

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS- UFSCar/UNESP

TALITA LAURIE LUSTOSA DO CARMO

**Efeito da exposição a nanopartículas de dióxido de titânio
(NP-TiO₂) em curimatá (*Prochilodus lineatus*, Teleostei):
aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos**

SÃO CARLOS – SP

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS- UFSCar/UNESP

TALITA LAURIE LUSTOSA DO CARMO

**Efeito da exposição a nanopartículas de dióxido de titânio
(NP-TiO₂) em curimatá (*Prochilodus lineatus*, Teleostei):
aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

SÃO CARLOS – SP

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C287ee Carmo, Talita Laurie Lustosa do.
Efeito da exposição a nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂) em curimatá (*Prochilodus lineatus*, Teleostei) : aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos / Talita Laurie Lustosa do Carmo. -- São Carlos : UFSCar, 2015. 127 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Toxicologia. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3. Glutathione. 4. Histopatologia. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD: 615.9 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

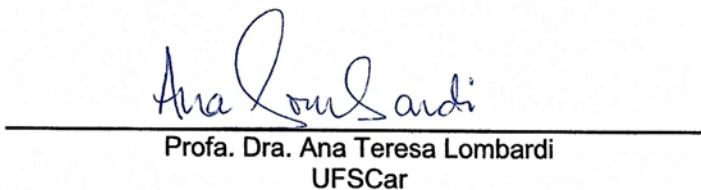
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Talita Laurie Lustosa do Carmo, realizada em 06/03/2015:



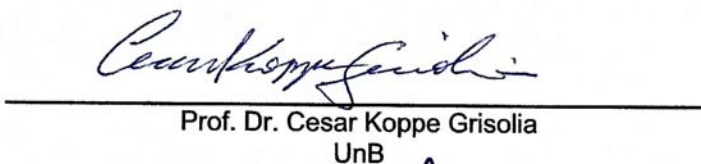
Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
UFSCar



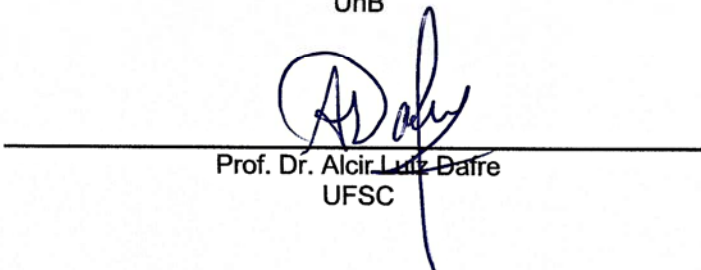
Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi
UFSCar



Profa. Dra. Evelise Nunes Fragoso de Moura
UFSCar



Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia
UnB



Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre
UFSC

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sem ele nada seria possível.

À Dra. Marisa Narciso Fernandes, pela orientação, confiança, além de compartilhar suas experiências e dar apoio durante minha trajetória acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) da Universidade Federal de São Carlos pelo curso de doutorado. Ao Alexandre, secretário do PIPGCF, por sua disponibilidade em ajudar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo 2011/10339-0) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos. À FAPESP e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA) pelo apoio financeiro.

À Estação de Hidrologia e Piscicultura da Usina Hidrelétrica de Furnas - MG, pela obtenção dos peixes.

À Profa. Dra. Marcela Bianchessi da Cunha Santino, Dra. Diana Amaral Monteiro e Dra. Fernanda Dias de pelas sugestões dadas durante o exame de qualificação.

Aos professores Dra. Marisa Narciso Fernandes, Dra. Ana Teresa Lombardi, Dra. Evelise Nunes Fragoso de Moura, Dr Cesar Koppe Grisolia e Dr Alcir Luiz Dafre pelas sugestões dadas durante a defesa de doutorado.

Às minhas grandes amigas de infância e confidentes, Kellen Regina, Maria Márcia, Mariane e Vivian, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos alegres e tristes.

Aos meus amigos de graduação e primeiros colegas de república, Vinícius e Paola, que sempre me estimularam a seguir em frente e transmitiram bom humor, alegria e felicidade.

A todos os amigos e colegas do laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas: Aline, Bruno, Diana, Driele, Edineide, Eliane, Eliton, Flávia, Greyce, Iara, Jade, Jaqueline, Larissa, Marise, Marcelo, Naiara, Nathan, Natieli, Priscila Pedrão, Priscila Siqueira, Rafael, Sharles, Tayrine, Tiago, Vinícius e Vívian.

Em especial aos meus amigos Priscila, Vinícius, Eliane, Jade e Kelly, muito obrigada pela ajuda nas análises bioquímicas e morfológicas no laboratório.

Aos queridos amigos: Li, Nai, Pri e Vini pelos ensinamentos, discussões, convívio, amizade e carinho.

Aos Funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas: “Dona Vera”, “Sr Ângelo”, Nadir, Carmem, “Dona Graça” e Beth.

Aos doutores Prof. Joaquim de Araújo Nóbrega, Lucimar Fialho, Eveline Soares Costa, Prof. Carlos Roberto Appoloni, Tiago Dutra Galvão, Profa. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, Wagner Ezequiel Risso, Prof. Valtencir Zucolotto pela parceria realizada nas análises físicas e químicas. À Profa. Dra. Marta Margarete Cestari e Msc. Emanuele Cristina Pesenti pela parceria nas análises de genotoxicidade.

Ao meu pai, Francisco Lustosa, minha mãe, Eloá Vieira, minha irmã, Raema Lustosa e minha avó, Geralda Gomes pelo amor incondicional, por toda a força e todo o apoio que me proporcionaram e, simplesmente, por eles existirem e serem as pessoas que eu mais amo.

Ao Marcel Caritá, meu marido e companheiro que amo muito e sou grata por ter entrado na minha vida trazendo muitas coisas boas. Aos meus sogros José Otávio Vaz e Maria do Carmo Caritá Vaz que me trouxeram uma segunda família maravilhosa e que amo demais.

A todos, que de certa forma contribuíram para o meu trabalho, eu agradeço.

*“Ao calor, que acompanha a luz, que o calor dure sempre,
mesmo que a luz vá se apagando aos poucos”.*

Jacob Needleman

*“Quando achamos que temos todas as respostas, vem a vida
e muda todas as perguntas”*

Luiz Fernando Veríssimo

RESUMO

O presente projeto teve como objetivo investigar a toxicidade das NP-TiO₂ após exposição aguda (48 h) e subcrônica (14 d) utilizando biomarcadores de hematologia, bioquímicos e morfológicos em *P. lineatus*. As NP-TiO₂ causaram distúrbios hematológicos apenas após exposição subcrônica e não mostraram genotoxicidade e neurotoxicidade, porém afetaram a imunidade dos animais. Nas brânquias, a exposição aguda a NP-TiO₂ diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumentou os níveis de glutathiona (GSH), enquanto a exposição subcrônica aumentou as ERO e os níveis de GSH e diminuiu a atividade da superóxido dismutase (SOD). Nos rins, a exposição aguda a NP-TiO₂ não causou formação de ERO e alteração na atividade das enzimas antioxidantes, porém causou um aumento nos níveis de GSH e lipoperoxidação (LPO). Após exposição subcrônica a atividade da catalase diminuiu sem causar desbalanço oxidativo. No fígado, a exposição aguda a NP-TiO₂ não alterou as enzimas antioxidantes e metalotioneína, mas causou diminuição de ERO e aumento de GSH. Após exposição subcrônica ocorreu uma diminuição na atividade da SOD e aumento da atividade das enzimas GPx e GST e do conteúdo de GSH no fígado. Danos morfológicos também foram encontrados em brânquias, fígado e rins. As brânquias mostraram alterações leves após exposição aguda e alterações leves e moderadas após exposição subcrônica. No tecido renal e hepático, mudanças degenerativas e necrose ocorreram após exposição a NP-TiO₂. As NP-TiO₂ inibiram a atividade das enzimas com função de osmorregulação branquiais após exposição aguda sem nenhuma alteração após exposição subcrônica e no tecido renal. A densidade de células ricas em mitocôndrias (CRM) aumentou nos filamentos branquiais e tecido renal após exposição subcrônica, enquanto a exposição aguda diminuiu a osmolalidade plasmática e aumentou a concentração de íons cálcio (Ca²⁺). No entanto, a osmolalidade foi restabelecida após exposição subcrônica. Esses resultados sugerem que a GSH pode ser uma das principais vias no combate as ERO. No fígado e nos rins, as NP-TiO₂ podem causar danos moderados a severos no tecido que podem levar à perda da função do órgão em longo prazo, uma vez que a porção do tecido funcional reduziu devido aos danos degenerativos e necrose. Desequilíbrio osmorregulatório foi causado pela exposição aguda a NP-TiO₂, mas não após exposição subcrônica devido à proliferação de novas CRM e mudanças morfológicas nas brânquias. No entanto, essas mudanças morfológicas podem dificultar a troca de gases e o equilíbrio osmótico e iônico em longo prazo.

Palavras-chave: Nanotoxicologia. Espécies reativas de oxigênio. Glutathiona. Histopatologia. Balanço iônico

ABSTRACT

This project aims to investigate the TiO₂-NP toxicity after acute (48 h) and subchronic (14 d) exposure using hematology, biochemical and morphological biomarkers in *P. lineatus*. TiO₂-NP only caused blood disorders after subchronic exposure and did not show geno- and neurotoxicity, but they affected the immunity of *P. lineatus*. In gills, acute exposure to TiO₂-NP decreased reactive oxygen species (ROS) formation and increased glutathione (GSH) levels, while subchronic exposure increased ROS and GSH levels and inhibited superoxide dismutase (SOD) activity. In kidney, acute exposure to TiO₂-NP did not cause ROS formation and changes in antioxidant enzymes activity, but increased GSH and lipid peroxidation (LPO) levels. Subchronic exposure inhibited catalase activity in kidney tissue, but redox balance was not impaired. In the liver, acute exposure to TiO₂-NP did not alter the antioxidant enzymes activity and metallothionein levels, but ROS formation decreased and GSH levels increased. After subchronic exposure, SOD activity did not change, but GPx and GST activity and GSH levels increased in the liver. Additionally, morphological damage was found in gills, liver and kidneys. Gills showed slight changes after acute exposure and slight to moderate changes after subchronic exposure. In kidney and liver tissue, degenerative changes and necrosis occurred after TiO₂-NP exposure. TiO₂-NP also inhibited enzymes of osmoregulation activity in gills after acute exposure, but had no effect after subchronic exposure and in renal tissue. Mitochondria-rich cells (MRC) density increased in gill filaments and renal tissue after subchronic exposure, while plasma osmolality decreased and calcium ions (Ca²⁺) concentration increased after acute exposure. Osmolality, however, was restored after subchronic exposure. These results suggest that GSH played an important role in preventing ROS formation. In liver and kidneys, TiO₂-NP can cause moderate to severe tissue damage the long term, may lead to organ dysfunction, as considerable portion of the organ was reduced due to necrosis and degenerative damage. Osmoregulatory system impairment was caused after acute exposure to TiO₂-NP, but no after subchronic exposure, probably due to proliferation of new MRC and morphological changes in gills. However, these morphological changes may hinder gases exchange and osmotic and ionic balance in the long term.

Keywords: Nanotoxicology. Oxidative stress. Reactive oxygen species. Glutathione. Histopathology.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Fig. 1** - Comparação de nanopartículas (NP) e micropartículas com base em sua entrada em células via modelo vesicular (caveolar)..... 15
- Fig. 2** - Exemplar de juvenil de *Prochilodus lineatus* 21

CAPÍTULO 1

- Fig. 1** - Eletromicrografia de NP-TiO₂ em suspensão em água Milli-Q 32
- Fig. 2** - Células sanguíneas de *Prochilodus lineatus* coradas com May-Grunwald-Giemsa-Wright..... 37
- Fig. 3** - Atividade da acetilcolinesterase no músculo e cérebro de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO₂ 39

CAPÍTULO 2

- Fig. 1** - Espécies reativas de oxigênio, atividade da superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase, conteúdo de glutathione e níveis de peroxidação lipídica no tecido branquial de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO₂ 58
- Fig. 2** - Espécies reativas de oxigênio, atividade da superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase, conteúdo de glutathione e níveis de peroxidação lipídica e no tecido renal de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO₂ 59
- Fig. 3** - Brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de NP-TiO₂ 61
- Fig. 4** - Índice de alteração histopatológica em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO₂..... 63
- Fig. 5** - Rins de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de NP-TiO₂..... 64

CAPÍTULO 3

- Fig. 1** - Atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase, V-H⁺-ATPase e anidrase carbônica em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus* após exposições aguda (48 h) e subcrônica (14 d) a diferentes concentrações de NP-TiO₂..... 86
- Fig. 2** - Imuno-histoquímica em brânquias mostrando as células ricas em mitocôndrias marcadas contra Na⁺/K⁺-ATPase após exposição a NP-TiO₂ por 48 h e 14 dias..... 87

Fig. 3 - Imuno-histoquímica em rins mostrando as células ricas em mitocôndrias em túbulos renais marcadas contra Na ⁺ /K ⁺ -ATPase após exposição a NP-TiO ₂ por 14 dias.....	88
Fig. 4 - Densidade de células ricas em mitocôndrias encontradas por técnica de imuno-histoquímica em filamentos e lamelas de brânquias e túbulos renais de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a diferentes concentrações de NP-TiO ₂ durante 48 h (exposição aguda) e 14 dias (exposição subcrônica)	89
Fig. 5 - Eletromicrografias de varredura mostrando superfície do epitélio do filamento branquial de <i>Prochilodus lineatus</i> (exposição aguda).....	91
Fig. 6 - Eletromicrografias de varredura mostrando superfície do epitélio do filamento branquial de <i>Prochilodus lineatus</i> (exposição subcrônica)	92
Fig. 7 - Densidade e área fracional de células ricas em mitocôndrias semelhantes à esponja e com microvilosidades encontradas por microscopia eletrônica de varredura em filamentos e lamelas da brânquia de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a diferentes concentrações de NP- TiO ₂ durante 48 h (exposição aguda) e 14 dias (exposição subcrônica).....	93

CAPÍTULO 4

Fig. 1 - Espécies reativas de oxigênio, atividade da superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase, conteúdo de glutathione, metalotioneína e níveis de peroxidação lipídica no fígado de <i>Prochilodus lineatus</i> após exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO ₂	109
Fig. 2 - Fígado de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a diferentes concentrações de NP-TiO ₂	111
Fig. 3 - Índice de alteração histopatológica em fígados de <i>Prochilodus lineatus</i> após exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO ₂	113

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Concentração de titânio no tecido de <i>Prochilodus lineatus</i> exposto a NP-TiO ₂ por 14 dias	33
Tabela 2 - Variáveis hematológicas de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a nanopartículas de TiO ₂ durante 48 h (exposição aguda)	35
Tabela 3 - Variáveis hematológicas de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos nanopartículas de TiO ₂ durante 14 d (exposição subcrônica)	36
Tabela 4 - Escore de danos (ensaio cometa), frequência de micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocíticas em eritrócitos de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a NP-TiO ₂ durante 48 h (exposição aguda) e 14 d (exposição subcrônica).....	38

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Concentração de titânio no tecido de <i>Prochilodus lineatus</i> exposto a NP-TiO ₂ por 14 dias	56
Tabela 2 - Alterações histopatológicas em brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos NP-TiO ₂	62
Tabela 3 - Alterações histopatológicas em rins de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos NP-TiO ₂	65

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Concentração de íons (Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ e Cl ⁻) e osmolalidade do plasma sanguíneo de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a diferentes concentrações de NP-TiO ₂ durante 48 h (exposição aguda) e 14 dias (exposição subcrônica).....	85
---	----

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Concentração de titânio no fígado de <i>Prochilodus lineatus</i> exposto a NP-TiO ₂ por 14 dias	108
Tabela 2 - Alterações histopatológicas em fígados de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos NP-TiO ₂	112

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 Nanopartículas: Propriedades, aplicações e efeitos toxicológicos	14
1.1.2 Nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO ₂)	16
1.2 Biomarcadores	17
1.2.1 Biomarcadores hematológicos e de genotoxicidade.....	17
1.2.2 Biomarcadores bioquímicos	18
1.2.3 Biomarcadores histopatológicos.....	20
1.3 <i>Prochilodus lineatus</i>	21
1.4 Justificativa.....	22
1.5 Objetivos gerais	22
CAPÍTULO 1: Exposição aguda e subcrônica a nanopartículas de dióxido de titânio em <i>Prochilodus lineatus</i>: concentração letal média (CL50; 48 horas), hematologia, genotoxicidade e neurotoxicidade	23
Resumo	24
1 Introdução	25
2 Materiais e Métodos	27
2.1 Caracterização e dinâmica das NP-TiO ₂ em suspensão	27
2.2 Animais.....	28
2.3 Teste de toxicidade aguda para determinação da CL50; 48 h.....	28
2.4 Exposição aguda e subcrônica a NP-TiO ₂	28
2.5 Concentração de titânio em músculo e cérebro	29
2.6 Análises hematológicas	29
2.7 Ensaio cometa com eritrócitos.....	30
2.8 Teste do micronúcleo písceo	31
2.9 Atividade da acetilcolinesterase em músculo e cérebro	31
2.10 Análises estatísticas	32
3 Resultados	32
3.1 Caracterização e dinâmica das NP-TiO ₂ em suspensão	32
3.2 Concentração de titânio em músculo e cérebro	33
3.3 Toxicidade das NP-TiO ₂	33
3.4 Respostas hematológicas, contagem de leucócitos e trombócitos.....	33
3.5 Ensaio cometa e teste do micronúcleo písceo	38

3.6 Neurotoxicidade.....	39
4 Discussão	40
4.1 Toxicidade das NP-TiO ₂	40
4.2 Respostas hematológicas	40
4.3 Ensaio cometa e teste do micronúcleo písceo	42
4.4 Neurotoxicidade.....	43
5 Conclusões	44
6 Agradecimentos	44
7 Referências	45

CAPÍTULO 2: Respostas antioxidantes e alterações histopatológicas em brânquias e rins do peixe Neotropical *Prochilodus lineatus* após exposição aguda e subcrônica a nanopartículas de dióxido de titânio.....

Resumo	50
1 Introdução	51
2 Materiais e Métodos	53
2.1 Animais.....	53
2.2 Exposição aguda e subcrônica a NP-TiO ₂	53
2.3 Concentração de titânio em brânquias e rins	54
2.4 Análises bioquímicas em brânquias e rins.....	54
2.5 Histopatologia em brânquias e rins	55
2.6 Análises estatísticas	55
3 Resultados	56
3.1 Concentração de titânio em brânquias e rins	56
3.2 Respostas bioquímicas.....	56
3.3 Histopatologias em brânquias.....	60
3.4 Histopatologias em rins	63
4 Discussão	66
4.1 Resposta antioxidante	66
4.2 Histopatologia.....	68
5 Conclusões	72
6 Agradecimentos	72
7 Referências	73

CAPÍTULO 3: Balanço iônico em <i>Prochilodus Lineatus</i> após exposição a nanopartículas de dióxido de titânio	77
Resumo	78
1 Introdução	79
2 Materiais e Métodos	81
2.1 Animais.....	81
2.2 Exposição aguda e subcrônica a NP-TiO ₂	81
2.3 Osmolalidade e íons plasmáticos.....	82
2.4 Análises bioquímicas em brânquias e rins.....	82
2.5 Identificação das CRM em brânquias e rins.....	82
2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	83
2.7 Análises estatísticas	83
3 Resultados	84
3.1 Osmolalidade e íons plasmáticos.....	84
3.2 Análises bioquímicas em brânquias e rins.....	85
3.3 Identificação de CRM e MEV	87
4 Discussão	93
4.1 Osmolalidade e íons plasmáticos.....	93
4.2 Análises bioquímicas em brânquias e rins.....	94
4.3 Identificação de CRM e MEV	95
5 Conclusões	97
6 Agradecimentos	97
7 Referências	98

CAPÍTULO 4: Respostas antioxidantes e alterações histopatológicas no fígado do peixe Neotropical <i>Prochilodus lineatus</i> após exposição aguda e subcrônica a nanopartículas de dióxido de titânio	101
Resumo	102
1 Introdução	103
2 Materiais e Métodos	105
2.1 Animais.....	105
2.2 Exposição aguda e subcrônica a NP-TiO ₂	105
2.3 Concentração de titânio	106
2.4 Análises bioquímicas	106

2.5 Histopatologia hepática	107
2.6 Análises estatísticas	107
3 Resultados	108
3.1 Concentração de titânio tecidual.....	108
3.2 Respostas antioxidantes	108
3.3 Histopatologia hepática	110
4 Discussão	113
4.1 Estresse oxidativo	113
4.2 Histopatologia hepática	115
5 Conclusões	117
6 Agradecimentos	117
7 Referências	118
CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
REFERÊNCIAS GERAIS	123

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Nanopartículas: propriedades, aplicações e efeitos toxicológicos

A nanotecnologia surgiu com o desenvolvimento de pesquisas baseadas na manipulação da matéria a nível atômico e molecular, modificando suas propriedades físico-químicas. Essas modificações ocorrem de maneira controlada e intencional, como através da regulação de suas propriedades termodinâmicas tal como automontagem, precipitação e cristalização (SUTARIYA et al., 2015).

Desenvolvem-se partículas engenheiradas de tamanho nano, as nanopartículas (NP), com pelo menos uma dimensão de 1 a 100 nm (FADEEL et al., 2012; GWINN e SOKULL-KLUTTGEN, 2012; SUTARIYA et al., 2015), que apresentam propriedades específicas relacionadas à forma (estrutura cristalina), tamanho, superfície (área de superfície, carga de superfície) e química (composição, solubilidade, superfície química, aglomeração/agregação) (MASCANGIOLI e ZHANG, 2003; FADEEL et al., 2012). A maior área de superfície é a principal característica responsável por uma maior reatividade, força e propriedades elétricas das NP, o que torna extensa sua aplicabilidade. As nanopartículas engenheiradas mais conhecidas são as metálicas, de carbono, dendímeros, compósitos e nanopartículas poliméricas (SUTARIYA et al., 2015). Essas NP podem ser encontradas em uma variedade de produtos como eletroeletrônicos, automotivos, produtos farmacêuticos, alimentos e cosméticos. Embora tenha aplicações promissoras e a produção de produtos compostos com NP engenheiradas seja crescente, as informações sobre os efeitos adversos das NP e sua interação com sistemas biológicos ainda estão incompletas (FADEEL et al., 2012).

As NP provenientes do descarte em aterros sanitários, esgotos e locais de incineração do lixo, irão contaminar o solo e a superfície dos corpos d'água. Uma vez depositadas no solo essas NP podem se infiltrar e contaminar o lençol freático e atingir o meio aquático por decantação e lixiviação. Essas NP podem ser potencialmente tóxicas aos organismos aquáticos e, adicionalmente podem servir como carreadores de outros compostos tóxicos (HANDY et al., 2008; SUTARIYA et al., 2015).

Os potenciais efeitos adversos e riscos para a saúde causados pelas NP precisam ser melhores compreendidos para que se elabore uma regulamentação específica permitindo uma produção, uso e descarte seguros e responsáveis (FADEEL et al., 2012). O potencial de risco é geralmente associado à composição química do material, porém, enquanto substâncias químicas podem não ser consideradas tóxicas em macro escala, em escala nano o mesmo material pode se tornar potencialmente tóxico por modificação de suas propriedades físico-

químicas (GWINN e SOKULL-KLUTTGEN, 2012). Adicionalmente, a avaliação da toxicidade das NP em ambiente aquático é difícil tendo em vista que as NP podem reagir com a matéria orgânica, poluentes e íons em suspensão e serem modificadas por processos bióticos e abióticos (CLEMENTE et al., 2012; SUTARIYA et al., 2015). Fatores como pH, força iônica ou a presença de ligantes orgânicos no meio aquático podem afetar a toxicidade das NP (SPRAGUE, 1985; SUTARIYA et al., 2015).

O processo básico de entrada de NP no organismo é bem descrito por mecanismos como endocitose, difusão através de membranas plasmáticas e ligação em receptores celulares (SCOWN et al., 2009; FADEEL et al., 2012; SHI et al., 2013). NP podem interagir com a membrana das células por meio de interações hidrofóbicas, eletrostáticas, de van der Waals, ligante-receptor ou pontes de hidrogênio, adsorvendo na superfície da célula e movendo-se para dentro das células (SUTARIYA et al., 2015). Por endocitose, apenas pequenas partículas com o diâmetro inferior a 100 nm podem ser englobadas em estruturas vesiculares como cavéolas. Dentro das células, essas vesículas podem fundir-se e acumular em lisossomos, com interior acidificado, facilitando a dissolução de NP, que se dissociam em íons que podem mover-se relativamente livres no interior dos lisossomos (Fig. 1) (FADEEL et al., 2012).

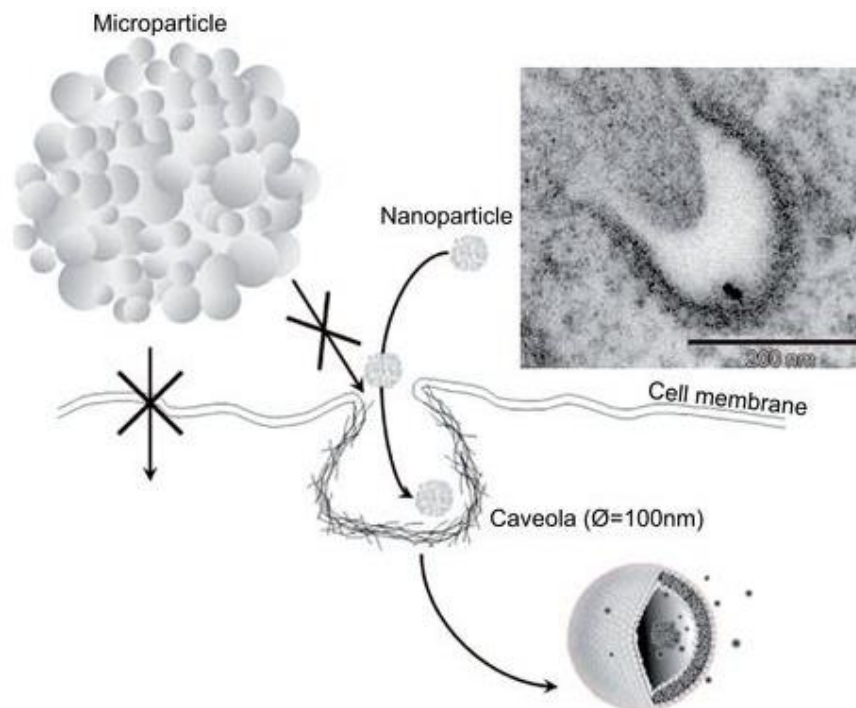


Fig. 1 - Comparação de nanopartículas (NP) e micropartículas com base em sua entrada nas células por meio de vesículas (cavéolas). Micrografia de transmissão eletrônica mostra uma situação onde as NP (22 nm) são localizadas dentro de uma cavéola em cultura de células epiteliais pulmonares (FADEEL et al., 2012).

