OKAMURA H., YAMAGUCHI S., YAGITA K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. **Cell Tissue Res**, 309:47–56, 2002.
- PANDO M. P., PINCHACK A. B., CERMAKIAN N. P., SASSONE-CORSI P. A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. **Pnas**, 98:10178–83, 2001.
- PAQUIN P. R., GORSUCH J. W., APTE S., BATLEY G. E., BOWLES K. C., CAMPBELL P. G. C., DELOS C. G., DI TORO D. M., DWYER R. L., GALVEZ F., GENZEMER R. W., GOSS G. G., HOGSTRAND C., JANSSEN C. R., PAVANELLI G.C., EIRAS J. C., TAKEMOTO R. M. Doenças de peixes: profilaxia diagnóstico e tratamento, 2 ed. Eduem, 2002.
- PASTOR A., COLLADO P. S., ALMAR M., GONZALEZ-GALLEGO J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of *N*-acetylcysteine. **J Hepatol**, 27: 363-370, 1997.
- PATEL S., VELINGKAAR N. S., KONDRATOV R. V., Transcriptional control of antioxidant defense by the circadian clock. Antioxidants & **Redox Signaling**, 20: 2997–3006, 2014.
- PEÑA-LLOPIS S., PEÑA J.B., SANCHO E., FERNANDEZ-VEGA C., FERRANDO M. D. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. **Chemosphere**, 45: 671-681, 2001.

- PEÑA-LLOPIS S., FERRANDO M. D., PEÑA J. B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced N-acetylcysteine. **Aquatic Toxicol**, 65:337–360, 2003.
- PEÑA S., PEÑA J. B., RÍOS C., SANCHO E., FERNÁNDEZ C., FERRANDO M. D. Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla Anguilla*. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, 46: 51-56, 2000.
- POWELL S.R. The antioxidant properties of zinc. **J Nutr**, 130(5):1447S–1454S, 2000.
- PUERTO M., PRIETO A. I., PICHARDO S., MORENO I., JOS Á., MOYANO R., CAMEÁN A. M. Effects of dietary N-acetylcysteine on the oxidative stress induced in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. **Environ Toxicol Chem**, 28:1679–1686, 2009.
- REGOLI F., GIULIANI M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine environmental research**, 93: 106-117, 2014.
- RENSING L., RUOFF P. Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. **Chronobiol Int.**, 19: 807–64, 2002.
- RETNAKARAN R., FLOCK G., GIGUÈRE V. Identification of RVR, a novel orphan nuclear receptor that acts as a negative transcriptional regulator. **Mol Endocrinol.**, 8:1234–44, 1994.
- SAMUNI Y., GOLDSTEIN S., DEAN O. M., BERK M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1830: 4117-4129, 2013.
- SANCHEZ W., PALLUEL O., MEUNIER L., COQUERY M., PORCHER J. M., AÏSSAA S. A. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 19: 177-183, 2005.
- SEDLAK J., LINDSAY R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, 25: 192-205, 1968.
- SEVGILER Y., PINER P., ÜNER N. Effects of N-acetylcysteine on oxidative responses in the liver of fenthion exposed *Cyprinus carpio* Pestic. **Biochem. Physiol.**, 87: 248-254, 2007.
- STEIN J. E., COLLIER T. K., REICHERT W. L, CASILLAS E., HOM T., VARANASI U. Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects: studies with benthic fish in Puget Sound, Washington. **Environ. Toxicol. Chem**, 11: 701-714, 1992.
- STELMASHOOK E. V., GENRIKHS E. E., KAPKAEVA M. R., ZELENOVA E. A., ISAEV N. K. N-acetyl-L-cysteine in the presence of Cu²⁺ induces oxidative stress and death of granule neurons in dissociated cultures of rat cerebellum. **Biochemistry (Moscow)**, 82: 1176–1182, 2017.

- STREISINGER G., WALKER C., DOWER N., KNAUBER D., SINGER F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**. 291, 293–296, 1981.
- TEROVA G., SAROGLIA M., PAPP Z. G., CECCHINI S. 1998. Dynamics of collagen indicating amino acids, in embryos and larvae of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*), originated from broodstocks fed with different vitamin C content in the diet. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 121(2):111-118, 1998.
- TRUMPLER S., NOWAK S., MEERMANN B., WIESMULLER G. A., BUSCHER W., SPERLING M., KARST U. Detoxification of mercury species-an in vitro study with antidotes in human whole blood. **Anal. Bioanal. Chem.**, 395: 1929-1935, 2009.
- ÜNER N., SEVGILER Y., DURMAZ H., PINER P., ÇINKILOGLU E. N-acetylcysteine provides dose-dependent protection against fenthion toxicity in the brain of *Cyprinus carpio* L. **Comp Biochem Physiol, C** 150:33–38, 2009.
- URAZ S., TAHAN G., AYTEKIN H., TAHAN V. N-acetylcysteine expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats. **Scand J Clin Lab Invest**. 73:61-6. 2013.
- VAGLIO A., LANDRISCINA C. Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, 43: 111-116, 1999.
- VALAVANIDIS A., VLAHOGIANNI T., DASSENAKIS M., SCOULLOS M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 64 (2): 178-189, 2006.
- VATINE, G., VALLONE D., GOTHILF Y., FOULKES N. S. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. **FEBS Letters**, 585: 1485–94, 2011.
- VERAS G. C., MURGAS L. D. S., ZANGERONIMO M. G., OLIVEIRA M. M., ROSA P. V., FELIZARDO V. O. Ritmos biológicos e fotoperíodo em peixes. **Arch. Zootec**, 62: 25-43, 2013.
- WINTERBOURN C. C. Superoxide as an intracellular radical sink. **Free Radic. Biol. Med.**, 14: 85-90, 1993.
- ZAFARULLAH M., LI W. Q., SYLVESTER J., AHMAD M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions Cell. **Mol. Life Sci**, 60: 6-20, 2003.
- ZELINSKI E. L., DEIBEL S. H., MCDONALD R. J. The trouble with circadian clock dysfunction: multiple deleterious effects on the brain and body. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, 40:80–101, 2014.
- ZHENG J., LOU J. R., ZHANG X.-X., BENBROOK D. M., HANIGAN M. H., LIND S. E., DING W.-Q. N-acetylcysteine interacts with copper to generate hydrogen peroxide and selectively induce cancer cell death. **Cancer Res.**, 298: 186-194, 2010.