O tamanho das NP influencia a sua distribuição, interação e eliminação do corpo (SUTARIYA et al., 2015). Essas partículas em tamanho nano têm uma maior razão área de superfície-volume e são, conseqüentemente, mais reativas em sistemas biológicos (SUTARIYA et al., 2015). Dessa forma, também se deve compreender melhor a interação das NP com sistemas biológicos, uma interface nano-biológica, que abrange a dinâmica de interações físico-químicas, cinética e termodinâmica entre as NP e os componentes biológicos. As proteínas, por exemplo, são as biomoléculas que mais interagem com NP em ambientes biológicos (FADEEL et al., 2012), e essa interação pode alterar a função dessas proteínas, como a inativação de enzimas importantes para o funcionamento celular.

1.1.2 Nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂)

O TiO₂ é um óxido metálico encontrado na natureza principalmente em depósitos minerais de origem vulcânica e apresenta-se principalmente três polimorfos distintos: rutilo (tetragonal, com dureza e densidade maiores que a forma anatase), anatase (tetragonal, formando pirâmides com o eixo vertical mais longo que o rutilo) e broquite (ortorrômbica) (WINKLER, 2003; CARP et al., 2004). Rutilo é a forma mais comum e termodinamicamente estável encontrada na natureza e a anatase é mais instável com característica fotocatalítica, sendo por isso bastante utilizada em aplicações industriais (CARP et al., 2004). O TiO₂ pode ser extraído de fontes minerais naturais (rutilo, ilmenita e minérios leucocênicos) e ser utilizado em processos industriais de síntese de NP-TiO₂ (CARP et al., 2004; CLEMENTE et al., 2012). O uso de NP-TiO₂ em muitos produtos cresceu bastante devido ao baixo custo e aos seus efeitos promissores relacionados à sua habilidade de absorver luz ultravioleta (SUTARIYA et al., 2015). Atualmente as NP-TiO₂ estão sendo usadas para purificação de água, fotodegradação de xenobióticos na água e produção de bens comuns como cosméticos, tintas, alimentos, medicamentos, janelas auto-limpantes, plásticos e eletroeletrônicos (CERRADA et al., 2008; THERON et al., 2008; ROBICHAUD et al., 2009). Além disso, está sendo estudado o seu uso em diversas outras aplicações como em dispositivos ópticos, sensores, fotocatalise e células solares (MALATO et al., 2009; TAN et al., 2009; GUPTA e TRIPATHI, 2011).

NP-TiO₂ não exibe toxicidade ambiental na forma de micropartículas, mas quando sintetizado como nanopartícula pode causar uma variedade de efeitos tóxicos em mamíferos como prejuízo nas vias respiratórias (inflamação, danos, fibrose e tumores nos pulmões e mau funcionamento dos macrófagos), distúrbios mitóticos, dano do DNA e apoptose (GWINN e

SOKULL-KLUTTGEN, 2012). Devido ao seu pequeno tamanho, as NP-TiO₂ podem passar livremente através dos capilares sanguíneos e serem distribuídas por todo o organismo (OBERDÖRSTER et al., 2005). As NP-TiO₂ ultrafinas (≤ 20 nm), por exemplo, causam efeitos genotóxicos como a formação de micronúcleo e ocorrência de apoptose em fibroblastos de embriões de hamsters (RAHMAN et al., 2002).

1.2 Biomarcadores

Biomarcadores são ferramentas eficientes que permitem avaliar os efeitos estressores de xenobióticos em organismos vivos e são muito utilizados em estudos de toxicologia (SCHLENK et al., 2008; CANESI et al., 2010). Os biomarcadores podem fornecer a identificação e distribuição de uma substância química, o seu grau de toxicidade e efeitos fisiológicos em um determinado organismo de estudo ou identificar fatores responsáveis por uma maior sensibilidade de organismos a determinados compostos (SCHLENK et al., 2008). Muitas pesquisas em condições de laboratório vêm sendo realizadas para avaliar o efeito de xenobióticos (como as NP) em espécies sentinelas, através da análise de parâmetros hematológicos, indicadores de genotoxicidade, parâmetros bioquímicos e alterações histopatológicas (FEDERICI et al., 2007; SCHLENK et al., 2008; VIGNARD et al., 2015).

1.2.1 Biomarcadores hematológicos e de genotoxicidade

Os parâmetros sanguíneos, quando mantidas as mesmas condições fisiológicas e ambientais, seguem um padrão comum para os indivíduos de uma mesma espécie, e sua análise fornece informações importantes sobre o estado de saúde dos animais (BOSSART e DIERAUF, 2001). Quando os parâmetros hematológicos de um indivíduo diferem do padrão da sua espécie, provavelmente este animal possui alguma patologia ou anormalidade, que pode indicar possíveis alterações causadas por xenobióticos. Os eritrócitos maduros são as células sanguíneas mais numerosas no sangue, e são responsáveis pelo transporte do oxigênio do órgão respiratório para os tecidos e de parte do gás carbônico no sentido inverso, processo desempenhado pela molécula de hemoglobina contida nos eritrócitos (KEER, 2003; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Alterações dessas funções causadas por xenobióticos podem ser avaliadas por meio da quantificação das variáveis hematológicas (hematócrito, dosagem de hemoglobina e contagem de eritrócitos) e índices hematimétricos. Além disso, a contagem dos leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) e trombócitos são bons marcadores de xenobióticos no ambiente evidenciando possíveis danos

nos processos de hemostasia e homeostasia, bem como no sistema imune dos animais (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

O ensaio cometa e o teste do micronúcleo são bons biomarcadores de genotoxicidade em células sanguíneas de peixes expostos a xenobióticos ambientais. O ensaio cometa é um método sensível para detectar danos no DNA de células de peixes e é muito utilizado em eritrócitos, que são células mais sensíveis à exposição à xenobióticos genotóxicos (BELPAEME et al., 1996; MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998; AVISHAI et al., 2002). Através do ensaio cometa podem-se detectar quebras de cadeias simples e duplas no DNA, sítios álcali-labeis em células individuais, ligações entre moléculas de DNA e de DNA ligados a proteínas (ÖSTLING e JOHANSON, 1984; HARTMAN et al., 2003). Por outro lado, o teste do micronúcleo (MN) é um teste citogenético sensível na detecção de alterações cromossômicas estruturais e numéricas em células sanguíneas (HEDDLE et al., 1983; BRUNETTI et al. 1988). Por outro lado, o teste do micronúcleo (MN) é um teste citogenético sensível na detecção de aberração cromossômica estrutural ou numérica durante a mitose e anormalidades nucleares eritrocíticas (ANEs), sendo muito utilizado em células expostas a xenobióticos genotóxicos (FENECH et al., 1999; AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000; ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005).

1.2.2 Biomarcadores bioquímicos

Muitos compostos, tais como inseticidas a base de organofosforados e carbamatos, inibem a acetilcolinesterase (AChE) sendo, então, esta enzima considerada um bom marcador neurotóxico (HYLLAND et al., 2003; BRADBURY et al., 2008). Além disso, a AChE é muito utilizada para avaliação do efeito de metais em peixes como marcador de estresse (DE LA TORRE et al. 2002; RICHETTI et al., 2011). A AChE hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético, evitando acúmulo desse neurotransmissor em sinapses e mantendo o funcionamento neuronal normal de sistemas sensoriais, integrativos e musculares (HYLLAND et al., 2003). Desta forma, uma inibição da AChE causaria uma superestimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos do sistema nervoso central, periférico e junções neuromusculares (BRADBURY et al., 2008).

Marcadores de peroxidação lipídica, bem como espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas e enzimas de biotransformação e antioxidantes, são bons indicadores de alterações geradas por compostos tóxicos e frequentemente utilizados em estudo com peixes nas últimas três décadas (DI GIULIO e MEYER, 2008). NP constituídas por metais ou óxidos metálicos de transição são mais sensíveis a reações de oxidação e redução, sendo que o estresse

oxidativo é o principal mecanismo de toxicidade, onde as ERO são geradas através das reações de Fenton e Haber-Weiss (HERMES-LIMA, 2004; L'AZOU E MARANO, 2010). As NP-TiO₂ são potenciais agentes causadores de estresse oxidativo em peixe, pois podem gerar ERO que se reagirem com membranas celulares e causam peroxidação lipídica (LPO). O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado, que propaga a cadeia de peroxidacao lipidica por meio de radicais peroxilas, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos que se degradam em compostos genotóxicos ou mutagêncios estáveis, os quais atuam oxidando moléculas em locais distantes de onde foram formados (HENKEL, 2011).

Como mecanismo de proteção celular às ERO, os peixes possuem um sistema de defesa antioxidante, semelhante ao dos mamíferos, compostos pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR). A SOD (mitocondrial e citosólica) converte o radical superóxido (O₂^{•-}) em peróxidos de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio (O₂) (DI GIULIO e MEYER, 2008). O H₂O₂ então é convertido em moléculas de água (H₂O) e O₂ pela CAT (citosólica) ou pela GPx (mitocondrial e citosólica), que difere da CAT por ser capaz de metabolizar peróxidos lipídicos, através da oxidação do tripeptídeo glutaciona (GSH). A glutaciona redutase (GR) atua convertendo a glutaciona oxidada (GSSH), formada pela atividade da GPx, em GSH (HAYES et al., 2005). Há ainda a glutaciona-S-transferase (GST) que atua conjugando GSH com ERO, produtos da degradação lipídica ou xenobióticos ambientais (DUDLER et al., 1991; BARTLING et al., 1993).

As brânquias, os rins e o intestino são os principais órgãos responsáveis pela regulação do transporte de água e íons em peixes para a manutenção do balanço hidromineral (WENDELAAR BONGA e LOCK, 2008). Os teleósteos de água doce são hiperosmóticos em relação ao ambiente aquático em que vivem, e essa diferença de gradiente osmótico em relação ao meio resulta em efluxo de íons por difusão e influxo osmótico de água pelas brânquias e superfície do corpo (EVANS et al., 2005; WENDELAAR BONGA e LOCK, 2008). Distúrbios na concentração desses íons podem ocorrer devido à inibição de enzimas relacionadas à regulação iônica e osmótica ou por aumento na permeabilidade devido a danos morfológicos no tecido branquial e renal após exposição à xenobióticos como as NP-TiO₂ (FEDERICI et al., 2007; WANG et al. 2007; HAO et al., 2009). As células ricas em mitocôndrias (CRM) são as principais células do tecido branquial e túbulos renais responsáveis pelo transporte de Ca²⁺, Na⁺ e Cl⁻ para o sangue de forma a manter o equilíbrio iônico (JÜRSS e BASTROP, 1995). Essas células são ricas em ATPases [sódio-potássio-

ATPase (Na^+/K^+ -ATPase), hidrogênio-ATPase vesicular (H^+ -ATPase) e cálcio ATPase (Ca^{2+} -ATPase)], anidrase carbônica (AC) além de canais de Na^+ e trocadores como $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Na^+/H^+ ou NH_4^+ (PERRY, 1997; HIROSE et al., 2003). As CRM e seus constituintes são bons indicadores de contaminação aquática, pois xenobióticos podem ocasionar alterações celulares com consequentes distúrbios osmorregulatórios (CAMARGO et al., 2009).

1.2.3 Biomarcadores histopatológicos

O organismo de peixes pode apresentar alterações em sua morfologia, e consequentemente em sua função, após exposição à xenobióticos no ambiente. A exposição à xenobióticos e enfermidades pode resultar em alterações morfológicas (histopatologias) nas células e tecido que por sua vez alteram o metabolismo celular do organismo levando a uma disfunção bioquímica e consequente disfunção fisiológica (SCHLENK et al., 2008). Essas histopatologias dificultam a entrada de poluentes no organismo e permitem a manutenção dos processos fisiológicos do organismo (SCHLENK et al., 2008). Nas brânquias dos peixes, histopatologias podem refletir o grau e o tempo de exposição aos xenobióticos e possíveis alterações funcionais (FERNANDES e MAZON, 2003). Ao longo do tempo de exposição as mudanças histopatológicas vão se acumulando, refletindo um impacto gradual no metabolismo, sendo que histopatologias degenerativas e necroses podem levar a perda de parte funcional do tecido prejudicando a função do órgão e a sobrevivência do indivíduo (CHOVANEC et al., 2003). Os órgãos comumente usados em investigações histopatológicas são brânquias, fígado e rins, pois são sensíveis a poluentes e desempenham funções vitais como respiração, regulação iônica, excreção, armazenamento e biotransformação de xenobióticos (GERNHOFER et al., 2001; CHOVANEC et al., 2003).

1.3 *Prochilodus lineatus*

O curimatá, *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae) (Fig. 2), tem ampla distribuição nos rios das regiões sul e sudeste do Brasil.



Fig. 2 - Exemplar de juvenil de *Prochilodus lineatus*.

Essa espécie tem sido considerada como modelo para estudos de toxicidade nessa região e tem potencial para ser utilizada como bioindicadora por possuir moderada a alta sensibilidade a xenobióticos e devido ao hábito alimentar detritívoro, o qual coloca o animal em contato com xenobióticos presentes tanto na água quanto no sedimento (CARVALHO e FERNANDES, 2008; CAMARGO et al., 2009; GALINDO et al., 2010; MODESTO e MARTINEZ, 2010). Por ser importante para subsistência e pesca artesanal, o consumo de curimatá contaminado por xenobióticos como as NP-TiO₂, pode causar efeitos tóxicos aos consumidores. Dessa forma, *P. lineatus* é uma espécie com grande potencial para ser usada como indicadora de contaminação ambiental por NP-TiO₂. De acordo com Valenciennes (1836), *P. lineatus* possui a seguinte classificação sistemática:

Filo: Chordata
 Classe: Actinopterygii
 Divisão: Teleostei
 Superordem: Acanthopterygii
 Ordem: Characiformes
 Subordem: Characoidei
 Família: Prochilodontidae
 Gênero: *Prochilodus*
 Espécie: *Prochilodus lineatus*

1.4. Justificativa

Como uma grande quantidade de produtos industrializados contendo NP-TiO₂ serão produzidos nos próximos anos e ainda não há controle sobre o descarte desses materiais no ambiente, os seus efeitos adversos e risco à saúde precisam ser elucidados em diferentes organismos (HAYNES, 2010). As NP-TiO₂ descartadas em efluentes industriais e domésticos poderão atingir o meio aquático e ficarem disponíveis aos organismos presentes nesse meio. O conhecimento do potencial toxicológico das NP-TiO₂ em peixes é de fundamental importância para que se possa criar uma regulamentação específica permitindo um melhor monitoramento na produção, uso e descarte de novos nanomateriais de forma segura e responsável. Portanto, é imprescindível conhecer os efeitos tóxicos de NP em espécies de peixes endêmicas da região Neotropical, e de importância econômica relevante, encontradas em corpos d'água do Brasil.

1.5. Objetivos gerais

O presente estudo teve os seguintes objetivos:

- I. Avaliar a letalidade das NP-TiO₂ em *P. lineatus* durante 48 horas de exposição.
- II. Determinar o efeito da exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO₂ nas variáveis hematológicas e a genotoxicidade em eritrócitos.
- III. Determinar o efeito da exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂ na regulação iônica e osmótica.
- IV. Investigar a ativação do processo de desintoxicação e atividade antioxidante em brânquias, rins e fígado de *P. lineatus* após exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂.
- V. Avaliar alterações morfofuncionais em brânquias, rins e fígado de *P. lineatus* após exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂.
- VII. Investigar se as NP-TiO₂ podem bioacumular em diferentes tecidos no organismo de *P. lineatus* após exposição subcrônica a NP-TiO₂ por 14 dias.

CAPÍTULO 1

Exposição aguda e subcrônica a nanopartículas de dióxido de titânio em *Prochilodus lineatus*: concentração letal média (CL50; 48 horas), hematologia, genotoxicidade e neurotoxicidade

Resumo

O objetivo do presente estudo foi determinar a concentração letal média (CL-50; 48h) de nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂) e verificar se as NP-TiO₂ causam alterações hematológicas, danos genéticos e neurotoxicidade em *Prochilodus lineatus* após exposição aguda e subcrônica. A CL50; 48 h de NP-TiO₂ para *P. lineatus* foi maior que 300 mg L⁻¹ uma vez que se observou mortalidade dos peixes durante os ensaios de toxicidade. Posteriormente os animais foram expostos a 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ durante 48 h (exposição aguda) e 14 d (exposição subcrônica). As variáveis hematológicas não alteraram após exposição aguda, mas o número de eritrócitos (RBC) diminuiu e o volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) aumentaram após exposição subcrônica. As NP-TiO₂ não apresentaram genotoxicidade em eritrócitos, porém causaram efeitos neurotóxicos após exposição aguda, com a inibição da acetilcolinesterase no músculo. Além disso, ocorreu diminuição no número total de leucócitos e aumento na porcentagem de monócitos no sangue após exposição aguda e diminuição no número total de leucócitos e porcentagem de linfócitos após exposição subcrônica. Esses resultados sugerem que as NP-TiO₂ não causam danos genéticos, porém podem apresentar efeitos neurotóxicos após exposição aguda e distúrbios hematológicos após exposição subcrônica. Portanto, os animais podem sofrer alteração no desenvolvimento neuromotor com consequente vulnerabilidade a predadores e prejuízo em sua capacidade reprodutiva, além de dificuldade respiratória devido à deficiência no transporte de oxigênio. As NP-TiO₂ também parecem diminuir a imunidade de *P. lineatus*, reduzindo a sua capacidade de resistir a patógenos e outras enfermidades.

Palavras-chave: Nanotoxicologia. Teleósteos. Eritrócitos. Leucócitos.

1 Introdução

As nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂) têm muitas aplicações promissoras como em sensores e células solares, na purificação de água via fotodegradação de xenobióticos aquáticos e na produção de cosméticos, tintas, alimentos, medicamentos, plásticos e eletroeletrônicos (MALATO et al., 2009; GUPTA e TRIPATHI, 2011). Entretanto, o descarte desses produtos ou seus resíduos no ambiente podem atingir os ecossistemas aquáticos, que são os primeiros receptores das NPs, e causar efeitos negativos à biota. Os efeitos tóxicos das NP-TiO₂ em peixes, assim como estudos de sua concentração ambiental e dispersão em corpos d'água, ainda não estão completamente elucidados. Devido à falta de regulamentação específica para a manufatura, descarte e tratamento de efluentes contendo NPs pelas agências regulatórias ambientais, e também porque boa parte dos estudos é inconclusiva quanto a sua toxicidade à biota aquática, mais estudos sobre a ação das NP-TiO₂ em diferentes espécies de peixes e em diferentes ambientes aquáticos são de fundamental importância.

A ampla descrição do potencial toxicológico desse nanomaterial em organismos aquáticos é imprescindível considerando a grande quantidade de produtos manufaturados contendo NP-TiO₂ que atingirá o meio aquático nos próximos anos através de efluentes industriais e domésticos. As NP-TiO₂ são possivelmente capazes de atravessar as membranas celulares por processos como difusão (interações de adesão), endocitose ou através de ligação em receptores celulares (SHI et al., 2013). Dessa forma, as NP-TiO₂ podem ser absorvidas no tecido branquial e distribuídas para todo o organismo pelo sangue. No sangue, as NP-TiO₂ podem interagir com proteínas plasmáticas, fatores de coagulação e células sanguíneas podendo causar alterações desses componentes e danos genotóxicos (SHI et al., 2013).

Considerando que o comportamento das NP-TiO₂ pode variar dependendo dos fatores abióticos e bióticos, é muito difícil prever seus efeitos nos organismos de determinada região e daí a dificuldade em estabelecer normas. Como a maior parte dos peixes usados em estudos toxicológicos não ocorrem no Brasil, nem são criados em condições parecidas, há a necessidade de conhecer o potencial tóxico dessas NP em espécies nativas. O curimatá, *Prochilodus lineatus*, é uma espécie com grande potencial para ser usada como indicadora de contaminação ambiental devido a sua moderada a alta sensibilidade a xenobióticos ambientais, que se deve a seu hábito alimentar detritívoro, o qual coloca o animal em contato com xenobióticos presentes na água e nos sedimentos (CARVALHO e FERNANDES, 2008; CAMARGO et al., 2009; GALINDO et al., 2010; MODESTO e MARTINEZ, 2010; PAULINO et al., 2012; SIMONATO et al., 2013). Nesse contexto, o presente estudo teve

como objetivo determinar a concentração letal média (CL-50) em 48 horas de exposição (CL₅₀; 48h) a NP-TiO₂ em *P. lineatus* e investigar se as NP-TiO₂ causam alterações hematológicas e danos genéticos em eritrócitos; alteram o sistema imune e apresentam atividade neurotóxica.

2 Materiais e Métodos

2.1 Caracterização e dinâmica das NP-TiO₂ em suspensão

NP-TiO₂ em pó (AEROXIDE[®] TiO₂ P 25) foi adquirida da Evonik Degussa Brasil Ltda (80% anatase e 20% rutilo, 99,5% de pureza, tamanho médio de 21 nm e superfície específica de $50 \pm 15 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Suspensões de NP-TiO₂ (10 g L^{-1}) foram preparadas no mesmo dia dos experimentos com água Milli-Q e dispersas por 30 minutos previamente aos experimentos utilizando um sonicador (frequência de 40 KHz, Q335D, QUIMIS) sem a adição de solventes. Um volume da suspensão sonicada foi adicionado nos sistemas experimentais de forma a atingir as concentrações de NP-TiO₂ utilizadas. A concentração das NP-TiO₂ na água foi mensurada por Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia utilizando um sistema portátil, no Laboratório de Física Nuclear Aplicada da Universidade Estadual de Londrina (UEL), e utilizando espectrofotômetro de absorção atômica de chama (AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA), no Laboratório de Ecofisiologia Animal da UEL.

Soluções contendo água desclorada utilizadas para os ensaios experimentais foram sonicadas com NP-TiO₂ por 30 minutos e em seguida soluções de diferentes concentrações foram preparadas e uma alíquota foi coletada para análise 0 e 24 horas após o preparo. Em seguida, as amostras foram acidificadas com ácido nítrico 2% para análise da concentração de titânio. As amostras com as concentrações de 0, 1, 5, 10, 50 mg L^{-1} de NP-TiO₂ foram analisadas em espectrofotômetro de absorção atômica de chama e as amostras de 0, 250, 500 e 1000 mg L^{-1} de NP-TiO₂ foram analisadas por Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia. Após a análise, detectou-se uma concentração de NP-TiO₂ de 30% em relação ao valor nominal de NP-TiO₂ que foi preparado (exceto para o tratamento de 1 mg L^{-1} , a qual se detectou uma concentração de NP-TiO₂ de 50% em relação ao valor nominal). Desta forma, os resultados deste estudo foram expressos utilizando o valor real da concentração de NP-TiO₂ presente nos aquários experimentais. O tamanho das NP-TiO₂ foi confirmado utilizando microscópio eletrônico de transmissão (MET) (Philips CM-120, FEI Co.) no Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar. As NP-TiO₂ foram caracterizadas em suspensão aquosa para determinação do tamanho de distribuição das nanopartículas em água e cargas de superfície (potencial Zeta) utilizando espectrofotômetro por espalhamento de luz e potencial Zeta (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments) do laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia da Universidade de São Paulo (Campos de São Carlos).

2.2 Animais

Jovens de *P. lineatus* (massa corpórea: $31,06 \pm 0,39$ g, comprimento total: $14,38 \pm 0,06$ cm) obtidos da Estação de Aquicultura da Usina Hidroelétrica de Furnas, São José da Barra, MG, Brasil, foram aclimatados durante dois meses em tanques de 1000 L com água corrente, sem cloro e aeração constante. Os animais foram alimentados “*ad libitum*” com ração comercial para peixes (FRI-ACQUA 40, Fri-Ribe Rações, 40 % de proteína). As variáveis físicas e químicas da água (temperatura: 22,49-26,34 °C, oxigênio dissolvido: 6,19-7,82 mg L⁻¹, pH: 6,31-7,73, condutividade: 40-58 μS cm⁻³, alcalinidade: 35-43 mg L⁻¹ como CaCO₃ e dureza total: 39-50 mg L⁻¹ como CaCO₃) foram monitoradas e se mantiveram constantes durante o período de aclimação e dos ensaios de toxicidade.

2.3 Teste de toxicidade aguda para determinação da CL50; 48 h

Ensaio de toxicidade aguda para a determinação da concentração letal que causa 50% de mortalidade após 48 h (CL50; 48 h) de exposição foram efetuados observando a ocorrência de mortalidade de acordo com as normas da ABNT (2006) em animais expostos a 0, 50, 250, 500 e 1000 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ (Concentração nominal). Como a concentração real de NP-TiO₂ na água (Análise descrita no subitem “Caracterização e dinâmica das NP-TiO₂ em suspensão” desta tese) foi 30% da concentração original, as concentrações reais foram: 0, 15, 75, 150 e 300 mg L⁻¹ de NP-TiO₂. Os ensaios foram conduzidos em triplicata, em sistema semi-estático, com substituição de 80% da água dos aquários a cada 24 h. Em cada concentração foram usados 4 aquários, com dois peixes por aquário e um total de 8 peixes por concentração. Sinais de intoxicação (posição do peixe na coluna d’ água, níveis de agressividade, sinais de dificuldade respiratória) foram observados após 3, 6, 24 e 48 horas utilizando metodologia descrita por Murty (1988).

2.4. Exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂

Posteriormente, *P. lineatus* foram expostos a 0 (grupo controle), 1, 5, 10 e 50 mg L⁻¹ NP-TiO₂ (Concentração nominal). Como a concentração real de NP-TiO₂ na água (Análise descrita no subitem “Caracterização e dinâmica das NP-TiO₂ em suspensão” desta tese) foi 30% da concentração original, as concentrações reais foram: 0 (grupo controle), 0,5; 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂. Essas foram as concentrações a que algumas espécies mostraram sensibilidade em outros trabalhos (FEDERICI et al., 2007; HALL et al., 2009; HAO et al., 2009; XIONG et al., 2011), e foram escolhidas para esta tese uma vez que a CL50 das NP-TiO₂ em *P. lineatus* foi maior que 100 mg L⁻¹. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente

em cinco aquários, em duplicata (n=10 peixes/tanque 200 L) em sistema semi-estático com renovação de 80% da água com NP-TiO₂ a cada 24h. Durante a exposição subcrônica os animais foram alimentados a cada três dias imediatamente antes da renovação da água dos aquários. Sinais de intoxicação foram observados após 3, 6, 24 e 48 horas no ensaio agudo (48 h) e após 1, 3, 5, 7, 11 e 14 dias de exposição às NP-TiO₂ no ensaio subcrônico (14 d) utilizando metodologia descrita por Murty (1988).

Ao final dos ensaios de exposição aguda e subcrônica, os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹) para colheita de amostras de sangue (~ 0,5 mL), via punção da veia caudal com seringas heparinizadas, e em seguida, foram pesados, medidos e sacrificados via secção medular. Amostras de músculo e cérebro foram congeladas e armazenadas a -80°C para análises bioquímicas. Um total de 12 animais por grupo de exposição foi utilizado para as análises hematológicas, de genotoxicidade em eritrócitos e análises bioquímicas. Para as análises da concentração de titânio em músculo e cérebro foram utilizados 8 animais por grupo de exposição. A realização dos experimentos foi aprovada pelo Comitê de Ético Animal (Protocolo nº 027/2011) e Comitê de Ética Ambiental (Protocolo nº 002/2011) da UFSCAR.

2.5 Concentração de titânio em músculo e cérebro

Amostras de tecido foram secas a 60°C até peso constante e então foram digeridas a 60°C durante 48h em ácido nítrico (HNO₃) concentrado (Ultrapur- Merck, 69%) na proporção 1:5 (mg de tecido: µL HNO₃) com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na proporção 1:8 (H₂O₂: HNO₃). Após a digestão as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 g e o sobrenadante foi usado para análise. A concentração de titânio nas amostras foi lida em espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite acoplado (AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA) no Laboratório de Ecofisiologia Animal da UEL.

2.6 Análises hematológicas

As amostras de sangue foram utilizadas para a determinação do hematócrito (Hct, %), número total de eritrócitos (Red Blood Cells- RBC, 10⁶ µL⁻¹), concentração de hemoglobina (Hb, g dL⁻¹) e índices hematimétricos. O Hct foi determinado pela técnica do microhematócrito como descrito por Goldenfa et al. (1971), o RBC foi determinado em câmara de Neubauer utilizando microscópio de luz Olympus BX 51 (aumento de 400x), após diluição da amostra de sangue em solução formol-citrato. A concentração de Hb foi determinada pelo método da cianometemoglobina (COLLIER, 1944) com diluição do sangue

em solução de Drabkin. Os dados de Hct, concentração de Hb e RBC foram utilizados para o cálculo dos índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas com o corante May-Grunwald-Giemsa-Wright seguindo a metodologia de TAVARES-DIAS e MORAES (2003), para a contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de trombócitos utilizando microscópio de luz. A contagem foi feita de acordo com MCKNIGHT (1966), contando-se 3000 células no total e diferenciando-se os eritrócitos, trombócitos e leucócitos. Para a contagem diferencial de leucócitos foram contados 200 leucócitos separadamente.

2.7 Ensaio cometa com eritrócitos

O ensaio cometa foi realizado no Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná de acordo com Singh et al. (1988) e modificações de Ferraro et al. (2004). 10 µL de sangue foram coletados e diluídos em 1 mL de soro bovino fetal (PBS) para a confecção das extensões sanguíneas em lâminas previamente tratadas com agarose 1,5% (1,5 g em 100 mL de PBS) a 60 °C. 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (0,1 g em 20 ml de PBS), mantida a 37 °C em banho-maria foi depositada sob a lâmina e acondicionada sob-refrigeração durante 10 a 20 minutos no escuro. As lâminas foram então acondicionadas na solução de lise (solução de lise estoque: NaCl, 2,5M; EDTA, 100 mM; Tris, 10 mM; NaOH, 0,8%; N-lauryl-sarcocinate, 1%; solução de lise uso: 1 mL Triton X100; 10 mL DMSO; e 89 mL de solução de lise estoque) a 4°C durante 24 horas. As lâminas foram cobertas com tampão de eletroforese alcalino (300 mM NaOH/1 mM EDTA, pH>13) na cuba de eletroforese para desnaturação do DNA a 4°C por 30 minutos. Em seguida as lâminas foram submetidas à corrente elétrica de 25 volts e 300 mA por 25 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas e neutralizadas 3 vezes com 5 ml de tampão de neutralização (0,4M Tris, pH 7,5) por 5 minutos cada. Após a secagem, as lâminas foram fixadas com etanol absoluto por 5 minutos, coradas com 20 µL de brometo de etídio (20 mg L⁻¹) e analisadas em microscópio de epifluorescência Zeiss utilizando aumento de 400x. Para cada animal foram analisadas 100 células (nucleóides) e a avaliação ocorreu de acordo com a intensidade da cauda formada classificada em cinco classes: 0 (sem danos visíveis); 1 (pouco dano); 2 (dano médio); 3 (grande número de danos) e 4 (dano máximo). Os cometas em que não foi possível visualizar a região da cabeça foram desconsiderados da contagem, pois representavam DNAs totalmente fragmentados, característicos de células inviáveis. Os escores foram calculados através da multiplicação do número de nucleóides encontrados em

cada classe pelo valor da classe, como mostrado na fórmula a seguir: $\text{Escore} = [(0 \times \text{no dano } 0) + (1 \times \text{no dano } 1) + (2 \times \text{no dano } 2) + (3 \times \text{no dano } 3) + (4 \times \text{no dano } 4)]$.

2.8 Teste do micronúcleo písceo

O teste do micronúcleo (MN) com coloração fluorescente de laranja de acridina em eritrócitos foi realizado no Laboratório de Citogenética Animal da Universidade Federal do Paraná de acordo com Ueda et al. (1992). O teste foi utilizado para a determinação da frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares eritrocíticas (ANEs). Amostras de sangue diluídas em PBS (1:1) foram utilizadas para confecção de extensões sanguíneas posteriormente fixadas com etanol absoluto por 15 minutos e coradas com 20 μL de laranja de acridina a 0,003% em tampão Sorenson's (pH 6,8) por 2 a 3 minutos para análise em microscópio de epifluorescência Zeiss, em aumento de 1000x. A identificação de MN foi realizada segundo Çavas e Ergene-Gözükara (2005). A laranja de acridina corou seletivamente eritrócitos policromáticos. Em microscopia de fluorescência, micronúcleos e os principais núcleos apresentavam forte fluorescência verde-amarelo. 1000 células por peixe foram analisadas em teste cego para a contagem de micronúcleos e também de alterações morfológicas nucleares, também classificadas como indicativos de genotoxicidade. As alterações morfológicas nucleares foram classificadas conforme proposto por Carrasco et al., (1990): núcleo segmentado, lobulado, vacuolar, reniforme e binucleado. Os resultados foram apresentados como uma frequência do total dos eritrócitos contados.

2.9 Atividade da acetilcolinesterase em músculo e cérebro

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) ($\text{nmol ACTI hidrolisada min}^{-1} \text{ mg Pt}^{-1}$) foi determinada segundo Ellman et al. (1961). O método consiste em detectar o 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina e o 5-tio-2-nitrobenzoato formados pela reação entre a tiocolina (produto da hidrólise da acetiltiocolina pela AChE) e o DTNB a 405 nm. A atividade da enzima foi expressa pela concentração de proteína no tecido, a qual foi quantificada utilizando o kit comercial Micropote Pirogalol da Doles® (Doles Reagentes, Goiânia, Brasil). Leitora de microplaca (SpectraMax® M5 Multi-Mode, Molecular Devices, USA) foi utilizada para a leitura da atividade da AChE e da concentração de proteína tecidual (mg mL^{-1}). As amostras foram homogeneizadas em solução tampão (fosfato de potássio, 0,1M, pH 7,5) para leitura da concentração de proteínas e ensaio da acetilcolinesterase. A mistura reativa do ensaio consistiu em 20 μL do sobrenadante, 130 μL de solução de DTNB (0,75 mM), e 50 μL de

iodeto de acetilcolina (9 mM) e a leitura da absorbância foi feita a 25°C durante 2 minutos com intervalo de 12 segundos.

2.10 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Após o teste de normalidade, homogeneidade de variância e linearidade, aplicou-se o teste paramétrico Análise de Variância (ANOVA) de uma via ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. No caso em que diferenças significativas foram detectadas no teste de ANOVA, o teste de Dunnett foi aplicado para verificar onde ocorreram as diferenças. Todos os testes foram efetuados com nível de significância de 0,05 usando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft, Estados Unidos).

3 Resultados

3.1 Caracterização e dinâmica das NP-TiO₂ em suspensão

O tamanho das NP-TiO₂ analisado a partir de imagens do MET foi próximo ao informado pelo fabricante (média \pm E.P.M., n=30 imagens, 23,69 \pm 0,37 nm) (Fig. 1). O valor médio para o tamanho dos agregados de NP em suspensão (diâmetro hidrodinâmico) nas concentrações experimentais (0,5 a 15 mg L⁻¹) foi de 219,8 nm (com limite de 122,4 a 458,7) e o potencial zeta de -13,87 mV (com limite de -11,7 a -20,0).

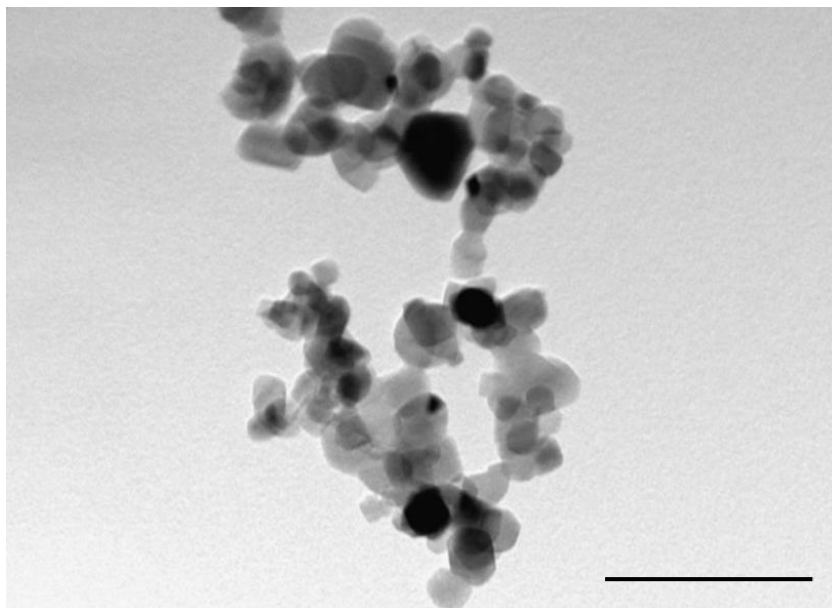


Fig. 1 - Eletromicrografia de NP-TiO₂ em suspensão em água Milli-Q. Barra de escala = 100 nm.

3.2 Concentração de titânio em músculo e cérebro

A concentração de titânio nas amostras é apresentada na Tabela 1. A concentração de titânio aumentou significativamente ($p < 0,05$) em músculos e cérebros de animais expostos a 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ por 14 dias.

Tabela 1 - Concentração de titânio no tecido de *Prochilodus lineatus* exposto a NP-TiO₂ por 14 dias

Tratamento	Tecido	
	Músculo	Cérebro
Controle	0,37 ± 0,07	0,57 ± 0,08
0,5 mg L ⁻¹ de NP-TiO ₂	0,61 ± 0,04	0,73 ± 0,05
1,5 mg L ⁻¹ de NP-TiO ₂	0,87 ± 0,05	0,94 ± 0,04
3,0 mg L ⁻¹ de NP-TiO ₂	1,57 ± 0,04 *	1,22 ± 0,08 *
15,0 mg L ⁻¹ de NP-TiO ₂	3,65 ± 0,29 *	1,92 ± 0,20 *

Dados são média ± EPM expressados como µg Ti g⁻¹ de tecido seco. Controle= 0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂. * representam diferença significativa entre cada tratamento e seu respectivo grupo controle. Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

3.3 Toxicidade das NP-TiO₂

A CL50; 48 h determinada para as NP-TiO₂ em *P. lineatus* foi maior que 300 mg L⁻¹, pois durante todos os experimentos não ocorreu mortalidade em nenhuma das concentrações utilizadas, os animais estavam um pouco agitados e nadando no meio da coluna d'água, porém não apresentavam dificuldade respiratória e hiperventilação. Uma coloração mais clara foi observada nos peixes em relação aos animais do grupo controle. Durante os experimentos de exposição aguda (48h) e subcrônica (14 d) às NP-TiO₂ não ocorreu mortalidade em nenhum dos tratamentos. No entanto, após 7 d de experimento os animais expostos a 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ permaneciam por algum tempo no meio da coluna d'água, nadavam em círculos e apresentavam coloração mais clara em relação ao controle.

3.4 Respostas hematológicas, contagem de leucócitos e trombócitos

As variáveis hematológicas de *P. lineatus* após exposição aguda (48 h) e subcrônica (14 d) às NP-TiO₂ estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3. No ensaio agudo, não se observou diferenças significativas ($p > 0,05$) em nenhuma das variáveis hematológicas analisadas comparando os tratamentos com o respectivo grupo controle. No ensaio subcrônico, não se observou diferenças significativas ($p > 0,05$) no Hct, Hb e CHCM nos animais expostos às NP-TiO₂ em relação ao grupo controle. Entretanto, ocorreu diminuição ($p < 0,05$) no RBC em

todas as concentrações de NP-TiO₂, aumento ($p < 0,05$) no VCM nas concentrações de 0,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ e aumento ($p < 0,05$) no HCM nas concentrações de 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂.

As células sanguíneas encontradas em extensões do sangue de *P. lineatus* são mostradas na Fig. 2. A exposição aguda a NP-TiO₂ causou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no número total de leucócitos dos animais expostos a 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ e um aumento significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de monócitos no sangue em animais expostos a 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ em relação ao grupo controle (Tabela 2). No entanto, não se observou alterações significativas ($p > 0,05$) na contagem de trombócitos e porcentagem de linfócitos imaturos, linfócitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos e células granulocíticas especiais após exposição aguda (Tabela 2). Por outro lado, ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no total de leucócitos nos animais expostos a 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ e na porcentagem de linfócitos naqueles expostos a 3,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ (exposição subcrônica) (Tabela 3). Com relação à contagem diferencial, a porcentagem de linfócitos imaturos, basófilos, eosinófilos, monócitos, neutrófilos e células granulocíticas especiais não alteraram significativamente ($p > 0,05$) em relação ao controle, assim como a contagem de trombócitos após exposição subcrônica (Tabela 3).

Tabela 2 - Variáveis hematológicas de *Prochilodus lineatus* expostos a nanopartículas de TiO₂ durante 48 h (exposição aguda)

Parâmetro	Controle	0,5 mg L ⁻¹	1,5 mg L ⁻¹	3,0 mg L ⁻¹	15,0 mg L ⁻¹
Eritrócitos totais (10 ⁶ µL ⁻¹)	1,89 ± 0,15	1,96 ± 0,09	1,73 ± 0,11	1,83 ± 0,09	2,28 ± 0,17
Hematócrito (%)	35,54 ± 0,57	38,83 ± 1,32	33,83 ± 0,72	34,92 ± 1,02	37,46 ± 0,93
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	8,81 ± 0,35	9,82 ± 0,35	9,61 ± 0,27	9,34 ± 0,19	10,00 ± 0,34
VCM (fL)	194,06 ± 16,12	206,71 ± 7,69	201,88 ± 12,52	194,76 ± 9,07	172,31 ± 9,46
HCM (pg/cel)	46,74 ± 3,97	50,87 ± 2,23	56,71 ± 3,22	52,28 ± 2,44	45,83 ± 2,63
CHCM (g/dL)	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,28 ± 0,00	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01
Leucócitos totais (10 ⁴ µL ⁻¹)	3,78 ± 0,56	2,70 ± 0,22	1,62 ± 0,16 *	2,04 ± 0,22 *	3,31 ± 0,35
Trombócitos (10 ⁴ µL ⁻¹)	3,02 ± 0,35	3,07 ± 0,26	2,76 ± 0,28	2,94 ± 0,22	2,92 ± 0,46
Linfócitos imaturos (%)	1,46 ± 0,43	0,30 ± 0,21	0,10 ± 0,10	0,40 ± 0,16	0,50 ± 0,17
Linfócitos (%)	90,1 ± 1,8	84,0 ± 4,4	81,1 ± 4,6	85,5 ± 2,5	83,1 ± 2,5
Basófilos (%)	0,10 ± 0,10	0	0	0	0
Eosinófilos (%)	0,27 ± 0,15	0	0,10 ± 0,10	0	0
Monócitos (%)	3,50 ± 0,48	5,93 ± 1,22	6,79 ± 1,51	7,90 ± 1,57	9,38 ± 1,32 *
Neutrófilos (%)	4,54 ± 1,34	9,74 ± 3,99	11,79 ± 3,73	6,20 ± 1,69	7,07 ± 2,09
Células granulocíticas especiais (%)	0	0	0,10 (± 0,10)	0	0

Abreviações: volume corpuscular Médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Valores são representados por média ± EPM. Controle= 0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂. * representam diferenças significativas entre os tratamentos e o seu respectivo grupo controle (ANOVA, p <0.05); Kruskal-Wallis foi aplicado para VCM, CHCM, Leucócitos totais, Linfócitos imaturos, Basófilos, Eosinófilos, Neutrófilos e Células granulocíticas especiais (p <0.05).

Tabela 3 - Variáveis hematológicas de *Prochilodus lineatus* expostos nanopartículas de TiO₂ durante 14 d (exposição subcrônica)

Parâmetro	Controle	0,5 mg L ⁻¹	1,5 mg L ⁻¹	3,0 mg L ⁻¹	15,0 mg L ⁻¹
Eritrócitos totais (10 ⁶ µL ⁻¹)	1,59 ± 0,07	1,35 ± 0,05 *	1,37 ± 0,05 *	1,30 ± 0,05 *	1,32 ± 0,04 *
Hematócrito (%)	27,13 ± 0,68	27,71 ± 1,17	26,13 ± 0,57	27,67 ± 1,09	26,63 ± 0,81
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	6,47 ± 0,28	6,50 ± 0,27	6,57 ± 0,18	6,78 ± 0,26	6,60 ± 0,36
VCM (fL)	173,83 ± 8,31	203,52 ± 7,02 *	189,96 ± 6,55	211,19 ± 8,31 *	202,98 ± 6,13 *
HCM (pg/cel)	39,77 ± 2,86	48,17 ± 2,57	47,95 ± 1,26	51,63 ± 1,5 *	51,34 ± 2,25 *
CHCM (g/dL)	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Leucócitos totais (10 ⁴ µL ⁻¹)	3,65 ± 0,30	3,99 ± 0,26	3,13 ± 0,41	4,39 ± 0,38	2,13 ± 0,27 *
Trombócitos (10 ⁴ µL ⁻¹)	2,97 ± 0,36	2,98 ± 0,27	3,19 ± 0,29	2,94 ± 0,47	2,50 ± 0,32
Linfócitos imaturos (%)	0,79 ± 0,29	0,35 ± 0,23	1,34 ± 0,45	0,49 ± 0,16	0,86 ± 0,36
Linfócitos (%)	88,9 ± 0,9	89,0 ± 1,2	87,5 ± 1,2	81,9 ± 1,1 *	83,5 ± 2,5
Basófilos (%)	0,09 ± 0,09	0	0	0	0
Eosinófilos (%)	0,27 ± 0,14	0,19 ± 0,13	0,10 ± 0,10	0,30 ± 0,15	0,60 ± 0,34
Monócitos (%)	4,82 ± 0,71	3,78 ± 0,51	4,68 ± 0,92	8,58 ± 1,20	6,90 ± 1,68
Neutrófilos (%)	5,15 ± 0,94	6,72 ± 0,93	6,31 ± 1,35	8,69 ± 0,73	8,62 ± 1,98
Células granulocíticas especiais (%)	0	0	0,10 ± 0,10	0,20 ± 0,13	0,10 ± 0,10

Abreviações: Anova (A), Kruskal–Wallis (K), volume corpuscular Médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Valores são representados por média ± EPM. Controle= 0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂. *representam diferenças significativas entre os tratamentos e o seu respectivo grupo controle (ANOVA, p <0.05); Kruskal-Wallis foi aplicado para HCM, Linfócitos, Basófilos, Eosinófilos, Monócitos e Células granulocíticas especiais (p <0.05).

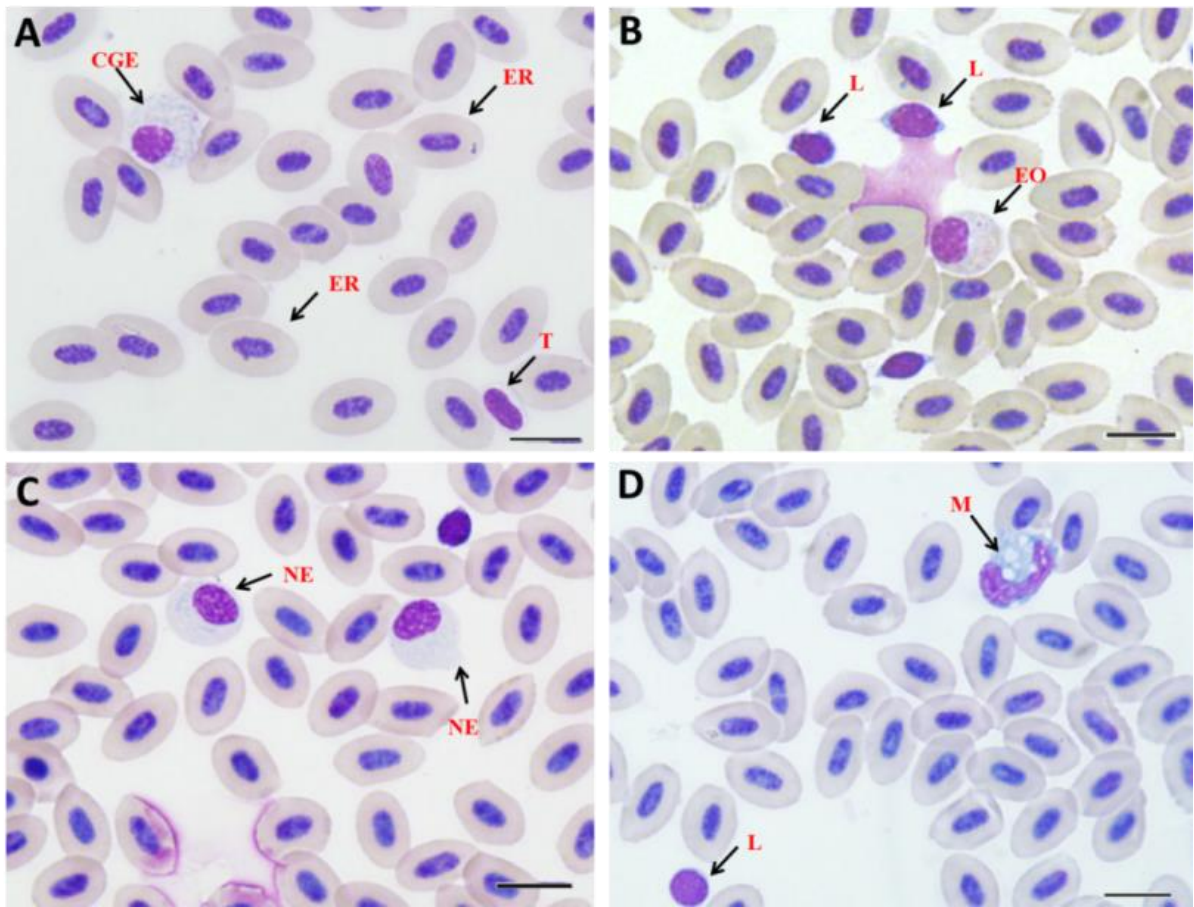


Fig. 2 - Células sanguíneas de *Prochilodus lineatus* coradas com May-Grunwald-Giemsa-Wright. Eritrócito=ER; célula granulocítica especial= CGE; trombócito= T; linfócito= L; eosinófilo= EO; neutrófilo= NE; monócito= M. Barra de escala = 10µm.

3.5 Ensaio cometa e teste do micronúcleo písceo

Eritrócitos de *P. lineatus* expostos a NP-TiO₂ apresentaram diminuição ($p < 0,05$) no escore de dano do DNA após exposição aguda a 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ em relação ao grupo controle e após exposição subcrônica não observaram-se diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4). Por outro lado, a frequência de MN e ANEs não variaram significativamente ($p > 0,05$) em todos os peixes expostos a NP-TiO₂ após exposição aguda e subcrônica (Tabela 4).

Tabela 4 - Escore de danos (ensaio cometa), frequência de micronúcleo (MN) e outras anormalidades nucleares eritrocíticas em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* expostos a NP-TiO₂ durante 48 h (exposição aguda) e 14 d (exposição subcrônica)

Alteração	NP-TiO ₂ (mg L ⁻¹)				
	C	0,5	1,5	3,0	15,0
48 h					
Escore	265,63 ± 16,14	302,42 ± 17,90	267,00 ± 21,21	260,44 ± 21,95	132,73 ± 14,77*
MN (‰)	0	0,15 ± 0,11	0,05 ± 0,05	0,10 ± 0,07	0,15 ± 0,11
ANE (‰)	0,95 ± 0,18	2,00 ± 0,45	2,30 ± 0,88	1,70 ± 0,36	0,95 ± 0,25
14 dias					
Escore	326,77 ± 26,05	327,00 ± 14,97	301,06 ± 18,83	325,63 ± 16,28	297,50 ± 28,34
MN (‰)	0,15 ± 0,11	0,30 ± 0,13	0,20 ± 0,09	0,20 ± 0,09	0,20 ± 0,09
ANE (‰)	1,00 ± 0,18	1,90 ± 0,34	1,25 ± 0,34	0,65 ± 0,21	1,20 ± 0,29

Valores são representados por média ± EPM. C= Controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂). *representam diferenças significativas entre os tratamentos e o seu respectivo grupo controle ($p < 0,05$). A: Anova (Escore e MN) e K: Kruskal-Wallis (ANE)

3.6 Neurotoxicidade

A exposição aguda a NP-TiO₂ diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no músculo branco de *P. lineatus* para todas as concentrações testadas, enquanto nenhuma alteração significativa ($p > 0,05$) foi observada no cérebro (Fig. 3). Após exposição subcrônica a NP-TiO₂ não ocorreram alterações significativas ($p > 0,05$) na atividade da AChE no músculo branco e no cérebro dos animais testados neste estudo (Fig. 3).

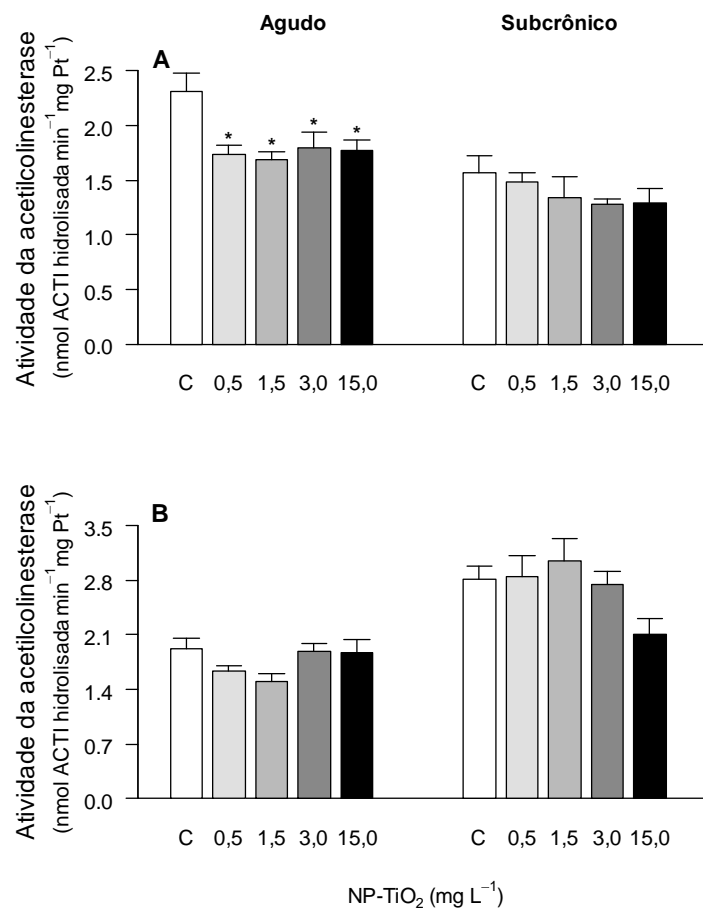


Fig. 3 - Atividade da acetilcolinesterase no músculo (A) e cérebro (B) de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO₂. C= controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂), pt= proteína. Dados são média ± E.P.M. * Indicam diferenças significantes do respectivo grupo controle (agudo ou subcrônico) (ANOVA, $p < 0,05$).

4 Discussão

4.1 Toxicidade das NP-TiO₂

As NP-TiO₂ não foram consideradas letais para *P. lineatus* uma vez que não afetaram a sobrevivência dos peixes expostos a concentrações tão altas quanto 300 mg L⁻¹ de NP-TiO₂, que são maiores que o limite determinado pela legislação para indicar que uma substância não é tóxica (ABNT, 2006). Em outras espécies como *Danio rerio* (CL50; 48 h > 100 mg L⁻¹ de NP-TiO₂; ZHU et al., 2008; XIONG et al., 2011), *Pimephales promelas* (CL50; 48 h > 500 mg L⁻¹ de NP-TiO₂; HALL et al., 2009), *Oncorhynchus mykiss* (CL50; 96 h > 100 mg L⁻¹ de NP-TiO₂; WARHEIT et al., 2007) e *Cyprinus carpio* (0% de mortalidade após exposição a 200 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ durante 20 dias, HAO et al., 2009) as NP-TiO₂ também não apresentaram toxicidade.

Alterações no comportamento têm sido descrito em animais expostos às NP-TiO₂. Hao et al. (2009) reportaram alteração do comportamento natatório tais como natação errática e em círculos próximo a coluna d'água em *Cyprinus carpio* expostos a 50 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ durante 20 dias. Além disso, alteração na fluuabilidade e alta secreção de muco também foram observadas em 14 dias de exposição a NP-TiO₂ em *Oncorhynchus mykiss* (1 mg L⁻¹ de NP-TiO₂; FEDERICI et al., 2007). Os resultados obtidos em *P. lineatus* expostos às NP-TiO₂ corroboram os estudos prévios realizados em outras espécies de peixes e sugerem que a exposição subcrônica as NP-TiO₂ alteraram o comportamento natatório dos peixes. Como não houve mortalidade até a concentração de 300 mg L⁻¹ pelo período de 48 h, as NP-TiO₂ podem ser consideradas não letais para peixes embora as alterações do comportamento natatório sugiram que as NP-TiO₂ podem afetar a função de alguns órgãos. Normas específicas ainda devem ser estabelecidas e consolidadas para testar a toxicidade de NP.

4.2 Respostas hematológicas

As alterações observadas nas variáveis hematológicas de *P. lineatus* expostos a NP-TiO₂ por 14 dias, principalmente a diminuição do RBC e aumento do VCM e HCM, podem ser causados pela ação da adrenalina, hormônio do estresse, que favorece a troca de H⁺ por Na⁺ e aumento de íons Na⁺ e Cl⁻ no meio intracelular com consequente entrada de água na célula e aumento de volume eritrocitário (RAILO et al., 1985; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). A entrada de água nas células pode ter provocado a hemólise de eritrócitos levando a diminuição do RBC. Hemólise em eritrócito já foi relatada devido a exposição a NP-TiO₂ *in vitro*, diminuindo o RBC (GHOSH et al., 2012; SHI et al., 2013) e pelo presente trabalho pode-se sugerir que o mesmo processo ocorre *in vivo*.

Nos peixes, os leucócitos são produzidos e armazenados no rim anterior, com exceção dos linfócitos T, que são produzidos no timo (CARLSON e ZELIKOFF, 2008). No entanto, estudos comprovam que o rim é o órgão onde mais ocorre o acúmulo de NP-TiO₂ (JOVANOVIC et al., 2011), e no presente trabalho esse acúmulo de NP-TiO₂ no rim também foi constatado (Capítulo 2). Assim, sugere-se que a população de leucócitos que ali são produzidos e armazenados fica intensamente exposta às NP, o que pode causar a redução na produção e função dessas células de defesa, como já foi comprovado no caso dos neutrófilos (JOVANOVIC et al., 2011). Os metais afetam a resposta imune de várias espécies de peixe, o que resulta em uma menor resistência contra patógenos (CARLSON e ZELIKOFF, 2008). Essa resposta imune pode ser alterada devido à destruição, sensibilização e alteração das funções celulares, como a atividade fagocítica dos macrófagos e neutrófilos, através da indução ou inibição da proliferação celular ou da formação de precursores celulares (CARLSON e ZELIKOFF, 2008). Por outro lado, a exposição a baixas concentrações de metais pode ativar o sistema imune dos peixes, estimulando a atividade de macrófagos (O'HALLORAN et al., 1998) ou da produção de substâncias inflamatórias (ORTEGA et al., 2013). Isso provavelmente explica porque os resultados de experimentos imunotoxicológicos com metais são controversos (O'HALLORAN et al., 1998). Os efeitos de metais na resposta imune de peixes dependem da dose, do tempo e do modo de exposição (CARLSON e ZELIKOFF, 2008).

A diminuição do número de leucócitos totais neste trabalho, após exposição subcrônica, corrobora a hipótese de que as NP afetam negativamente a produção ou manutenção dessas células. O aumento do número de monócitos circulantes após exposição aguda possivelmente está associado a duas consequências da exposição às NP: apoptose de células, onde ocorre o acúmulo da nanopartículas, e a formação de agregados de plaquetas no sangue. Entre as células em que pode ocorrer o acúmulo de NP estão as células ricas em mitocôndrias (CRM), presentes principalmente no epitélio branquial, renal e intestinal e cujas ATPases de membrana têm alta afinidade por metais como o titânio (LI et al., 1996). Outro tipo de célula em que a apoptose é induzida pelas NP são os neutrófilos, que fazem a fagocitose de nanopartículas menores que 3 µm (JOVANOVIC et al., 2011). Células apoptóticas são removidas pelos macrófagos, cujo precursor no sangue são os monócitos (CARLSON e ZELIKOFF, 2008). Além de células apoptóticas e fragmentos celulares, os macrófagos também estão envolvidos na fagocitose e remoção de agregados de plaquetas que se formam no sangue induzidos pelas NP (JOVANOVIC et al., 2011). Em um estudo em que os peixes foram expostos à NP-TiO₂ por 48 h, foi demonstrado o aumento de um fator que

promove a diferenciação de monócitos em macrófagos (JOVANOVIC et al., 2011). Neste estudo, o aumento do número de monócitos circulantes, portanto, deve ter sido resultado do aumento da produção de monócitos no rim, de forma a compensar a “perda” de monócitos que migraram para os tecidos e se diferenciaram em macrófagos.

Após a exposição subcrônica, a diminuição dos leucócitos totais no sangue foi observada apenas em animais expostos a 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂, indicando recuperação dos níveis de leucócitos totais em animais expostos a concentrações de NP-TiO₂ mais baixas, embora a percentagem de linfócitos nos animais expostos a 3,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ tenha diminuído. A baixa quantidade de leucócitos circulantes mostra que não houve recuperação do sistema imune, ao menos para a maior concentração de NP-TiO₂ deste trabalho. Em outros estudos, no entanto, peixes expostos a metais por uma semana apresentaram, após uma redução inicial, uma recuperação da resposta imune (CARLSON e ZELIKOFF, 2008). A toxicidade inicial das NP-TiO₂ induz a produção de enzimas protetoras como a metalotioneína (CARLSON e ZELIKOFF, 2008), o que, se ocorreu neste estudo, não foi suficiente para manter a população de leucócitos no sangue dos peixes expostos a 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂. Portanto, a exposição às NP-TiO₂ pode diminuir a imunidade de *P. lineatus* e possivelmente reduzir a capacidade de resistir a patógenos tornando-os mais suscetíveis a doenças.

4.3 Ensaio cometa e teste do micronúcleo písceo

A capacidade das NP causarem danos no DNA ou formação de MN e ANEs no organismo de mamíferos, peixes e em linhagens de células humanas está bem descrita pela literatura (SHI et al., 2013; VIGNARDI et al., 2015). Karlsson et al. (2010) descreveram que esses danos podem ser causados por diferentes mecanismos tais como pela capacidade das NP estimularem células-alvo a produzirem oxidantes ou compostos genotóxicos, pela habilidade das NP em causar inflamação com consequente formação de oxidantes, pelo aumento da permeabilidade da membrana lisossomal, que poderia permitir que as enzimas de degradação do DNA entrassem em contato com o núcleo ou por interação direta com o DNA nuclear durante a divisão mitótica.

O efeito citotóxico das NP-TiO₂ é bastante controverso. Em camundongos tratados com doses de até 1387 mg kg⁻¹ NP-TiO₂, via injeção intravenosa, durante 14 dias, não ocorreu a formação de micronúcleo (XU et al., 2013). Entretanto, Chen et al. (2014) encontraram danos genotóxicos como a ruptura de filamentos duplos do DNA em células da medula óssea de ratos expostos a doses de 50 mg kg⁻¹ de NP-TiO₂ por 30 dias, via oral, e diminuição da viabilidade celular em concentrações acima de 5 mg kg⁻¹ após 24 e 48 horas de exposição. O

poder oxidativo e genotóxico das NP-TiO₂ parece ser potencializado pela luz ultravioleta e luz visível (REEVES et al., 2008; KARLSSON et al., 2010). No entanto, no presente estudo as NP-TiO₂ não foram genotóxicas para *P. lineatus* mesmo com exposição à luz ultravioleta por 12 h. O escore do grupo de animais controle foi alto, o que pode ter mascarado os resultados de uma possível genotoxicidade das NP-TiO₂ no presente estudo. Este escore alto pode ter sido um resultado completamente casual, ou um resultado do estresse da exposição, com troca da água dos aquários a cada 24 horas, ou ainda devido à sensibilidade das células de estudo da espécie.

4.4 Neurotoxicidade

O principal papel da AChE é a hidrólise do éster acetilcolina, que é um neurotransmissor liberado das vesículas sinápticas durante a transmissão de um impulso nervoso (BRADBURY et al., 2008; LIMA et al., 2013). Normalmente, a inibição de esterases está relacionada com pesticidas como compostos organofosforados e carbamatos, que atuam como pseudosubstratos destas enzimas (BARATA et al., 2004). Entretanto, estudos em peixes relataram o efeito neurotóxico também de metais como mercúrio, chumbo e cádmio inibindo esterases, e a forma como metais poderiam inibir a AChE ainda é discutida (RICHETTI et al., 2011; LIMA et al., 2013).

A inibição da atividade da AChE em peixes pode causar um aumento do neurotransmissor nas sinapses superestimulando os receptores muscarínicos e nicotínicos, o que desencadeia uma série de alterações no organismo como mudança na temperatura corpórea, frequência cardíaca, pressão sanguínea, contrações musculares involuntárias e pode alterar o desenvolvimento neuromotor em peixes juvenis e afetar sua reprodução (BRADBURY et al., 2008). No entanto, não se observou efeito após exposição subcrônica das NP-TiO₂ na atividade da AChE no músculo branco e no cérebro dos animais testados neste estudo, o que pode ser resultado de ajustes fisiológicos, como a produção de metalotioneína, que pode ter evitado os efeitos neurotóxicos das NP.

5 Conclusões

Este estudo mostra que NP-TiO₂ não causam mortalidade em *P. lineatus* até o limite estabelecido pela ABNT (100 mg L⁻¹), o que indica baixa toxicidade. A exposição a concentrações de NP-TiO₂ relativamente baixas (0,5, 1,5, 3,0 e 15,0 mg L⁻¹) não causam danos genéticos, mas resultam em neurotoxicidade transitória que é restabelecida provavelmente devido a ajustes fisiológicos. Entretanto, alterações hematológicas e no sistema imune ocorre durante longo período de exposição às NP-TiO₂ reduzindo a capacidade de *P. lineatus* em resistir a patógenos e outras enfermidades.

6 Agradecimentos

Este estudo foi realizado na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2011/10339-0) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia- Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq Proc. 573949/2008-5), com a utilização de peixes fornecidos pela Estação de Aquicultura da Usina Hidroelétrica de Furnas. Os autores agradecem ao Dr. Valtencir Zucolotto do Departamento de Física e Ciências Materiais da Universidade de São Paulo (USP), pela caracterização das NP-TiO₂ em suspensão. Os autores também são gratos aos doutores Carlos Roberto Appoloni e Tiago Dutra Galvão, do Departamento de Física da Universidade Estadual de Londrina, e os doutores Cláudia Bueno dos Reis Martinez e Wagner Ezequiel Risso, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, pela ajuda na quantificação de titânio na água e tecidos estudados. A avaliação dos parâmetros de genotoxicidade foi realizada com o auxílio da Dra Marta Margarete Cestari e Msc. Emanuele Cristina Pesenti, ambas do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

7 Referências

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2006. 19 p.
- BARATA, C.; SOLAYAN, A.; PORTE, C. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.*, v. 66, 125-139, 2004.
- BRADBURY, S.P.; CARLSON, R.W.; HENRY, T.R.; PADILLA, S.; COWDEN, J. Toxic responses of the fish nervous system. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. *The Toxicology of Fishes*. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 417-455.
- CAMARGO, M.M.P.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the Neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquat. Toxicol.*, v. 94, 40-46, 2009.
- CARLSON, E.; ZELIKOFF, J.T. The immune system of fish: a target organ of toxicity. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. *The toxicology of fishes*. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 401-415.
- CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Sci.*, v. 47, 2123-2136, 1990.
- CARVALHO, C.D.; FERNANDES, M.N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, v. 151, 437-442, 2008.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents. *Aquat. Toxicol.*, v. 74, 264-271, 2005.
- CHEN, Z.; WANG, Y.; BA, T.; LI, Y.; PU, J.; CHEN, T.; SONG, Y.; GU, Y.; QIAN, Q.; YANG, J.; JIA, G. Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol. Letters*, v. 226, 314-319, 2014.
- COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Can. Med. Assoc. J.*, v. 50, 550-552, 1944.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.J.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, v. 7, 88-95, 1961.
- 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. *Aquat. Toxicol.*, v. 84, 415-430, 2007.
- 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

Hoplias malabaricus as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. Genet. Mol. Biol., v. 27, p.103-107, 2004.

GALINDO, B.A.; TROILO, G.; COLUS, I.M.S.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genotoxic effects of aluminum on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Water Air Soil Poll., v. 212, 419-428, 2010.

GHOSH, M.; CHAKRABORT, A.; MUKHERJEE, A. Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. J. Appl. Toxicol., v. 33, 1097-1110, 2013.

GOLDENFA, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in hematology laboratory - Microhematocrit determination. Am. J. Clin. Pathol., v. 56, 35-39, 1971.

GUPTA, S. M.; TRIPATHI, M. A review of TiO₂ nanoparticles. Chin. Sci. Bull., v. 56, 1639-1657, 2011.

HALL, S.; BRADLEY, T.; MOORE, J.T.; KUYKINDALL, T.; MINELLA, L. Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO₂ particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO₂ toxicity. Nanotoxicol., v. 3, 91-97, 2009.

HAO, L.H.; WANG, Z.Y.; XING, B.S. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). J. Environ. Sci., v. 21, 1459-1466, 2009.

JOVANOVIC, B.; ANASTASOVA, L.; ROWE, E.W.; ZHANG, Y.; CLAPP, A.R.; PALIC, D. Effects of nano sized titanium dioxide on innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas*, Rafinesque, 1820). Ecotox. Envir. Safety, v. 74, 675-683, 2011.

KARLSSON, H. L. The comet assay in nanotoxicology research. Anal Bioanal Chem., v. 398, 651-666, 2010.

LI, J.; LOCK, R.A.C.; KLAREN, P.H.M.; SWARTS, H.G.P.; SCHUURMANS STEKHOVEN, F.M.A.H.; WENDELAAR BONGA, S.E. Kinetics of copper inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase. Toxicol. Lett., v. 87, 31-38, 1996.

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

MALATO, S.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P.; MALDONADO, M.I.; BLANCO, J.; GERNJAK, W. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. Catalysis Today, v. 147, 1-59, 2009.

MCKNIGHT, I.M. A hematological study on mountain whitefish *Prosopium williamsoni*. J. Fish. Res., v. 23, 45-64, 1966.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Roundup (R) causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, v. 78, 294-299, 2010.

MURTY, A.S. Toxicology of pesticide to fish. Boca Raton: CRC Press, 1988. 129 p.

O'HALLORAN, K.; AHOKAS, J.T.; WRIGHT, P.F.A. The adverse effects of aquatic contaminants on fish immune responses. *Austr. J. Ecotox.*, v. 4, 9-28, 1998.

ORTEGA, V.A.; KATZENBACK, B.A.; STAFFORD, J.L.; BELOSEVIC, M.; GOSS, G.G. Effects of polymer-coated metal oxide nanoparticles on goldfish (*Carassius auratus L.*) neutrophil viability and function. *Nanotoxicol.*, *in press*, 2013.

PAULINO, M.G.; SAKURAGUI, M.M.; FERNANDES, M.N. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a Neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, v. 86, 1-7, 2012.

RAILO, E.; NIKINMAA, M.; SOIVO, A. Effects of sampling on blood parameters in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, v. 26, 725-732, 1985.

REEVES, J.F.; DAVIES, S.J.; DODD, N.J.F.; JHA, A.N. Hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) are associated with titanium dioxide (TiO_2) nanoparticle induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat. Res.*, v. 640, 113-122, 2008.

RICHETTI, S.K.; ROSEMBERG, D.B.; VENTURA-LIMA, J.; MONSERRAT, J.M.; BOGO, M.R.; BONAN, C.D. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicol.*, v. 32, 116-122, 2011.

SHI, H.; MAGAYE, R.; CASTRANOVA, V.; ZHAO, J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.*, v. 10:15, 2013.

SIMONATO, J.D.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. Physiological effects of gasoline on the freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotrop. Ichthyol.*, v. 11, 683-691, 2013.

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

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience J.*, v. 19, 103-110, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: Villimpress, 2004. 144p.

UEDA, T.; HAYASHI, M.; OHTSUKA, Y.; NAKAMURA, T.; KOBAYASHI, J.; SOFUNI, T. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Sci. Technol.*, v. 25, 235-240, 1992.

VIGNARDI, C.P.; HASUE, F.M.; SARTÓRIO, P.V.; CARDOSO, C.M.; MACHADO, A.S.D.; PASSOS, M.J.A.C.R.; SANTOS, T.C.A.; NUCCI, J.M.; HEWER, T.L.R.; WATANABE, L.; GOMES, V.; PHAN, N.V. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus*(Linnaeus, 1766). *Aquat. Toxicol.*, v. 158, 218-229, 2015.

WARHEIT, D.B.; HOKE, R.A.; FINLAY, C.; DONNER, E.M.; REED, K.L.; SAYES, C.M.; FINLAY, C. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol. Lett.*, v. 171, 99-110, 2007.

XIONG, D.W.; FANG, T.; YU, L.P.; SIMA, X.F.; ZHU, W.T. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci. Total Environ.*, v. 409, 1444-1452, 2011.

XU, J.; SHI, H.; RUTH, M.; YU, H.; LAZAR, L.; ZOU, B.; YANG, C.; WU, A.; ZHAO, J. Acute toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in mice. *Plos One*, v. 8(8), e70618, 2013.

ZHU, X.; ZHU, L.; DUAN, Z.; QI, R.; LI, Y.; LANG, Y. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *J. Environ. Sci. Health A Toxicol. Hazard Subst. Environ. Eng.*, v. 43, 278-284, 2008.

CAPÍTULO 2

Respostas antioxidantes e alterações histopatológicas em brânquias e rins do peixe neotropical *Prochilodus lineatus* após exposição aguda e subcrônica a nanopartículas de dióxido de titânio

Resumo

O presente estudo investigou a toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂) em brânquias e rins do peixe neotropical de água doce, *Prochilodus lineatus*, com ênfase às respostas antioxidantes e danos oxidativos e morfológicos. *P. lineatus* foram expostos a 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ durante 48 h (exposição aguda) e 14 d (exposição subcrônica). Nas brânquias, a exposição aguda a NP-TiO₂ resultou em diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumento nos níveis de glutathiona (GSH), enquanto a exposição subcrônica resultou em aumento das ERO na maior concentração de exposição e dos níveis de GSH e diminuiu a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos animais expostos a 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂. Nos rins, a exposição aguda à NP-TiO₂ não resultou na formação de ERO ou alteração da atividade das enzimas antioxidantes, mas ocorreu um aumento nos níveis de GSH e do nível de lipoperoxidação (LPO) em animais expostos a 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂. Após exposição subcrônica ocorreu inibição da catalase em todos os grupos expostos e aumento nos níveis de LPO nos animais expostos a 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂. Nas brânquias, as principais alterações histopatológicas foram hipertrofia, hiperplasia, deslocamento do epitélio lamelar além de dilatação e congestão de vasos sanguíneos. No tecido renal, mudanças degenerativas e necroses podem refletir o efeito da lipoperoxidação no rim. Esses dados sugerem que a GSH possui um importante papel na prevenção do estresse oxidativo em brânquias de *P. lineatus*, uma vez que não ocorreu peroxidação lipídica. No entanto, o sistema de defesa antioxidante não foi capaz de prevenir o dano oxidativo nos rins após exposição aguda a 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂, ocorrendo a lipoperoxidação. Após exposição subcrônica, o balanço oxidativo foi reestabelecido no rim embora tenha ocorrido inibição da catalase em todos os tratamentos. As alterações histopatológicas branquiais após exposição subcrônica podem influenciar na troca de gases e no equilíbrio osmótico e iônico e nos rins, sendo que os danos podem levar à perda da função do órgão em longo prazo.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio. Glutathiona. Epitélio branquial. Túbulos renais.

1 Introdução

Vários campos da nanotecnologia têm crescido muito nos últimos anos com a utilização de técnicas para o desenvolvimento de estruturas nanoparticuladas, com 1 a 100 nm, através da regulação de propriedades termodinâmicas como precipitação e cristalização (SUTARIYA et al., 2015). As características específicas das nanopartículas (NP), como pequeno tamanho, forma, carga de superfície, estado de agregação e aglomeração, conferem ao mesmo tempo grande potencial para aplicações industriais e elevado potencial toxicológico devido à interação com sistemas biológicos (FADEEL et al., 2012). NP provenientes do processo de manufatura uso e descarte de NP serão liberados em ecossistemas aquáticos e poderão interagir com os organismos lá presentes (BARBER et al., 2009). As NP-TiO₂, por exemplo, tendem a se agregar no ambiente aquático e podem interagir com a matéria orgânica em suspensão e serem absorvidas por organismos aquáticos (CLEMENTE et al., 2012). Devido ao seu pequeno tamanho, as NP-TiO₂ podem passar livremente através de células epiteliais do tecido branquial de peixes durante o ciclo respiratório e daí para o sangue, e serem difundidas por todo o organismo (OBERDÖRSTER et al., 2005; BARBER et al., 2009).

As brânquias e os rins são considerados órgãos alvos para a contaminação por xenobióticos em peixes. As brânquias são vias de entrada de xenobióticos por apresentarem um contato direto com o meio externo e uma grande superfície de contato constituída por filamentos e lamelas vascularizados e revestidos por uma fina camada de tecido epitelial que tem curta distância de difusão água-sangue favorecendo as trocas gasosas (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; EVANS et al., 2005). Além da função respiratória, as brânquias apresentam um importante papel na regulação iônica, no equilíbrio ácido base e na excreção de produtos nitrogenados. Os xenobióticos podem causar alterações morfológicas no tecido branquial e conseqüentemente nas funções das brânquias (FERNANDES et al., 2007). Os rins são expostos aos xenobióticos presentes no sangue que eles continuamente filtram e são responsáveis pela excreção de metabólitos de vários xenobióticos a que os peixes são frequentemente expostos (HINTON et al., 1992).

A interação com NP-TiO₂ pode gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) que causam danos às membranas lipídicas de células e organelas celulares e conseqüentemente disfunção celular (HAO et al., 2009). A formação de ERO são conseqüências do metabolismo aeróbico, mas sua produção pode ser aumentada na presença de xenobióticos. Os animais possuem um mecanismo de defesa antioxidante responsáveis por manter o balanço redox celular. As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e

glutathione S transferase (GST) são as principais defesas enzimáticas do organismo contra as ERO e o composto proteico glutathione (GSH) também é uma das mais importantes defesas antioxidantes não enzimáticas. Com uma produção aumentada de ERO, ocasionada por xenobióticos na água, o sistema de defesa antioxidante pode ser ineficiente em neutralizá-las, o que resulta em estresse oxidativo ou desequilíbrio entre os compostos pró-oxidantes e antioxidantes com consequentes danos oxidativos no organismo (DI GIULIO e MEYER, 2008). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a toxicidade das NP-TiO₂ em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus* via análises bioquímicas e morfológicas. As seguintes hipóteses foram testadas: 1) NP-TiO₂ podem induzir o aumento da produção de ERO; 2) o organismo aumenta sua capacidade de resposta antioxidante que pode ou não ser suficiente para prevenir dano nos tecidos; 3) exposição a NP-TiO₂ causam alterações histopatológicas em brânquias e rins.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais

Jovens de *P. lineatus* (massa corpórea: $31,06 \pm 0,39$ g, comprimento total: $14,38 \pm 0,06$ cm) obtidos da Estação de Aquicultura da Usina Hidroelétrica de Furnas, São José da Barra, MG, Brasil, foram aclimatados durante dois meses em tanques de 1000 L com água corrente, sem cloro e aeração constante. Os animais foram alimentados “*ad libitum*” com ração comercial para peixes (FRI-ACQUA 40, Fri-Ribe Rações, 40 % de proteína). As variáveis físicas e químicas da água (temperatura: 22,49-26,34 °C, oxigênio dissolvido: 6,19-7,82 mg L⁻¹, pH: 6,31-7,73, condutividade: 40-58 µS cm⁻³, alcalinidade: 35-43 mg L⁻¹ como CaCO₃ e dureza total: 39-50 mg L⁻¹ como CaCO₃) foram monitoradas e se mantiveram constantes durante o período de aclimação e dos ensaios de toxicidade.

2.2 Exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂

Posteriormente, *P. lineatus* foram expostos a 0 (grupo controle), 0,5; 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ (Concentração nominal: 0, 1, 5, 10 e 50 mg L⁻¹ de NP-TiO₂) durante 48 h (exposição aguda) e 14 dias (exposição subcrônica). Essas foram as concentrações a que algumas espécies mostraram sensibilidade em outros trabalhos (FEDERICI et al., 2007; HALL et al., 2009; HAO et al., 2009; XIONG et al., 2011) uma vez que a CL50 das NP-TiO₂ em *P. lineatus* foi maior que 100 mg L⁻¹. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em cinco aquários, em duplicata (n=10 peixes/tanque 200 L) em sistema semi-estático com renovação de 80% da água com NP-TiO₂ a cada 24h. Durante a exposição subcrônica os animais foram alimentados a cada três dias imediatamente antes da renovação da água dos aquários.

Após o período de exposição aguda e subcrônica às NP-TiO₂, os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹) e sacrificados via secção medular. Amostras de brânquias e rins foram armazenadas a -80°C para análises bioquímicas ou fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,3 para posterior análise histopatológica. Um total de 12 animais por grupo de exposição foi utilizado para as análises bioquímicas. Para as análises histopatológicas e quantificação da concentração de titânio em brânquias e rins foram utilizados 8 animais por grupo de exposição. A realização dos experimentos foi aprovada pelo Comitê de Ético Animal (Protocolo nº 027/2011) e Comitê de Ética Ambiental (Protocolo nº 002/2011) da UFSCAR.

2.3 Concentração do titânio em brânquias e rins

Amostras de brânquias e rins foram secas a 60 °C até peso constante e então foram digeridas a 60°C durante 48h em ácido nítrico (HNO₃) concentrado (Ultrapur- Merck, 69%) na proporção 1:5 (mg de tecido: µL HNO₃) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na proporção 1:8 (H₂O₂: HNO₃). Após a digestão as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 g e o sobrenadante foi usado para análise. A concentração de titânio nas amostras foi lida em espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite acoplado (AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA) no Laboratório de Ecofisiologia Animal da Universidade Estadual de Londrina.

2.4 Análises bioquímicas em brânquias e rins

As análises bioquímicas foram feitas utilizando leitora de microplaca (SpectraMax[®] M5 Multi-Mode, Molecular Devices, USA) e a determinação da concentração de proteína tecidual (mg mL⁻¹) para a expressão da atividade das enzimas foi determinada utilizando kit comercial Micropote Pirogalol da Doles[®] (Doles Reagentes, Goiânia, Brasil).

As ERO (diclorofluoresceína mg proteína⁻¹) foram determinadas quantificando a conversão do reagente 2, 7- diacetato de diclorofluoresceína para 2,7-diclorofluoresceína fluorescente, com excitação/emissão a 370/445 nm (VIARENGO et al., 1999) no mesmo dia da coleta. A atividade da SOD (U SOD min⁻¹ mg proteína⁻¹) foi determinada a $\lambda = 550$ nm pela inibição da taxa de redução do citocromo C pelo radical superóxido (MCCORD e FRIDOVICH, 1969), a da CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ metabolizado min⁻¹ mg proteína⁻¹) foi mensurada pelo decaimento da concentração de H₂O₂ a $\lambda = 240$ nm (BEUTLER, 1975), a da GPx (nmol NADPH min⁻¹ mg proteína⁻¹) foi determinada pela oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) em presença de t-butyl e leitura a $\lambda = 340$ nm (BEUTLER, 1984) e a da glutathione-S-transferase (GST; nmol CDNB min⁻¹ mg proteína⁻¹) foi mensurada utilizando como substrato o reagente 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e leitura a $\lambda = 340$ nm (HABIG et al., 1974). Os níveis de GSH (nmol GSH mg proteína⁻¹) foram medidos com base na reação do 2,3 naftalenedicarboxialdeído (NDA) com a GSH formando um composto fluorescente com excitação/emissão a 472/528 nm (WHITE et al., 2003) e os níveis de peroxidação lipídica (LPO; μM hidroperóxido de cumeno (CHP) mg proteína⁻¹) foram determinados após a oxidação de Fe⁺² (Ferro reduzido) a Fe⁺³ (Ferro oxidado), na presença do reagente alaranjado xilenol (Ferrous Oxidation- Xylenol Orange- FOX) formando Fe⁺³-xilenol com absorvância em $\lambda = 560$ nm (JIANG et al., 1991).

2.5 Histopatologia em brânquias e rins

Amostras de brânquias e rins fixadas em glutaraldeído 2,5%, com tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,3 foram desidratadas em séries crescentes de etanol, incluídas em historesina (Historesin, LEICA, Alemanha) e secções histológicas (3 µm espessura) foram efetuadas em micrótomo (MICROM HM 360, MICROM International GmbH). As secções histológicas de brânquias foram coradas com azul de toluidina e as secções de rins foram coradas com azul de toluidina e fucsina básica para análise em microscópio de luz (BX 51, Olympus, Denmark). As alterações histopatológicas (em 8 filamentos branquiais aleatórios e em 20 campos aleatórios para o rim) foram quantificadas e os Índices de Alteração Histológica (IAH) foram calculados. O IAH foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $IAH = 10^0 \cdot \Sigma I + 10^1 \cdot \Sigma II + 10^2 \cdot \Sigma III$ onde, ΣI , ΣII e ΣIII referem-se ao somatório total de alterações para os estágios I, II e III, respectivamente (Estágio I: lesões não muito severas e que não afetam o funcionamento do órgão, reversíveis e pontuais; Estágio II: lesões moderadamente severas e que podem afetar o funcionamento do órgão, podem ser ou não irreversíveis, mas, geralmente são pontuais; e Estágio III: lesões muito severas e irreversíveis cujo funcionamento do órgão fica muito alterado) e os fatores potenciais (10^0 , 10^1 e 10^2) referem-se à severidade da lesão (POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

O índice obtido para cada peixe foi usado para calcular o índice médio para cada tratamento (controle e grupos expostos ao NP-TiO₂). O IAH foi classificado em quatro categorias (1-10= funcionamento normal do órgão; 11-20= danos leves a moderado; 21-50= alterações moderadas a severas no órgão; 51-100= alterações severas no órgão; e >100= danos irreparáveis no órgão), e a severidade dos danos no tecido branquial foi comparada entre os grupos.

2.6 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Após o teste de normalidade, homogeneidade de variância e linearidade, aplicou-se o teste paramétrico Análise de Variância (ANOVA) de uma via ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. No caso em que diferenças significativas foram detectadas no teste de ANOVA, o teste de Dunnett foi aplicado para verificar onde ocorreram as diferenças. Todos os testes foram efetuados com nível de significância de 0,05 usando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft, Estados Unidos).

3 Resultados

3.1 Concentração de titânio em brânquias e rins

A concentração de titânio nas amostras de brânquias e rins é apresentada na Tabela 1. A concentração de titânio aumentou significativamente ($p < 0,05$) em brânquias de animais expostos a 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ por 14 dias e aumentou significativamente ($p < 0,05$) em rins de animais expostos a 1,5 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ por 14 dias.

Tabela 1 - Concentração de titânio no tecido de *Prochilodus lineatus* exposto a NP-TiO₂ por 14 dias

Tratamento	Tecido	
	Brânquia	Rim
Controle	0,32 ± 0,04	0,64 ± 0,12
0,5 mg L ⁻¹ de NP-TiO ₂	0,65 ± 0,10	0,85 ± 0,13
1,5 mg L ⁻¹ de NP-TiO ₂	1,63 ± 0,30	1,81 ± 0,27 *
3,0 mg L ⁻¹ de NP-TiO ₂	3,45 ± 0,17 *	1,46 ± 0,28
15,0 mg L ⁻¹ de NP-TiO ₂	6,69 ± 0,84 *	2,23 ± 0,27 *

Dados são média ± EPM expressados como µg Ti g⁻¹ de tecido seco.* representam diferença significativa entre cada tratamento e seu respectivo grupo controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂). Brânquia (Kruskall-Wallis, $p < 0,05$) e Rim (Anova, $p < 0,05$).

3.2 Respostas bioquímicas

As respostas antioxidantes em brânquias de *P. lineatus* avaliadas após exposição aguda (48 h) e exposição subcrônica (14 d) a NP-TiO₂ são apresentadas na Fig. 1. Após exposição aguda a produção de ERO diminuiu significativamente ($p < 0,05$) nos animais expostos a 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ quando comparados ao grupo controle. A atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST não foram alteradas ($p > 0,05$); porém, a concentração de GSH aumentou significativamente nos animais expostos a 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ em relação ao grupo controle. Os níveis de lipoperoxidação nas brânquias não foram alterados após exposição aguda a NP-TiO₂. Após exposição subcrônica (14 d), a produção de ERO aumentou (56,52%; $p < 0,05$) e a atividade da SOD diminuiu (26,16%; $p < 0,05$) nas brânquias de *P. lineatus* expostos a 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ quando comparadas ao grupo controle e a concentração da GSH aumentou em animais expostos a 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂. A concentração de LPO não aumentou nos animais expostos a NP-TiO₂ ($p > 0,05$) indicando que a exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂ não resultaram em dano oxidativo nas brânquias apesar do aumento de ERO em exposição subcrônica a 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂.

Nos rins, as respostas antioxidantes de *P. lineatus* após exposição aguda (48 h) e exposição subcrônica (14 d) a NP-TiO₂ são mostradas na Fig. 2. Nesse órgão não foi observada a formação de ERO ($p > 0,05$) e a atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e GST não alteraram após exposição aguda a NP-TiO₂ ($p > 0,05$). No entanto, os níveis de GSH aumentaram significativamente ($p > 0,05$) evidenciando dose-dependência e a concentração de LPO aumentou nos animais expostos a 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ em 48h. Após exposição subcrônica a NP-TiO₂ não ocorreu formação de ROS, exceto para o tratamento de 1,5 mg L⁻¹ de NP-TiO₂, e a atividade das enzimas SOD, GPx, GST, GSH e os níveis de LPO não alteraram ($p > 0,05$) em rins de *P. lineatus*. No entanto, a CAT foi inibida significativamente em todos os tratamentos de NP-TiO₂.

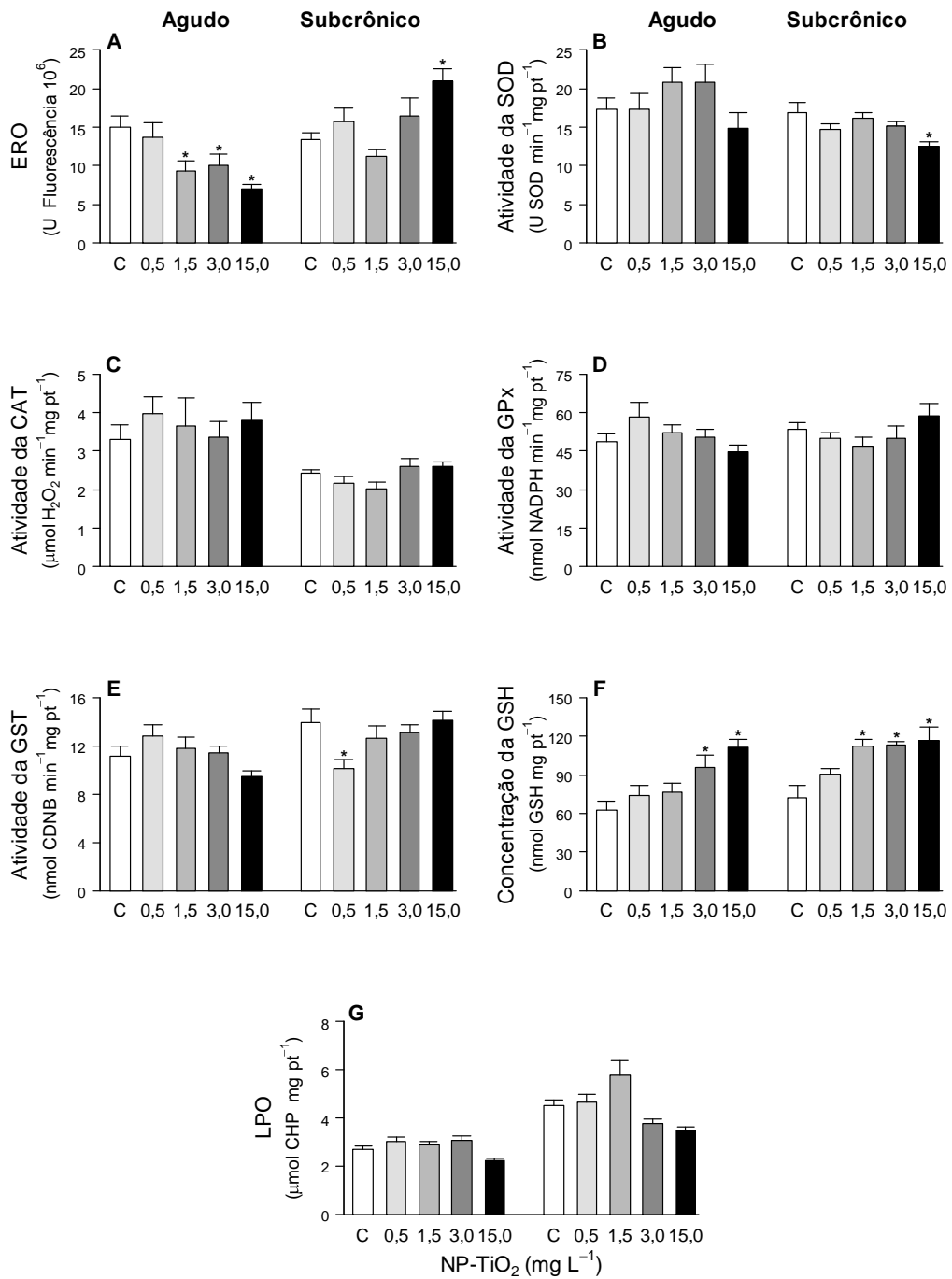


Fig. 1 - Espécies reativas de oxigênio, (ERO) (A); atividade da superóxido dismutase (SOD) (B), catalase (CAT) (C), glutaciona peroxidase (GPx) (D) e glutaciona S-transferase (GST) (E); conteúdo de glutaciona (GSH) (F) e níveis de peroxidação lipídica e (LPO) (G) no tecido branquial *Prochilodus lineatus* após exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO₂. C= controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂), U = unidade, pt= proteína. Dados são media ± E.P.M. * Indicam diferenças significantes do respectivo grupo controle (agudo ou subcrônico) (ANOVA, p <0.05); Kruskal-Wallis foi aplicado para GSH e LPO na exposição subcrônica (p <0.05).

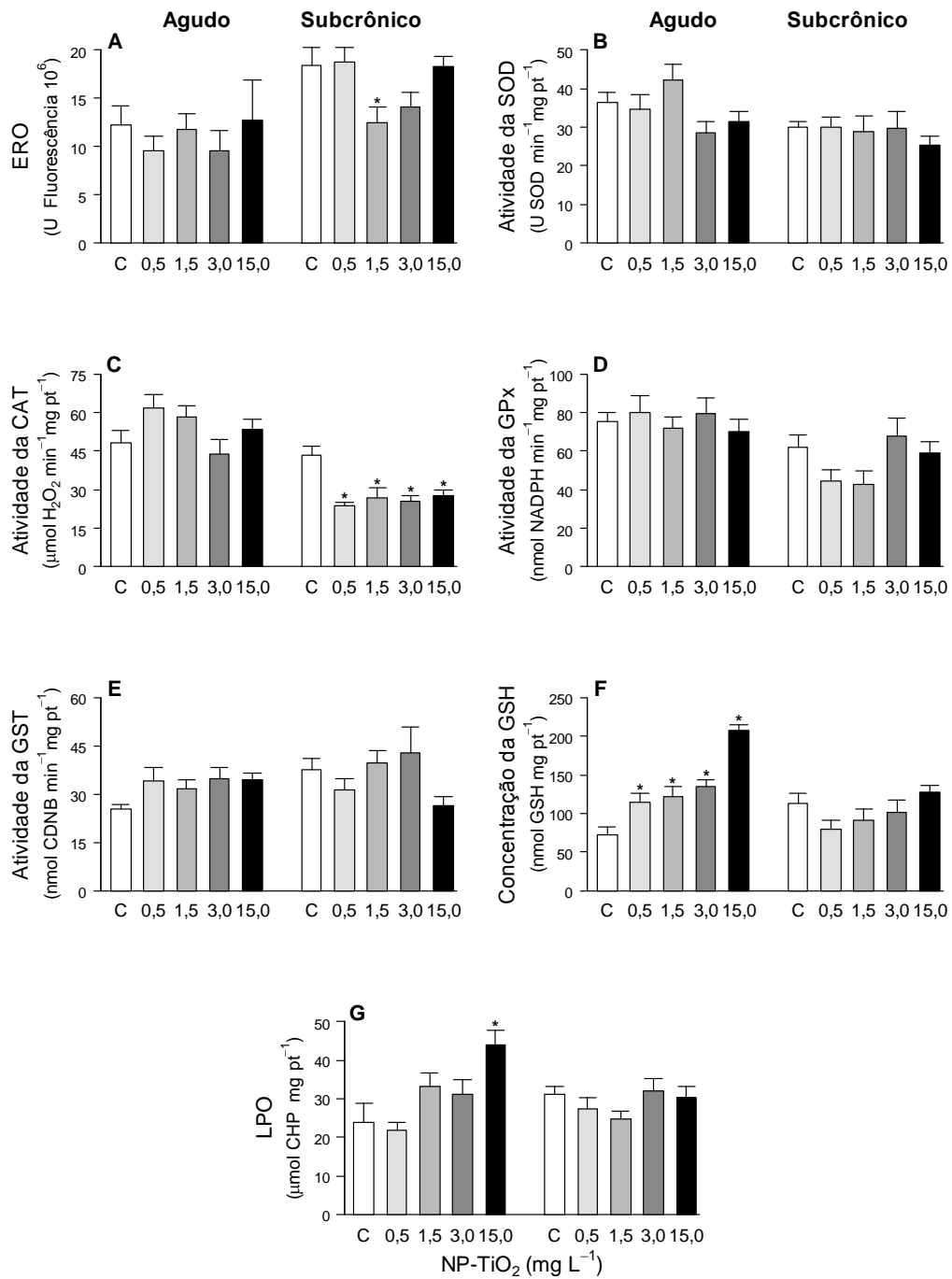


Fig. 2 - Espécies reativas de oxigênio, (ERO) (A); atividade da superóxido dismutase (SOD) (B), catalase (CAT) (C), glutaciona peroxidase (GPx) (D) e glutaciona S-transferase (GST) (E); conteúdo de glutaciona (GSH) (F) e níveis de peroxidação lipídica e (LPO) (G) no tecido renal de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO₂. C= controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂), U = unidade, pt= proteína. Dados são media ± E.P.M. * Indicam diferenças significantes do respectivo grupo controle (agudo ou subcrônico) (ANOVA, p < 0.05).

3.3 Histopatologia em brânquias

A Fig. 3 mostra a morfologia das brânquias do grupo controle (Fig 3A) e as histopatologias mais frequentes nas brânquias de *P. lineatus* expostos a NP-TiO₂ (Fig. 3B a 3D). Avaliação semiquantitativa das alterações histopatológicas é mostrada na Tabela 2. As alterações histopatológicas após exposição aguda foi baixa e as alterações mais frequentes foram hipertrofia do epitélio da lamela, hipertrofia das células ricas em mitocôndrias (CRM) e dilatação do canal marginal. Após exposição subcrônica, as alterações histopatológicas foram mais acentuadas sendo muito frequente a ocorrência de hipertrofia e hiperplasia do epitélio da lamela, hipertrofia e proliferação de CRM, dilatação do canal marginal, congestão do sistema de células pilares e deslocamento do epitélio lamelar. A maioria das alterações foi classificada como estágio I. Raramente se encontrou alterações de estágio II, entretanto aneurisma lamelar total foi pouco frequente nos animais expostos a 3,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ (exposição subcrônica).

O IAH calculado para as brânquias de *P. lineatus* foi menor que 10 para o grupo controle e não alterou significativamente nos grupos expostos as NP-TiO₂ após exposição aguda (Fig. 4). No entanto, após 14 dias de exposição a NP-TiO₂, os valores do IAH aumentaram significativamente nos animais expostos a 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ em relação ao grupo controle, indicando que a exposição às NP causaram danos leves a moderados no órgão.

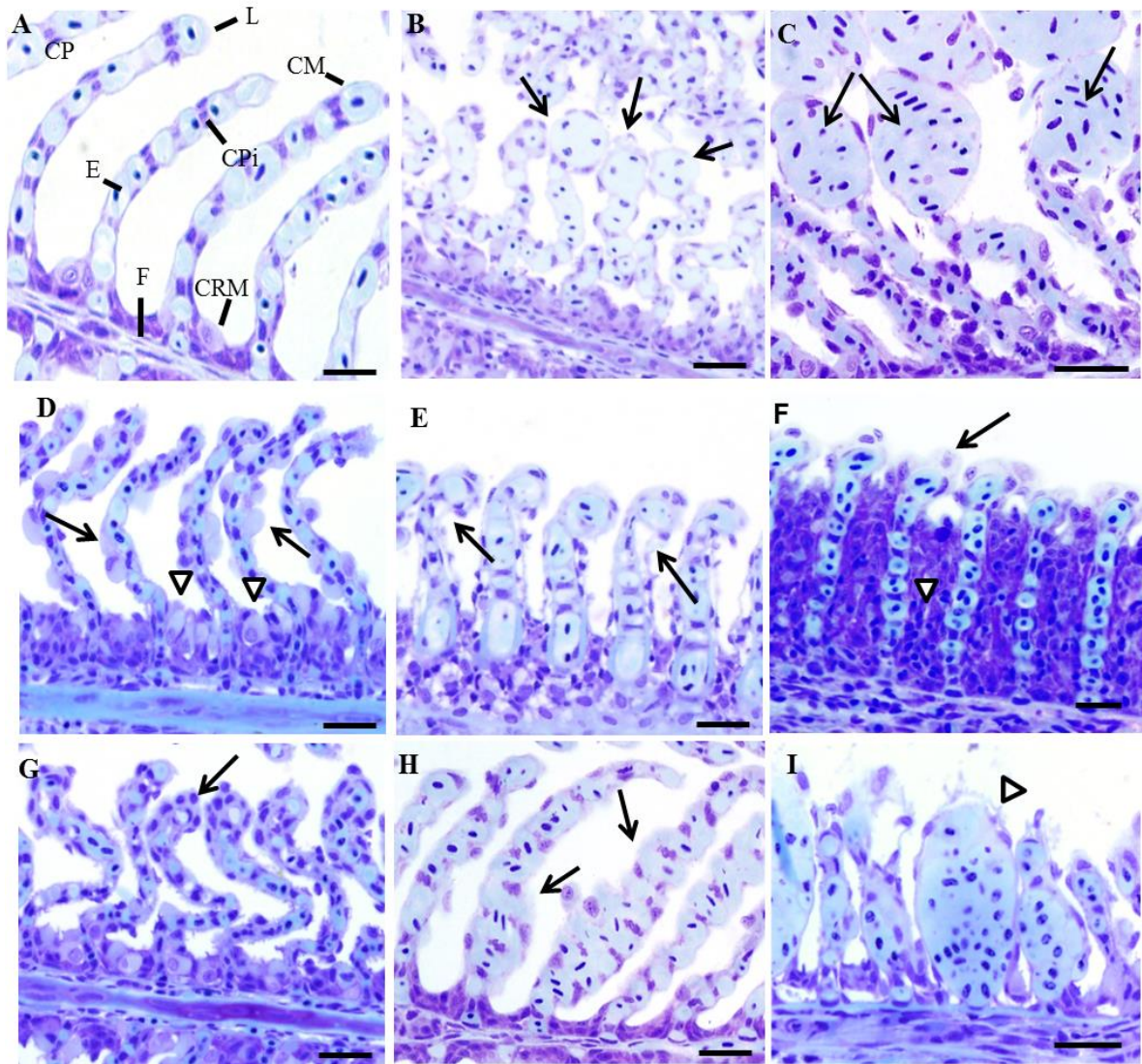


Fig. 3 - Brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de NP-TiO₂. (A) Grupo controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂), morfologia branquial, aspecto normal das brânquias; B-I. Alterações histopatológicas em brânquias, (B) Congestão no canal marginal (seta); (C) Aneurismas apicais (seta); (D) Proliferação e hipertrofia de células ricas em mitocôndrias (seta); (E) Deslocamento epitelial (seta); (F) Hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar (seta), Hiperplasia do epitélio do filamento (ponta de seta); (G) Hipertrofia do epitélio lamelar (seta); (H) Dilatação do sistema de células pilares (seta); (I) aneurisma (ponta de seta). Abreviações: CM = canal marginal; CP = células pavimentosas; CPi = células pilares; E = eritrócito; CRM = células ricas em mitocôndrias; L= lamela e F= filamento. Coloração: azul de toluidina. Barra de escala: 20 μm.

Tabela 2 - Alterações histopatológicas em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos NP-TiO₂

Alteração	E	C	NP-TiO ₂ (mg L ⁻¹)			
			0,5	1,5	3,0	15,0
Exposição Aguda (48 horas)						
Hipertrofia do epitélio da lamela	I	+	+	++	++	++
Hiperplasia do epitélio do filamento	I	0+	0+	+	+	0+
Hiperplasia do epitélio da lamela	I	0	0+	0+	+	+
Hipertrofia das CRM	I	0+	+	++	++	+
Proliferação das CRM	I	+	+	+	+	+
Dilatação do canal marginal	I	+	+	+	+	++
Congestão do sistema de células pilares	I	0+	0+	0+	0+	0+
Deslocamento do epitélio lamelar	I	0+	0+	0+	0+	0+
Deslocamento do epitélio do filamento	I	0	0	0	0+	0+
Aneurisma lamelar apical	II	0+	0+	0+	0+	0+
Ruptura e descamação do epitélio do filamento	II	0	0	0	0	0+
Ruptura do epitélio da lamela	II	0	0	0	0+	0
Exposição Subcrônica (14 dias)						
Hipertrofia do epitélio da lamela	I	+	+	++	++	++
Hiperplasia do epitélio do filamento	I	0+	+	0+	0+	0+
Hiperplasia do epitélio da lamela	I	0+	0+	+	++	+
Hipertrofia das CRM	I	0+	+	+++	+++	+++
Proliferação das CRM	I	0+	+	++	+++	++
Proliferação das células-mucosas	I	0	0	0	0	0+
Dilatação do canal marginal	I	+	+	+	++	++
Congestão do sistema de células pilares	I	+	+	++	++	+++
Deslocamento do epitélio lamelar	I	0+	+	+	++	++
Fusão incompleta das lamelas	I	0	0	0	0	0+
Aneurisma lamelar apical	II	0+	0+	0+	0	0+
Aneurisma lamelar total	II	0	0+	0+	+	0+
Ruptura do epitélio da lamela	II	0	0	0	0+	0

E= estágio, C=controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂), CRM= células ricas em mitocôndrias. 0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente. Classificação histopatológica de acordo com Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994).

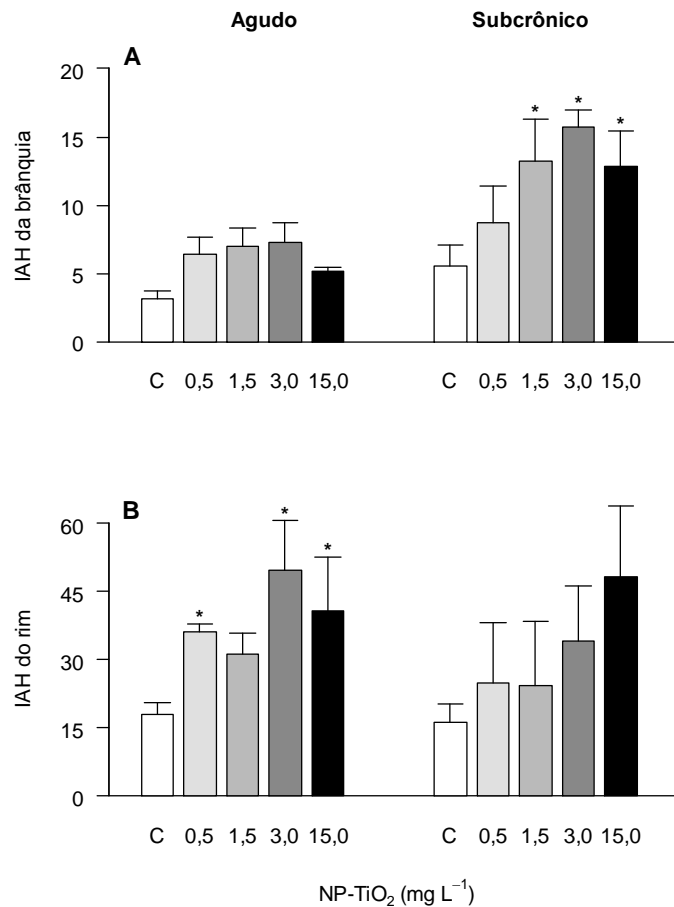


Fig. 4 - Índice de alteração histopatológica em brânquias (A) (ANOVA) e rins (B) (Kruskal-Wallis) de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO₂. C= controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂). * Indicam diferença significativa entre cada tratamento e seu controle, p<0,05.

3.4 Histopatologia em rins

A Fig. 5 mostra a morfologia dos rins do grupo controle (Fig 5A) e as histopatologias renais mais frequentes encontradas em *P. lineatus* expostos a NP-TiO₂ (Fig. 5B a 5D). Semiquantitativa avaliação das alterações histopatológicas é mostrada na Tabela 3.

A exposição aguda a NP-TiO₂ causou poucos tipos de alterações no tecido renal, porém mais severas. Patologias classificadas como estágio I, como hipertrofia celular e presença de melanomacrófagos ocorreram em peixes expostos a 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂, e hipertrofia nuclear nos peixes expostos a 3,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂. Histopatologias moderadas (estágio II) como degeneração granular tubular ocorreram em todos os tratamentos com NP-TiO₂ sendo acompanhada por desarranjo tubular para os peixes expostos a 0,5 mg L⁻¹ NP-TiO₂ e necrose (estágio III) foi encontrada em alguns animais expostos a 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂. Após exposição subcrônica a NP-TiO₂ a frequência de patologias foi baixa, mas

classificada em todos os estágios. Patologias (estágio II) como degenerações nucleares ocorreram em peixes expostos a $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ NP-TiO₂ e degeneração granular tubular em animais expostos a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ NP-TiO₂. Necrose (estágio III) também foi encontrada nos animais expostos a $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ NP-TiO₂.

O IAH calculado para os rins de *P. lineatus* analisados após exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂ estiveram entre 21 e 50 para todos os tratamentos (Fig. 4), o que indica alterações moderadas a severas no órgão. Estatisticamente, os animais do grupo controle (IAH= $18 \pm 2,51$) diferiram dos animais expostos a $0,5$; $3,0$ e $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ NP-TiO₂ após exposição aguda. Porém, não se observou diferença significativa do IAH dos animais expostos a NP-TiO₂ quando comparados ao grupo controle (IAH= $16,37 \pm 3,77$) após exposição subcrônica.

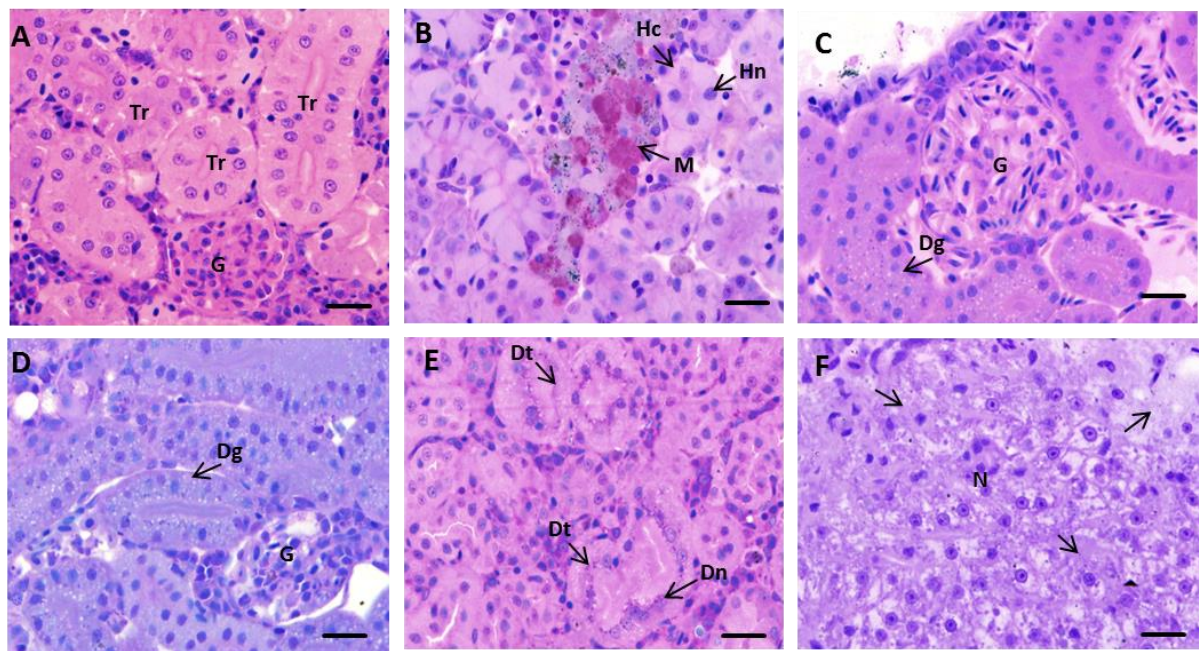


Fig. 5 - Rins de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de NP-TiO₂. (A) Grupo controle ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO₂), aspecto normal da morfologia dos rins; (B-F) Alterações histopatológicas em rins de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de NP-TiO₂. Abreviações: Dg=degeneração granular; Dn= degeneração nuclear; Dt= degeneração tubular; G= glomérulo; Hc= hipertrofia celular; Hn= hipertrofia nuclear; M= melanomacrófagos; N=necrose; Tr= túbulos renais. Barra de escala= $20 \mu\text{m}$.

Tabela 3 - Alterações histopatológicas em rins de *Prochilodus lineatus* expostos NP-TiO₂

Alteração	E	C	NP-TiO ₂ (mg L ⁻¹)			
			0,5	1,5	3,0	15,0
Exposição Aguda (48 horas)						
Hipertrofia celular	I	0+	0+	+	+	+
Hipertrofia nuclear	I	0+	0+	0+	+	0+
Vacuolização citoplasmática	I	0	0	0+	0	0
Dilatação da luz tubular	I	0+	0+	0+	0	0+
Aumento do volume glomerular	I	0+	0+	0+	0+	0+
Dilatação dos capilares do glomérulo	I	0+	0+	0+	0+	0+
Presença de melanomacrófagos	I	0+	0+	+	+	+
Oclusão da luz tubular	II	+	++	+	+	0+
Degeneração nuclear	II	+	+	+	+	0+
Degeneração granular tubular	II	0+	+	+	+	+
Degeneração ou desarranjo tubular	II	0+	+	0+	0+	0+
Degeneração hialina	II	0+	0	0	0	0
Novos néfrons	II	0+	0+	0+	0+	0+
Degeneração ou desarranjo glomerular	II	0+	0+	0+	0+	0+
Necrose	III	0	0	0	0+	+
Exposição Subcrônica (14 dias)						
Hipertrofia celular	I	+	+	+	+	+
Hipertrofia nuclear	I	+	+	+	+	+
Vacuolização citoplasmática	I	0+	0+	0+	0	0
Aumento do volume glomerular	I	0+	0+	0	0	0
Dilatação dos capilares do glomérulo	I	0+	0+	0+	0+	0+
Presença de melanomacrófagos	I	++	++	+	++	++
Oclusão da luz tubular	II	0+	0+	0+	0+	0+
Degeneração nuclear	II	0+	0+	0+	0+	+
Degeneração granular tubular	II	0+	0+	0+	+	0+
Degeneração ou desarranjo tubular	II	0+	0+	0+	0+	0+
Novos néfrons	II	0+	0+	0+	0+	0+
Necrose	III	0	0+	0+	0+	+

E= estágio, C=controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂). 0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente. Classificação histopatológica de acordo com Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994.

4. Discussão

4.1 Resposta antioxidante

NP-TiO₂ são conhecidas por gerar ERO, na presença de luz ultravioleta (propriedade fotocatalítica), reagindo com substratos como as próprias moléculas da água ou compostos como H₂O₂ e compostos orgânicos clorinados (ZIOILLI e JARDIM, 1998; HIRANO et al., 2005). Ao reagir com moléculas de água, as NP podem formar ERO, como o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), que é considerado uma das ERO mais reativas (KNIGHT, 1995; HERMES-LIMA, 2004). XIONG et al. (2011), por exemplo, observaram a formação de $\cdot\text{OH}$ em suspensões de 50,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ (1,77 mmol L⁻¹) e que $\cdot\text{OH}$ em contato direto com o epitélio branquial dos peixes causa graves danos celulares. Reeves et al. (2008) demonstraram a presença predominantemente de $\cdot\text{OH}$ em soluções aquosas geradas por NP-TiO₂ e, *in vitro*, nas células de peixes, sendo potencialmente genotóxicas. Por outro lado, Clemente et al. (2013) demonstraram, *in vivo*, no peixe de água doce, *P. mesopotamicus* que a exposição a NP-TiO₂ na presença de luz ultravioleta (UV, fotoperíodo de 12/12 h luz/escuro) aumentou a genotoxicidade nos eritrócitos desses animais. No entanto, os peixes possuem um sistema antioxidante bem desenvolvido e eficiente, semelhante ao de mamíferos, que atua sequestrando as ERO e contrabalança a ação desses radicais controlando os danos celulares (PANDEY et al., 2003). Este sistema de defesa antioxidante age individualmente ou de forma conjunta para eliminar ERO e prevenir eventuais danos celulares, mantendo assim o equilíbrio redox.

Em brânquias, a ausência de respostas das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx sugere que O₂[•] pode não ter sido produzido em nível suficiente para induzir o aumento da atividade dessas enzimas após exposição aguda (KONO e FRIDOVICH, 1982; DORVAL e HONTELA 2003). A inibição da SOD nas brânquias após a exposição a 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ após exposição crônica, não resultou em alterações na atividade da CAT e GPx em *P. lineatus*. Entretanto, em *Cyprinus carpio*, a inibição da SOD foi observada em peixes expostos a concentrações maiores que 100 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ e foi acompanhado de uma redução da atividade da CAT e aumento de LPO (HAO et al., 2009). Em *P. Lineatus*, neste presente estudo, o aumento da concentração de GSH para animais expostos a 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ pode ter contribuído para prevenir a lipoperoxidação.

A GSH, além de importante cofator para a GPx e GST, tem um papel de antioxidante não enzimático e pode reagir com várias espécies reativas e entre elas o radical $\cdot\text{OH}$ (DI GIULIO e MEYER, 2008). A GSH é uma molécula não proteica, hidrossolúvel, considerada como um tiol celular essencial para o organismo, participando nas reações de potencial redox

e formação de tioéter. O principal aminoácido constituinte da GSH é a cisteína, cujo grupo tiol é o local ativo de reações antioxidantes (SIES, 1999). Portanto, o aumento dos níveis de GSH em brânquias após exposição aguda pode ter sido uma resposta do organismo para controlar os níveis de ERO o que possivelmente explica a diminuição das ERO com o aumento da concentração de NP-TiO₂ e sugere que a GSH foi provavelmente o principal mecanismo de controle da concentração de ERO, uma vez que não ocorreu indução da atividade das enzimas antioxidantes. O aumento nos níveis de GSH em animais após exposição a compostos tóxicos indicam o seu envolvimento na remoção de produtos metabolizados ou de metais como forma de proteção do organismo contra a ocorrência de estresse oxidativo (REGOLI e PRINCIPATO, 1995; OTTO e MOON, 1995; ZHANG et al. 2004; FEDERICI et al. 2007). O estresse oxidativo ocorre quando há um distúrbio entre o balanço de pró-oxidantes e antioxidantes e as ERO podem reagir com componentes lipídicos das membranas celulares provocando a formação de lipoperóxido (DI GIULIO e MEYER, 2008). A GSH também foi o principal mecanismo para prevenir a ocorrência de danos oxidativos após exposição subcrônica. Apesar do aumento de formação de ERO nos animais expostos a 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂, o aumento da GSH provavelmente contribuiu para que não ocorressem danos oxidativos quando comparados ao grupo controle.

Nos rins, não se observou a formação de ERO após exposição aguda a NP-TiO₂ e os níveis de GSH aumentaram significativamente com dose-dependência para todas as concentrações, indicando novamente o importante papel da GSH no controle das ERO de forma independente (DI GIULIO e MEYER, 2008). Nesse caso, entretanto, o sistema de defesa antioxidante não foi capaz de evitar os danos oxidativos causados pela ERO e ocorreu peroxidação lipídica para os animais tratados a 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ em 48h. No entanto, após exposição subcrônica a NP-TiO₂ não ocorreu formação de ERO e alteração da SOD, GPx, GST, GSH e LPO em rins de *P. lineatus*. Apenas uma inibição significativa da catalase foi observada em todos os tratamentos de NP-TiO₂. Provavelmente essa inibição foi compensada pela reorganização de outros componentes do aparato antioxidante (HERMES-LIMA, 2004). Elevada produção de radicais superóxidos, carbonilação ou ligação de produtos da lipoperoxidação em proteínas podem ser algumas das possíveis causas da inibição da atividade da catalase (KONO e FRIDOVICH, 1982; STARKE et al., 1987; STADTMAN e OLIVER, 1991; STADTMAN e LEVINE, 2000).

O rim pode ter se mostrado mais suscetível ao estresse oxidativo por ser um órgão hematopoiético em peixes, embora em menor proporção comparado ao rim anterior, onde a divisão celular é mais ativa e apresenta muitas células em divisão mais vulneráveis a danos

por ERO (VELMA e TCHOUNWOU, 2010). O órgão está exposto às substâncias tóxicas carregadas no sangue que podem causar danos morfológicos no tecido e prejudicar suas funções. Assim como neste presente estudo, bioacumulação de titânio nos rins (agregados de nanopartículas no tecido hematopoiético circundando os túbulos renais e no interior de lisossomos) também foi observada em *Oncorhynchus mykiss* após administração intravenosa da nanopartícula, embora não tenha prejudicado a função excretória renal (SCOWN et al., 2009). Liang et al (2009) também descrevem o aumento da lipoperoxidação em tecido renal de ratos expostos a NP-TiO₂. Neste presente trabalho, o estresse oxidativo pode ter ocorrido pela ação direta das NP-TiO₂ com o tecido renal. Metais de transição são conhecidos por interagir com H₂O₂ gerando radicais ·OH ou outras espécies oxido-metálicas que podem causar lipoperoxidação (HERMES-LIMA, 2004).

Dessa forma, as NP-TiO₂ demonstraram não causar estresse oxidativo em brânquias, apesar do aumento de ERO após 14 dias de exposição e do acúmulo de NP. Por outro lado, evidenciou-se que essas NP podem causar estresse oxidativo em rins em um período curto de exposição (48 h), embora o balanço redox parecesse se reestabelecer após 14 dias, pois não se observou lipoperoxidação.

4.2 Histopatologia

O tecido branquial apresenta uma relativa fragilidade por seu contato direto com o meio externo e muitas vezes suas estruturas são capazes de compensar agressões físicas a que são invariavelmente expostos, sendo um tecido considerado um bom indicador de estresse (HARPER e WOLF, 2009). As brânquias dos peixes são órgãos multifuncionais apresentando uma estrutura altamente complexa, cuja principal função é a respiratória e apresenta importante papel na regulação iônica, no equilíbrio ácido-base e na excreção de produtos nitrogenados (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; EVANS et al., 2005).

A hipertrofia do epitélio da lamela observada após 48h de exposição a NP-TiO₂, que persistiu após exposição subcrônica, e também a hiperplasia e deslocamento epitelial, são alterações consideradas mecanismos de defesa para evitar que as NP-TiO₂ e as ERO formadas pela reação das NP com moléculas de água ou outros compostos presentes em meio aquoso sejam absorvidos e distribuídos pela circulação sanguínea. Essas alterações histopatológicas aumentam a distancia de difusão água-sangue e assim diminuem a entrada de xenobióticos (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002). Apesar de diminuírem a entrada de xenobióticos na circulação sanguínea, essas respostas consequentemente dificultam as trocas gasosas e podem induzir a vasodilatação dos vasos sanguíneos, como foi observado em *P. lineatus* neste

experimento em exposição aguda e subcrônica e para outras espécies expostas a NP-TiO₂ (FEDERICI et al., 2007; XIONG et al., 2011). A vasodilatação do canal marginal pode induzir mudança na estrutura das células pilares e conduzir à congestão vascular, muito frequente após exposição subcrônica dos animais neste estudo, resultando na formação de aneurismas lamelares em casos mais severos (GARCIA-SANTOS et al., 2006). Esses aneurismas apareceram ocasionalmente em animais expostos às concentrações de 3,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ por 14 dias. Aneurismas também foram relatados para outras espécies de peixes (FEDERICI et al., 2007; HAO et al., 2009) expostos a NP-TiO₂. As NP-TiO₂ não afetam o funcionamento das brânquias em curto prazo (48h), contudo podem alterar o fluxo sanguíneo em algumas regiões das brânquias prejudicando as trocas gasosas e distribuição de nutrientes nesse órgão após exposição subcrônica.

As respostas epiteliais ao meio contaminado por NP-TiO₂, para diminuir a entrada dessas nanopartículas no organismo, também podem dificultar as trocas iônicas nos animais expostos com conseqüente hipertrofia e proliferação de CRM para manter o equilíbrio osmótico do animal. As CRM das brânquias possuem função essencial na regulação iônica em peixes de água doce e são consideradas local primário de absorção ativa dos íons sódio, cloreto e cálcio (EVANS et al., 2005). A hipertrofia das CRM nos peixes após exposição subcrônica à NP-TiO₂ foi frequentemente acompanhada por proliferação das CRM mais acentuada do que após exposição aguda, o que sugere maior gasto metabólico do organismo para a manutenção da osmorregulação.

Apesar da exposição aguda à NP-TiO₂ não ter afetado a estrutura normal do órgão, as NP-TiO₂ causaram alterações histopatológicas leves a moderadas após a exposição subcrônica nos animais expostos a concentrações acima de 1,5 mg L⁻¹ NP-TiO₂. A ausência de danos mais severos após exposição subcrônica as NP-TiO₂ pode ser devido ao aumento da GSH que gerou um aumento das defesas antioxidantes evitando danos mais severos no tecido. Essa hipótese é corroborada pela ausência de danos lipídicos nesse tecido. As histopatologias encontradas são reversíveis e provavelmente seriam restauradas após ter cessado a exposição ao xenobiótico; entretanto, se não houver uma melhoria da qualidade da água, poderá ocorrer um aumento dessas alterações e comprometimento do funcionamento do órgão de acordo com Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994).

O rim é composto por duas estruturas distintas, uma anterior, ou cefálica e uma posterior, caudal ou tronco do rim. A região anterior representa a principal estrutura hematopoiética dos peixes teleósteos, sem função no sistema urinário (ROMBOUT et al., 2005). Apesar de apresentar capacidade hematopoiética, que é menor que no rim anterior, a

principal função do rim posterior é a filtração do sangue e formação de urina que ocorre no glomérulo, formado por uma rede de capilares envolta pela cápsula de Bowman e túbulos renais (túbulo contorcido proximal, intermediário, distal e ducto coletor) (EVANS, 1993; KLEINOW et al., 2008).

O rim posterior, juntamente com as brânquias e intestino, desempenham função essencial no balanço de água e íons, além de realizar a excreção de solutos endógenos e exógenos, como xenobióticos químicos (KLEINOW et al., 2008). A exposição à xenobióticos pode comprometer a funcionalidade do órgão e é conhecido o acúmulo de NP-TiO₂ no tecido renal de camundongos (WANG et al., 2007; LIU et al., 2009) e peixes (SCOWN et al., 2009). Wang et al. (2007) constataram que devido ao pequeno tamanho das NP-TiO₂ e difícil depuração, as NP-TiO₂ ficam retidas no tecido renal de camundongos causando acúmulo de líquido proteico no interior dos túbulos e glomérulo, prejudicando a função do órgão.

Os danos no tecido renal como hipertrofia celular e nuclear, presença de melanomacrófagos, degeneração granular tubular, desarranjo tubular e necrose causados pela exposição a NP-TiO₂ pode ter sido causado devido a maior dificuldade de filtração renal gerada pela retenção das NP no rim. As NP retidas no tecido renal podem gerar ERO que interagindo com as membranas celulares causam a sua peroxidação podendo levar a uma degeneração dos túbulos renais e necrose. O rim dos peixes deste estudo expostos a 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ apresentaram lipoperoxidação o que corrobora esta afirmação. Um estudo realizado com o cromo hexavalente (Cr VI) no peixe-japonês *Carassius auratus*, também evidencia o aumento da lipoperoxidação que é associado à desintegração dos túbulos renais e necrose (VELMA e TCHOUNWOU, 2010).

O aumento do número de melanomacrófagos no tecido renal de *P. lineatus* após exposição a NP-TiO₂ pode estar relacionado à remoção das NP, uma vez que os melanomacrófagos são responsáveis pela remoção de partículas estranhas ou produtos da degradação celular por fagocitose (WOLKE et al., 1985). O aumento do número de melanomacrófagos é comum frente à exposição a metais e já foi relatado em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, após exposição a NP de cobre e cádmio (HANDY, 2003; ALBAIRUTY et al., 2013). As alterações histopatológicas no tecido renal após exposição aguda indicam lesões moderadas a severas no órgão após exposição a 0,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂.

No presente estudo, mudanças regressivas como a degeneração de túbulos renais e necrose permaneceram após exposição subcrônica, o que pode indicar que as NP-TiO₂ são tóxicas para o tecido renal e podem prejudicar a função do órgão em longo prazo por não

conseguir restaurar as lesões sofridas. Além disso, também não ocorreu aumento significativo no processo regenerativo de formação de novos néfrons (dados não mostrados) após a exposição às NP-TiO₂ para compensar a perda de túbulos e glomérulos pela necrose de porções do órgão.

5 Conclusões

Os resultados sugerem que a GSH foi a principal molécula para o controle do balanço redox nas brânquias e rins durante a exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂. Nas brânquias, embora tenha ocorrido um aumento das ERO em altas concentrações de NP-TiO₂ após exposição subcrônica, a ação da GSH preveniu a peroxidação lipídica. Nos rins, as NP-TiO₂ causou estresse oxidativo após exposição aguda, mas o balanço oxidativo parece se restabelecer após 14 dias. A morfologia branquial reflete as respostas bioquímicas e as histopatologias que resultaram em danos leves e moderados nesse tecido, após exposição subcrônica, podem levar a uma dificuldade respiratória e desequilíbrio osmótico e iônico. A lipoperoxidação no rim resulta em mudanças degenerativas nos túbulos renais. Esses danos são reversíveis, mas podem implicar em alto custo metabólico para o animal e, em longo prazo, pode ocorrer comprometimento da saúde do animal, redução na taxa de crescimento e falha reprodutiva.

6 Agradecimentos

Este estudo foi realizado na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2011/10339-0) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia- Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq Proc. 573949/2008-5). Os autores são gratos à Estação de Aquicultura da Usina Hidroelétrica de Furnas, pelo fornecimento dos peixes e, aos doutores Cláudia Bueno dos Reis Martinez e Wagner Ezequiel Risso, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, pela ajuda na quantificação de titânio na água e tecidos estudados.

7 Referências

- AL-BAIRUTY, G.A.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D.; HENRY, T.B. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, v. 126, 104-115, 2013.
- BARBER, D.S.; DENSLOW, N.D.; JOSEPH GRIFFITT, R.; MARTYNIUK, C.J. Sources, fate and effects of engineered nanomaterials in the aquatic environment. In: SAHU, S.C.; CASCIANO, D.A. *Nanotoxicity, From In Vitro Models to Health Risks*. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. p. 227-245.
- BEUTLER, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. 3. ed. New York: Grune & Straton, 1984. 188 p.
- CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. *Ecotox. Environ. Safe.*, v. 52, 83-91, 2002.
- CLEMENTE, Z.; CASTRO, V.L.; JONSSON, C.M.; FRACETO, L.F. Ecotoxicology of Nano-TiO₂, an evaluation of its toxicity to organisms of aquatic ecosystems. *Int. J. Environ. Res.*, v. 6, 33-50, 2012.
- CLEMENTE, Z.; CASTRO, V.L.; FEITOSA, L.O.; LIMA, R.; JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.; FRACETO, L.F. Fish exposure to nano-TiO₂ under different experimental conditions: methodological aspects for nanoecotoxicology investigations. *Sci. Total Environ.*, v. 463-464, 647-656, 2013.
- DI GIULIO, R.T.; MEYER, J.N. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. *The toxicology of fishes*. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 273-324.
- DORVAL, J.; HONTELA, A. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 192, 191-200, 2003.
- EVANS, D.H. *The physiology of fish*. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1993. 592 p.
- EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.*, v. 85, 97-177, 2005.
- FADEEL, B.; PIETROIUSTI, A.; SHVEDOVA, A.A. *Adverse effects of engineered nanomaterials: exposure, toxicology, and impact on human health*. Waltham: Academic Press, 2012. 360 p.
- 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. *Aquat. Toxicol.*, v. 84, 415-430, 2007.
- FERNANDES, M.N.; MORON, S.E.; SAKURAGUI, M.M. Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. In: FERNANDES, M.N.; GLASS, M.L.;

RANTIN, F.T.; KAPOOR, B.G. Fish Respiration and Environment. Enfield: Science Publishers, 2007. p. 93-120.

GARCIA-SANTOS, S.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; WILSON, J.M. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: assessment of some ionoregulatory parameters. Environ. Toxicol., v. 21, 33- 46, 2006.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem., v. 249, 7130-7139, 1974.

HALL, S.; BRADLEY, T.; MOORE, J.T.; KUYKINDALL, T.; MINELLA, L. Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO₂ particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO₂ toxicity. Nanotoxicol., v. 3, 91-97, 2009.

HANDY, R.D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol., v. 135, 25-38, 2003.

HAO, L.H.; WANG, Z.Y.; XING, B.S. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). J. Environ. Sci., v. 21, 1459-1466, 2009.

HARPER, C.L.; WOLF, J. Morphologic effects of the stress response in fish. Ilar J., v. 50, 387-396, 2009.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radical. In: STOREY, K.B. Functional metabolism: regulation and adaptation. New York: John Wiley & Sons, 2004. p. 319-368.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R.A.; OKIHIRO, M.S. Histopathologic biomarkers. In: HUGGETT, R.J.; KIMERLI, R.A.; MEHRLE Jr, P.M., BERGMAN, H.L. Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. p. 155-196.

HIRANO, K.; NITTA, H.; SAWADA, K. Effect of sonication on the photo-catalytic mineralization of some chlorinated organic compounds. Ultrason Sonochem., v. 12, 271-276, 2005.

JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. Lipids, v. 26, 853-856, 1991.

KLEINOW, K.M.; NICHOLS, J.W.; HAYTON, W.L.; MCKIM, J.M.; BARRON, M.G. Toxicokinetics in fishes. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. The toxicology of fishes. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008. p. 55-152.

KNIGHT, J. Diseases related to oxygen-derived free radicals. Ann. Clin. Lab. Sci., v. 25, 111-121, 1995.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.*, v. 257, 5751–5754, 1982.

LIANG, G.; PU, Y.; YIN, L.; LIU, R.; YE, B.; SU, Y.; LI, Y. “Influence of different sizes of titanium dioxide nanoparticles on hepatic and renal functions in rats with correlation to oxidative stress”, *J. Toxicol. Environ. Health. A*, v. 72, 740-745, 2009.

LIU, H.; MA, L.; ZHAO, J.; LIU, J.; YAN, J.; RUAN, J.; HONG, F. Biochemical toxicity of nano-anatase TiO₂ particles in mice. *Biol. Trace Elem. Res.*, v. 129, 170-180, 2009.

MCCORD, J.E.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, v. 244, 6049-6055, 1969.

OBBERDÖRSTER, G.; OBBERDÖRSTER, E.; OBBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.*, v. 113, 823-839, 2005.

OTTO, D.M.; MOON, T.W. 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 77, 281-287, 1995.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BINHAFEEZ, B.; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago Attu (Bl. & Schn.). *Sci. Total Environ.*, v. 309, 105-115, 2003.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: Fishing News Books, 1994. p. 339-352.

REEVES, J.F.; DAVIES, S.J.; DODD, N.J.F.; JHA, A.N. Hydroxyl radicals (·OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat. Res.*, v. 640, 113-122, 2008.

REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory condition: implication for the use of biomarkers. *Aquat. Toxicol.*, v. 31, 143-164, 1995.

ROMBOUT, J.H.W.M.; HUTTENHUIS, H.B.T.; PICCHIETTI, S.; SCAPIGLIATI, G. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 19, 441-455, 2005.

SCOWN, T.M.; VAN 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. *Toxicol. Sci.*, v. 109, 372-380, 2009.

SIES, H. Glutathione and its cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 27, 916-921, 1999. STADTMAN, E.R., LEVINE, R.L. Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 899, 191-208, 2000.

STADTMAN, E.R.; OLIVER, C.N.; STARKE-REED, P.E. Implication of metal catalyzed oxidation of enzymes in aging, protein turnover, and oxygen toxicity. *Korean J. Biochem.*, v. 23, 49-54, 1991.

STARKE, P.E.; OLIVER, C.N.; STADTMAN, E.R. Modification of hepatic proteins in rats exposed to high oxygen concentration. *Faseb J.*, v. 1, 36-39, 1987.

SUTARIYA, V.B.; PATHAK, V.; GROSHEV, A.; CHOUGULE, M.B.; NAIK, S.; PATEL, D.; PATHAK, Y. Introduction--Biointeractions of nanomaterials, challenges and solutions. In: SUTARIYA, V.B.; PATHAK, Y. *Biointeractions of nanomaterials*. Boca Raton: CRC Press, 2015. p. 1-48.

VELMA, V.; TCHOUNWOU, P.B. Chromium-induced biochemical and genotoxic effects in liver and kidney of Goldfish, *Carassius auratus*. *Mutat. Res.*, v. 698 (1-2), 43-51, 2010.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CAVALETTO, M.; MARCHI, B.; PANZANO, E.; BLASCO, J. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.*, v. 46, 1612-1619, 1999.

WANG, J.; ZHOU, G.; CHEN, C.; YU, H.; WANG, T.; MA, Y.; JIA, G.; GAO, Y.; LI, B.; SUN, J.; LI, Y.; JIAO, F.; ZHAO, Y.; CHAI, Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Lett.*, v. 168, 176-185, 2007.

WHITE, C.C.; VIERNES, H.; KREJSA, C.M.; BOTTA, D.; KAVABAGG, D.T.J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal. Biochem.*, v. 318, 175-180, 2003.

WOLKE, R.E.; MURCHELANO, R.A.; DISKSTEIN, C.; GEORGE, C.J. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates as fish health monitors. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 35, 222-227, 1985.

XIONG, D.W.; FANG, T.; YU, L.P.; SIMA, X.F.; ZHU, W.T. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci. Total Environ.*, v. 409, 1444-1452, 2011.

ZHANG, J.; SHEN, H.; WANG, X.; WU, J.; XUE, Y. Effects of chronic exposure of 2, 4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, v. 55, 167-174, 2004.

ZIOLLI, R.L.; JARDIM, W.F. Mechanism reactions of photodegradation of organic compounds catalyzed by TiO₂. *Quim. Nova*, v. 21, 319-325, 1998.

CAPÍTULO 3

Balanço iônico em *Prochilodus Lineatus* após exposição a nanopartículas de dióxido de titânio

Resumo

O objetivo desse estudo foi investigar se as NP-TiO₂ causam distúrbios osmorregulatórios em *Prochilodus lineatus* e quais as respostas bioquímicas e morfológicas para a manutenção do equilíbrio iônico. *P. lineatus* juvenis foram expostos a 0 (controle); 0,5; 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ durante 48 h (exposição aguda) e 14 d (exposição subcrônica) e posteriormente foram determinados a osmolalidade e íons plasmáticos, a atividade da sódio potássio-ATPase (Na⁺/K⁺-ATPase), hidrogênio-ATPase vesicular (H⁺-ATPase) e anidrase carbônica e a morfologia das células ricas em mitocôndria (CRM). No plasma, a osmolalidade diminuiu e a concentração dos íons cálcio (Ca²⁺) aumentou após exposição aguda a NP-TiO₂ e não ocorreu nenhuma alteração na osmolalidade e nos níveis de íons plasmáticos após exposição subcrônica. Nas brânquias, as NP-TiO₂ inibiram a atividade das enzimas osmorregulatórias após exposição aguda, mas não houve alteração após exposição subcrônica, e nos rins não se observou alteração na atividade das enzimas osmorregulatórias (ensaio agudo e subcrônico). A densidade de CRM, nas brânquias, não foi alterada após exposição aguda, mas aumentou nos filamentos após exposição subcrônica. Após exposição aguda, a densidade das CRM com superfície apical semelhante a esponja (CRMe) aumentou na superfície branquial resultando em aumento da área fracional das CRM (AFCRM); apenas nos animais expostos a 1,5 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ ocorreu redução da área fracional das CRM com microvilosidades na superfície apical (CRMm). Após exposição subcrônica, a densidade das CRMm diminuiu e a densidade das CRMe aumentou. Nos rins, a densidade de CRM diminuiu para a exposição aguda a 1,5 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ e aumentaram após exposição subcrônica a 0,5; 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂. Esses resultados sugerem que as NP-TiO₂ causam desequilíbrio osmorregulatório em *P. lineatus* após exposição aguda, mas ajustes fisiológicos podem ter sido capazes de manter a homeostase osmo-iônica após exposição subcrônica.

Palavras-chave: Plasma. Células ricas em mitocôndrias. Brânquias. Rins.

1 Introdução

Atualmente, o uso de materiais manufaturados em nanoescala (1-100nm) é dominante em vários ramos industriais, o que se deve às suas propriedades específicas como diâmetro, área de superfície, carga e energia livre na superfície e estrutura cristalina. Entre os nanomateriais manufaturados, as nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂) são umas das mais utilizadas em bens de consumo como produtos de higiene pessoal, alimentícios, têxteis, cosméticos (protetores solares e hidratantes) e eletroeletrônicos (MULLER e NOWACK, 2008). As NP-TiO₂ não são totalmente removidas após tratamentos de efluentes industriais e domésticos e podem contaminar ambientes aquáticos exibindo ecotoxicidade aquática determinada pelo tamanho, área de superfície e estado de agregação das NP (REIJNDERS, 2012). As NP-TiO₂ presentes no ambiente aquático entram em contato com o epitélio branquial durante as trocas gasosas e iônicas e podem ser absorvidas pelos peixes.

Estudos toxicológicos têm mostrado que as NP podem gerar respostas bioquímicas fisiológicas e morfológicas em diversas espécies de peixes. A morfologia do tecido branquial dos peixes pode ser alterada frente a um agente irritante, como as NP-TiO₂, e ocorrer espessamento epitelial, hiperplasia de células e secreção de muco de forma a reduzir ou impedir a entrada desses agentes (FEDERICI et al., 2007; HAO et al., 2009; XIONG et al., 2011) o que pode alterar as funções das brânquias como a regulação osmótica e iônica. Além disso, as NP-TiO₂ podem causar inibição da enzima sódio potássio ATPase (Na⁺/K⁺-ATPase) (FEDERICI et al., 2007; HAO et al., 2009; ZHU et al., 2010; XIONG et al., 2011), pois há alta afinidade das ATPases de membrana por metais como o titânio (LI et al., 1996). Portanto, as NP-TiO₂ podem afetar a homeostase osmo-iônica dos peixes de água-doce, nos quais há absorção ativa de Na⁺, Ca²⁺ e Cl⁻ e excreção de urina diluída para compensar a perda de íons por difusão e o ganho osmótico de água pela superfície corporal (HIROSE et al., 2003; BONE e MOORE, 2008).

Assim como as brânquias, o rim também é considerado um órgão-alvo de xenobióticos em peixes por estarem em contato com xenobióticos presentes nos sangue durante a filtração deste. As NP-TiO₂ tendem a acumular no tecido renal (WANG et al., 2007; LIU et al., 2009; SCOWN et al., 2009) e podem comprometer a função homeostática renal de manutenção do volume, íons e pH do sangue e fluidos corpóreos, via reabsorção seletiva (IQBAL et al., 2004).

As células ricas em mitocôncrias (CRM) são as principais células do tecido branquial e túbulos renais encarregadas de manter o equilíbrio iônico, sendo ricas em mitocôndrias, nas enzimas Na⁺/K⁺-ATPase, hidrogênio-ATPase vesicular (H⁺-ATPase), anidrase carbônica

(AC) e cálcio ATPase (Ca^{2+} -ATPase), além de canais de Na^+ e trocadores como $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, Na^+/H^+ ou NH_4^+ (PERRY, 1997; HIROSE et al., 2003). Xenobióticos podem ocasionar a proliferação ou depressão de CRM com consequentes distúrbios osmorregulatórios (CAMARGO et al., 2009). Dessa forma, as CRM, suas enzimas e canais iônicos constituintes, são bons indicadores de contaminação ambiental.

O objetivo deste estudo foi investigar se as NP-TiO₂ causam distúrbios osmorregulatórios em *Prochilodus lineatus* testando as seguintes hipóteses: 1) as NP-TiO₂ alteram o equilíbrio osmo-iônico; 2) induzem alterações nas CRM presentes nas brânquias e rins; 3) alteram a atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase e Anidrase Carbônica presentes nas brânquias e rins.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais

Jovens de *P. lineatus* (massa corpórea: $31,06 \pm 0,39$ g, comprimento total: $14,38 \pm 0,06$ cm) obtidos da Estação de Aquicultura da Usina Hidroelétrica de Furnas, São José da Barra, MG, Brasil, foram aclimatados durante dois meses em tanques de 1000 L com água corrente, sem cloro e aeração constante. Os animais foram alimentados “*ad libitum*” com ração comercial para peixes (FRI-ACQUA 40, Fri-Ribe Rações, 40 % de proteína). As variáveis físicas e químicas da água (temperatura: 22,49-26,34 °C, oxigênio dissolvido: 6,19-7,82 mg L⁻¹, pH: 6,31-7,73, condutividade: 40-58 µS cm⁻³, alcalinidade: 35-43 mg L⁻¹ como CaCO₃ e dureza total: 39-50 mg L⁻¹ como CaCO₃) foram monitoradas e se mantiveram constantes durante o período de aclimação e dos ensaios de toxicidade.

2.2 Exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂

Posteriormente, *P. lineatus* foram expostos a 0 (grupo controle), 0,5; 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ (Concentração nominal: 0, 1, 5, 10 e 50 mg L⁻¹ de NP-TiO₂) durante 48 h (exposição aguda) e 14 dias (exposição subcrônica). Essas foram as concentrações a que algumas espécies mostraram sensibilidade em outros trabalhos (FEDERICI et al., 2007; HALL et al., 2009; HAO et al., 2009; XIONG et al., 2011) uma vez que a CL50 das NP-TiO₂ em *P. lineatus* foi maior que 100 mg L⁻¹. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em cinco aquários, em duplicata (n=10 peixes/tanque 200 L) em sistema semi-estático com renovação de 80% da água com NP-TiO₂ a cada 24h. Durante a exposição subcrônica os animais foram alimentados a cada três dias imediatamente antes da renovação da água dos aquários.

Ao final dos ensaios de exposição aguda e subcrônica, os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹) para colheita de amostras de sangue (~ 0,5 mL), via punção da veia caudal com seringas heparinizadas, e em seguida, foram pesados, medidos e sacrificados via secção medular. Para análises plasmáticas, o sangue foi centrifugado e o plasma armazenado a -20°C. Amostras de brânquias e rins foram fixadas para análises morfofuncionais (glutaraldeído 2,5% com tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,3 ou solução de Bouin) ou congeladas e armazenadas a -80°C para análises bioquímicas. Um total de 12 animais por grupo de exposição foi utilizado para as análises plasmáticas e bioquímicas. Para as análise morfológicas foram utilizados 8 animais por grupo de exposição. A realização dos experimentos foi aprovada pelo Comitê de Ético Animal (Protocolo nº 027/2011) e Comitê de Ética Ambiental (Protocolo nº 002/2011) da UFSCAR.

2.3 Osmolalidade e íons plasmáticos

A osmolalidade plasmática (mOsmol Kg^{-1}) foi determinada por congelamento em um semi-microsmômetro ($\mu\text{OSMETTE PRECISION SYSTEM}$). Os níveis de sódio (Na^+) e potássio (K^+) foram medidos usando fotômetro de chama (DIGMED DM-61). As concentrações de cálcio (Ca^{2+}) e cloreto (Cl^-) foram determinadas utilizando kits comerciais (LABTEST KIT 90 e 115 , respectivamente) em leitora de microplaca ($\text{SpectraMax}^{\text{®}} \text{M5 Multi-Mode}$, Molecular Devices, USA). Os eletrólitos plasmáticos foram expressos em mEq L^{-1} .

2.4 Análises bioquímicas em brânquias e rins

A concentração de proteína tecidual (mg mL^{-1}), usada para a expressão da atividade das enzimas foi determinada utilizando kit comercial Doles Micropote Pirogalol $^{\text{®}}$ (Doles Reagentes, Goiânia, Brasil). A atividade da Na^+/K^+ -ATPase ($\mu\text{mol ADP mg proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e da H^+ -ATPase ($\mu\text{mol ADP mg proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em amostras de brânquias e rins foram determinadas simultaneamente seguindo método descrito por Gibbs e Somero (1989) adaptado para leitora de microplaca ($\text{SpectraMax}^{\text{®}} \text{M5 Multi-Mode}$, Molecular Devices, USA). A atividade enzimática das ATPases foi determinada na presença de ouabaína (inibidor da Na^+/K^+ -ATPase), na presença de N-etilmaleimida (inibidor da H^+ -ATPase) e na ausência de inibidores enzimáticos. A atividade da anidrase carbônica foi determinada adicionando água saturada com CO_2 ao sobrenadante do homogeneizado de brânquias e rins para determinação do decaimento do pH da solução [(Taxa da reação catalisada / taxa de reação não catalisada -1) / mg proteína] de acordo com Vitale et al. (1999).

2.5 Identificação das CRM em brânquias e rins

As amostras de brânquias e rins fixadas em Bouin foram processadas para inclusão em parafina, seccionadas ($6 \mu\text{m}$ espessura) com micrótomo (MICROM HM 360 , MICROM International GmbH), desparafinizadas, reidratadas e processadas de acordo com a técnica do complexo avidin-biotin-peroxidase por meio da identificação da enzima Na^+/K^+ -ATPase, de acordo com o método descrito por Dang et al. (2000). Os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti- Na^+/K^+ -ATPase (IgG α 5, University of Iowa, USA) e como segundo anticorpo foi usado o IgG goat anti-mouse peroxidase (Chemicon international, USA). Subsequentemente, 3-3-diaminobenzidina (DAB) + sulfato de níquel amoniacal em tampão Tris-salino, contendo H_2O_2 (0,03%) foi aplicado para identificação do anticorpo. Para cada peixe foram quantificadas as CRM no filamento e lamelas em 25 campos aleatórios nas

brânquias e 40 túbulos aleatórios em rins. Os resultados foram expressos como densidade de CRM por mm^2 de epitélio nas brânquias e densidade de CRM por área tubular nos rins.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de brânquias, fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio pH 7,4, foram desidratadas em 1,1,1,3,3,3-hexadimetildisilazano (HMDS) e secas a temperatura ambiente. Após cobertura com camada de ouro (99%, Evonik Degussa) em um Sputtering FCD 004 BAUSER a vácuo, imagens digitais foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (Philips- Inspect S50, FEI Company) no Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCAR. Em seguida, as amostras foram analisadas com o software Motic Image plus 2.0 (BINDON et al., 1994; MORON et al., 2003). A densidade e a área fracional de células ricas em mitocôndrias (AFCRM), em 5 filamentos aleatórios de cada peixe, foram calculadas utilizando as seguintes fórmulas: $\text{AFCRM} = \Sigma \text{área de todas as CRM} / \text{área da fotografia}$ e $\text{Densidade} = \text{AFCRM} / \text{Média das áreas das CRM}$.

2.7 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Após o teste de normalidade, homogeneidade de variância e linearidade, aplicou-se o teste paramétrico Análise de Variância (ANOVA) de uma via ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. No caso em que diferenças significativas foram detectadas no teste de ANOVA, o teste de Dunnett foi aplicado para verificar onde ocorreram as diferenças. Todos os testes foram efetuados com nível de significância de 0,05 usando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft, Estados Unidos).

3 Resultados

3.1 Osmolalidade e íons plasmáticos

Os dados de osmolalidade e íons plasmáticos estão apresentados da Tabela 1. A osmolalidade plasmática diminuiu ($p < 0,05$) após exposição aguda para todos os tratamentos com NP-TiO₂ e os níveis Ca²⁺ diminuíram ($p < 0,05$) após exposição a 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂, enquanto a concentração de K⁺ aumentou ($p > 0,05$) após exposição aguda a 0,5 mg L⁻¹ de NP-TiO₂. No entanto, não se observou alteração nos íons plasmáticos Na⁺ e Cl⁻. Após exposição subcrônica não ocorreu alteração ($p > 0,05$) na osmolalidade e na concentração dos íons plasmáticos.

Tabela 1 - Concentração de íons (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-) e osmolalidade do plasma sanguíneo de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de NP-TiO₂ durante 48 h (exposição aguda) e 14 dias (exposição subcrônica)

Parâmetro	Controle	0,5 mg L ⁻¹	1,5 mg L ⁻¹	3,0 mg L ⁻¹	15,0 mg L ⁻¹
Exposição Aguda					
Na ⁺ (mEq L ⁻¹)	118,44 ± 2,04	116,09 ± 2,85	117,08 ± 1,25	118,42 ± 2,74	121,67 ± 0,82
K ⁺ (mEq L ⁻¹)	3,23 ± 0,08	3,68 ± 0,09*	3,43 ± 0,07	3,19 ± 0,07	3,55 ± 0,14
Ca ²⁺ (mEq L ⁻¹)	5,76 ± 0,25	5,76 ± 0,13	5,10 ± 0,14	4,73 ± 0,30*	4,80 ± 0,21*
Cl ⁻ (mEq L ⁻¹)	96,73 ± 2,86	95,22 ± 1,84	97,92 ± 1,68	99,82 ± 2,12	93,14 ± 2,35
Osmolalidade (μOsmol Kg ⁻¹)	234,44 ± 2,46	222,25 ± 1,62*	224,92 ± 1,17*	222,18 ± 2,56*	220,92 ± 1,61*
Exposição Subcrônica					
Na ⁺ (mEq L ⁻¹)	139,10 ± 5,96	142,73 ± 8,27	140,60 ± 2,76	146,17 ± 4,46	139,90 ± 4,96
K ⁺ (mEq L ⁻¹)	4,14 ± 0,18	3,98 ± 0,11	4,34 ± 0,21	4,13 ± 0,12	4,16 ± 0,10
Ca ²⁺ (mEq L ⁻¹)	4,90 ± 0,16	4,99 ± 0,16	5,40 ± 0,13	5,30 ± 0,09	5,09 ± 0,13
Cl ⁻ (mEq L ⁻¹)	115,53 ± 2,97	111,90 ± 2,58	112,42 ± 4,06	111,17 ± 3,47	104,22 ± 3,02
Osmolalidade (μOsmol Kg ⁻¹)	238,00 ± 5,43	246,58 ± 4,78	244,92 ± 5,02	243,70 ± 3,22	240,17 ± 4,49

Os valores referem-se à média ± EPM. * Indicam diferença significativa entre cada tratamento e seu controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂) (ANOVA, p < 0,05); Kruskal-Wallis foi aplicado para Na⁺ na exposição aguda (p < 0,05).

3.2 Análises bioquímicas em brânquias e rins

Em brânquias, a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase e H⁺-ATPase diminuíram significativamente (p < 0,05) nos tratamentos de 1,5 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ e a atividade da anidrase carbônica diminuiu significativamente (p < 0,05) nos tratamentos de 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ em relação ao grupo controle após exposição aguda (Fig. 1). Após exposição subcrônica a NP-TiO₂ não foi observada alteração na atividade das enzimas com função de osmorregulação (p > 0,05) (Fig. 1). Nos rins, a atividade das enzimas com função de osmorregulação não alterou significativamente (p > 0,05) após exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂.

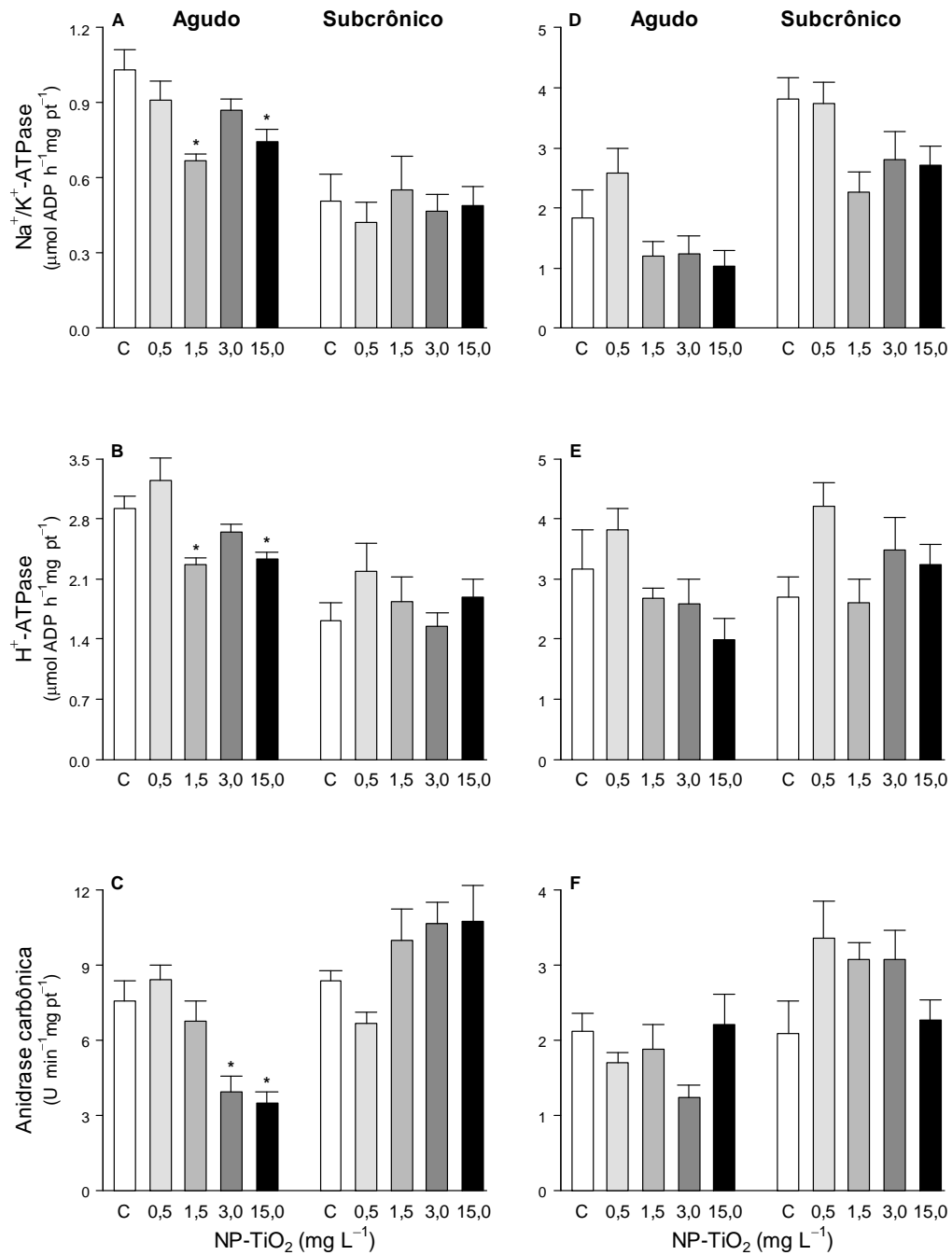


Fig. 1 - Atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase, V-H⁺-ATPase e anidrase carbônica em brânquias (A, B e C) e rins (D, E e F) de *Prochilodus lineatus* após exposições aguda (48 h) e subcrônica (14 d) a diferentes concentrações de NP-TiO₂. Os valores referem-se à média ± EPM. C= Controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂). *representam diferenças significativas entre cada tratamento e o seu respectivo controle (ANOVA, p < 0,05). Kruskal–Wallis foi aplicado para V-H⁺-ATPase em brânquias e rins após 48 h de exposição e para anidrase carbônica em brânquias após 14 d de exposição.

3.3 Identificação de CRM e MEV

A marcação imuno-histoquímica da Na^+/K^+ -ATPase identifica as CRM encontradas no epitélio do filamento e das lamelas das brânquiais, e nos túbulos renais dos peixes expostos a NP-TiO₂ (Figs. 2 e 3). Em brânquias, a densidade de CRM não foi alterada após exposição aguda ($p > 0,05$), mas aumentou significativamente ($p < 0,05$) no filamento após exposição subcrônica a 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ (Fig. 4). Nos túbulos renais, as CRM diminuíram significativamente após exposição aguda a 1,5 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ e aumentaram significativamente após exposição subcrônica a 0,5; 1,5; 3,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ ($p < 0,05$) (Fig. 4).

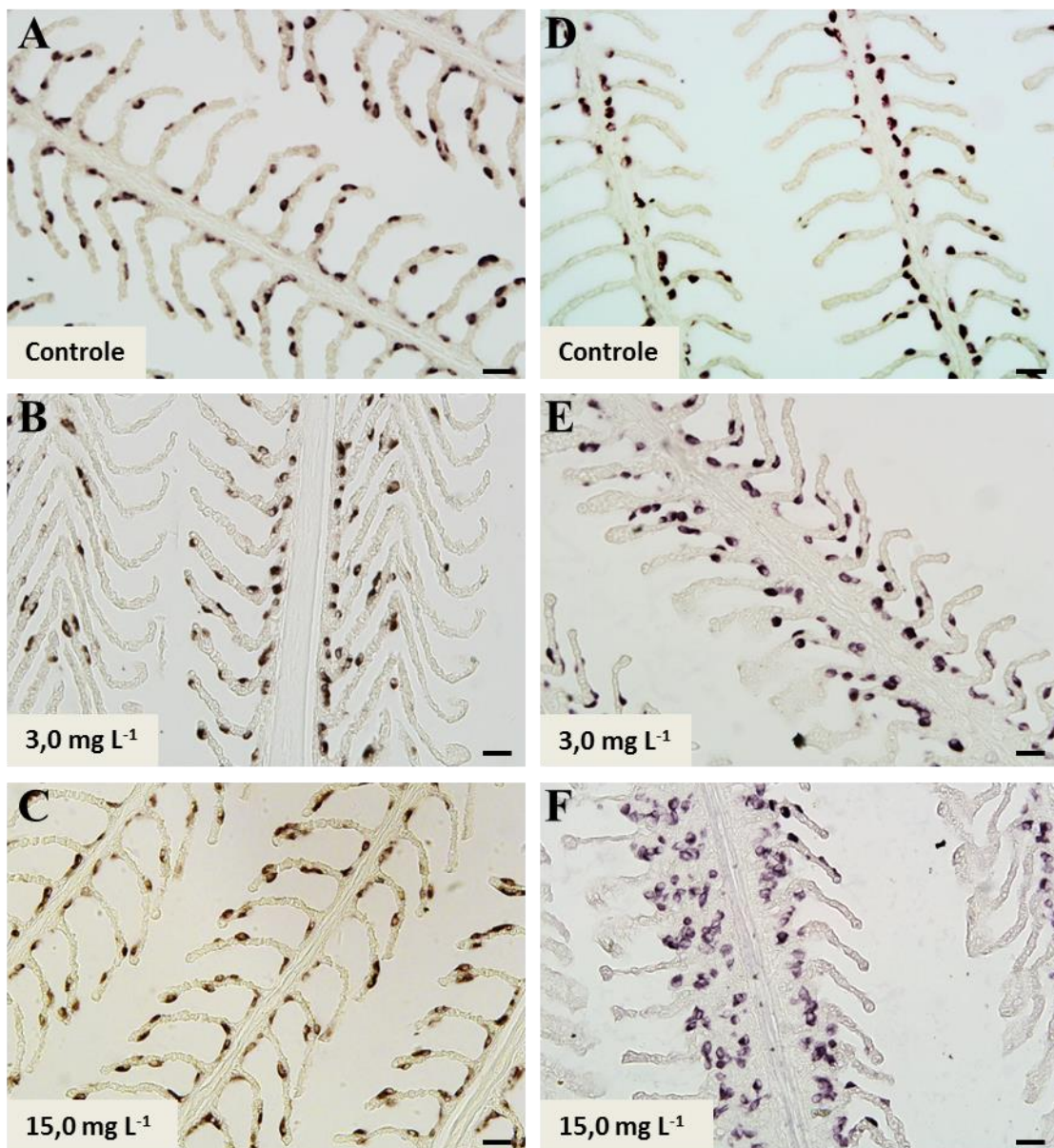


Fig. 2 - Imuno-histoquímica em brânquias mostrando as células ricas em mitocôndrias (CRM) marcadas contra Na^+/K^+ -ATPase (pontos pretos) após exposição a NP-TiO₂ por 48 h (A, B e C) e 14 dias (D, E e F) (barra de escala = 20 μm). Controle= 0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂.

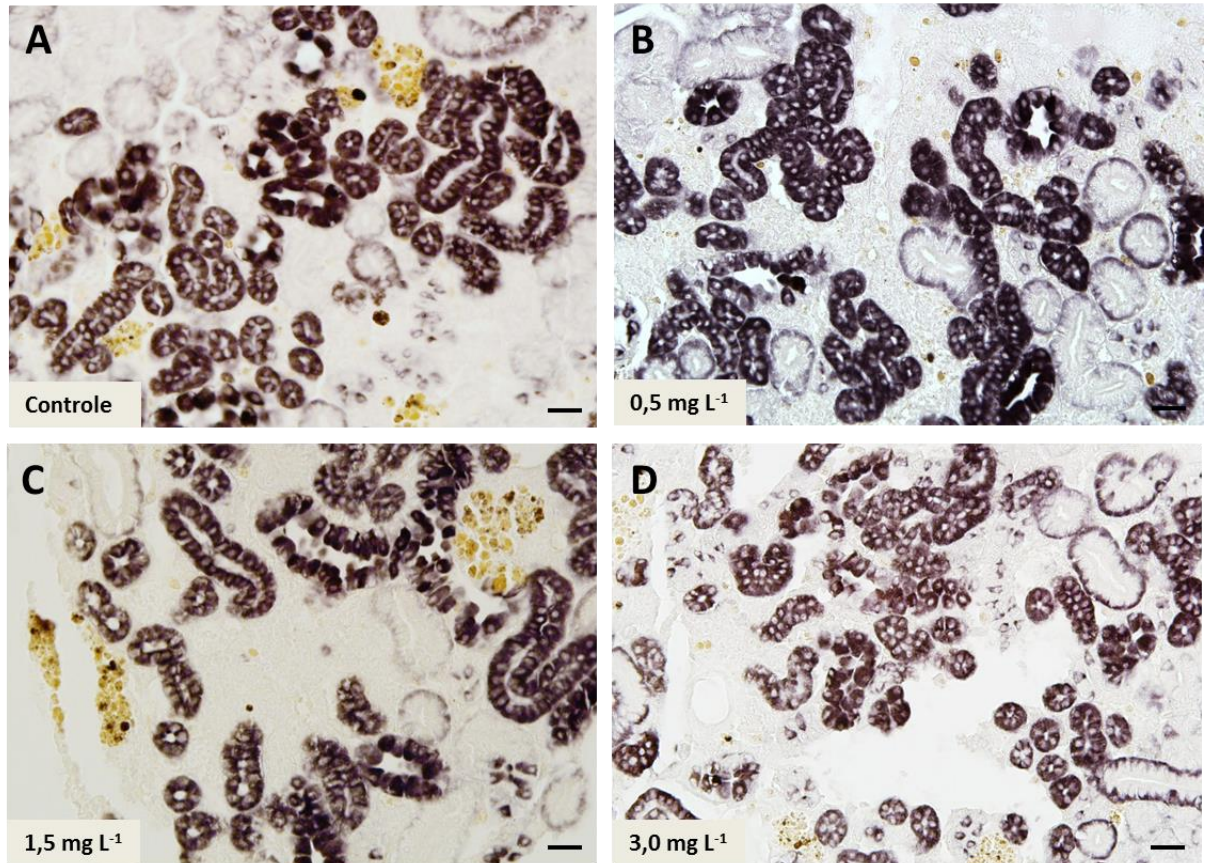


Fig. 3 - Imuno-histoquímica em rins mostrando as células ricas em mitocôndrias (CRM) em túbulos renais marcadas contra Na⁺/K⁺-ATPase (pontos pretos) após exposição a NP-TiO₂ por 14 dias (A= Controle ou 0,0; B= 0,5; C=1,5 e D=3,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂) (barra de escala = 20 μm).

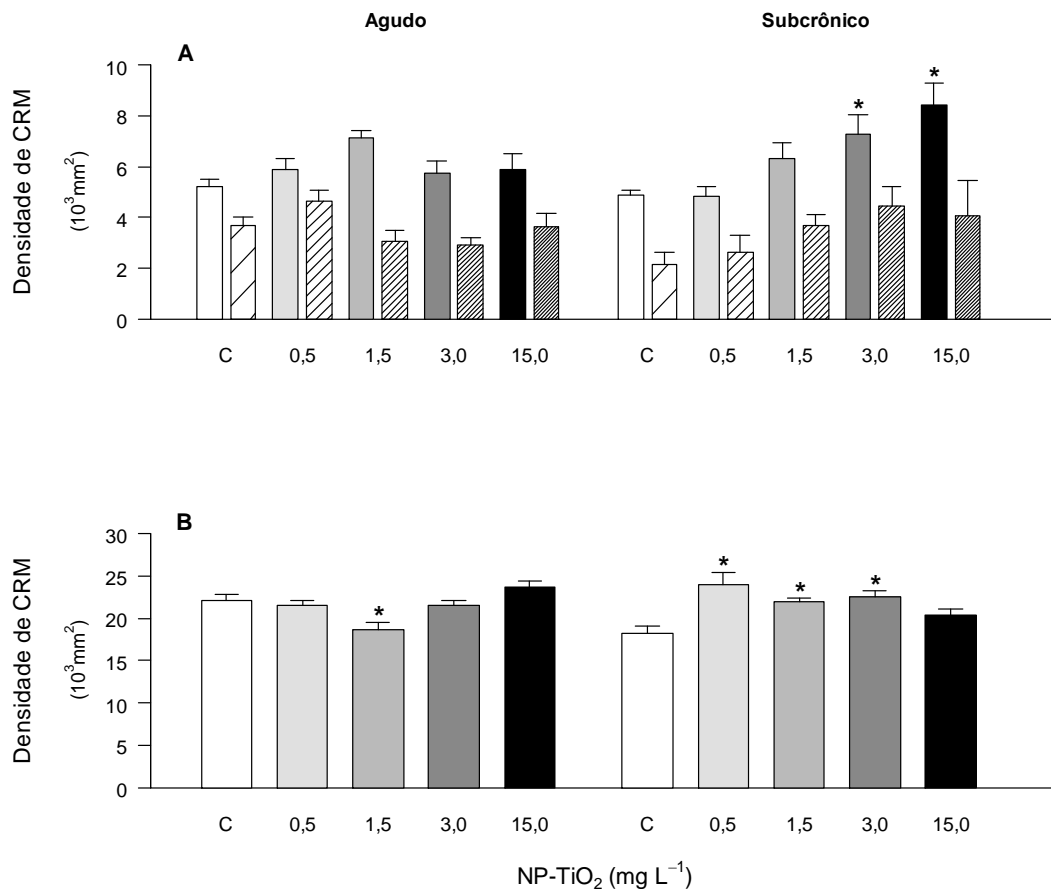


Fig. 4 - Densidade de células ricas em mitocôndrias (CRM) encontradas por técnica de imuno-histoquímica em filamentos (barras em escala de cinza) e lamelas (barras hachureadas) de brânquias (A) e túbulos renais (B) de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de NP-TiO₂ durante 48 h (exposição aguda) e 14 dias (exposição subcrônica). Os valores referem-se à média ± EPM. C= controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂). * Indicam diferença significativa entre cada tratamento e seu controle (ANOVA, p<0,05).

As células pavimentosas do epitélio que reveste a superfície dos filamentos branquiais de *P. lineatus* apresentam microdobras na região apical (Figs. 5 e 6). Dois tipos de CRM foram identificados na superfície epitelial (Figs. 5 e 6). As CRM que apresentam microvilosidades na superfície apical (CRMm) e as CRM que tem superfície apical côncava e com aspecto de esponja (CRMe) (Figs. 5 e 6). Após exposição aguda, a densidade das CRMm não foi alterada ($p > 0,05$), mas ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) da densidade das CRMe nos tratamentos de 0,5; 1,5 e 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ e da densidade das CRM totais no tratamento de 15,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ (Fig. 7). Uma redução significativa ($p < 0,05$) da área fracional foi observada nas CRMm em todos os tratamentos com NP-TiO₂ e para as CRM totais nos tratamentos de 0,5 e 3,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂, enquanto a área fracional das CRMe aumentou ($p < 0,05$) no tratamento de 1,5 mg L⁻¹ de NP-TiO₂ (Fig. 7), após exposição aguda.

Após exposição subcrônica, a densidade das CRMm diminuiu ($p < 0,05$) no tratamento de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO₂ e a densidade das CRMe aumentou ($p < 0,05$) nos tratamentos de $3,0$ e $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO₂, enquanto a densidade das CRM totais não foi alterada ($p > 0,05$). No entanto, as NP-TiO₂ não alteraram ($p > 0,05$) a área fracional total das CRM após exposição subcrônica, exceto para as CRMm para o tratamento de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO₂, que diminuíram ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Fig. 7).

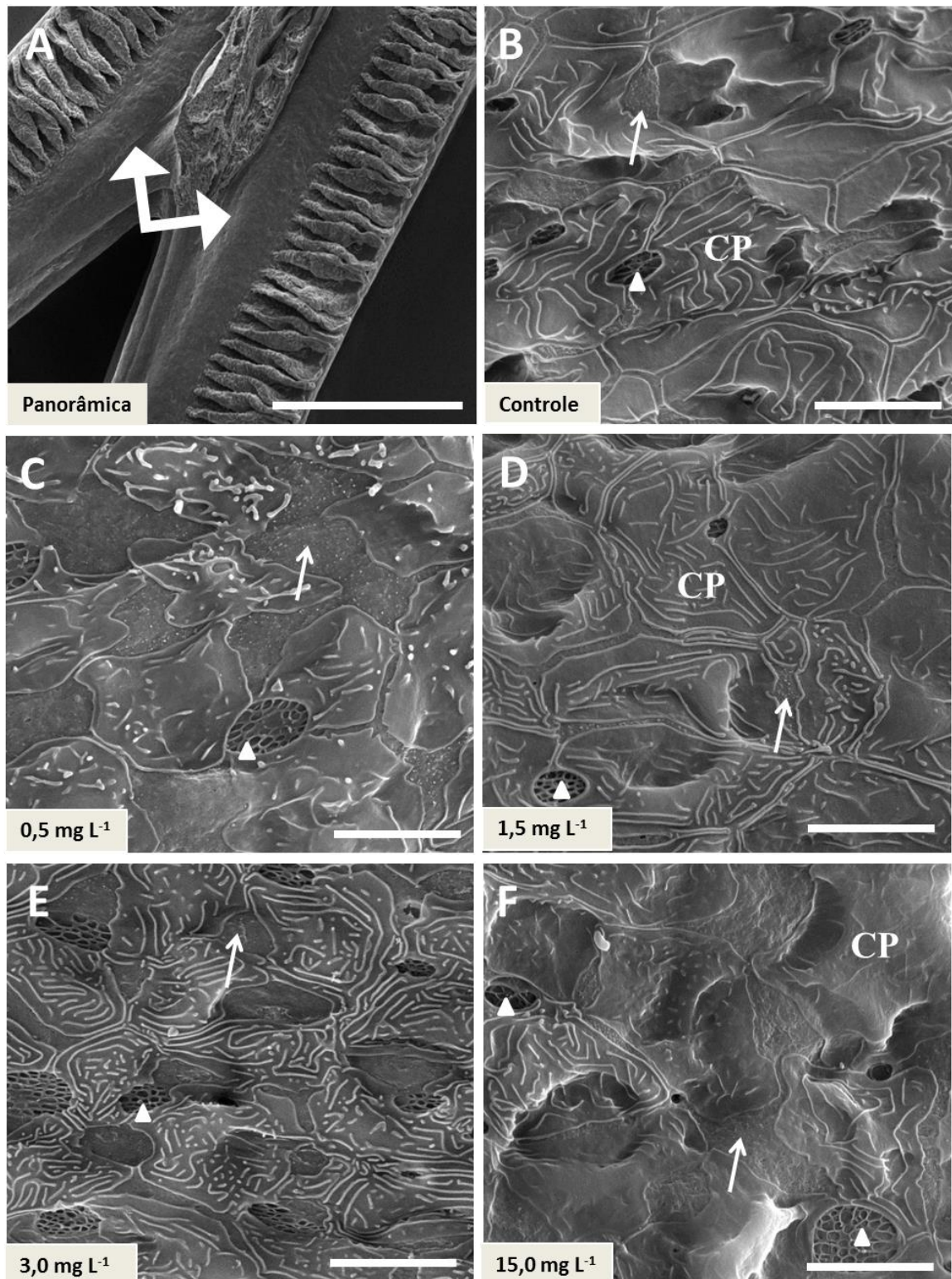


Fig. 5 - Eletromicrografias de varredura mostrando superfície do epitélio do filamento branquial de *Prochilodus lineatus*. (A) Filamentos branquiais mostrando as lamelas e a área analisada (seta dupla; barra de escala = 500 μm). (B) Grupo controle ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO₂) e (C, D, E F) grupos expostos por 48 horas a $0,5$; $1,5$; $3,0$ e $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO₂, respectivamente (barra de escala= 10 μm). Setas indicam as células ricas em mitocôndrias com superfície apical com microvilosidades (CRMm) e pontas de seta indicam CRM com superfície apical similar à esponja (CRMe). CP= células pavimentosas.

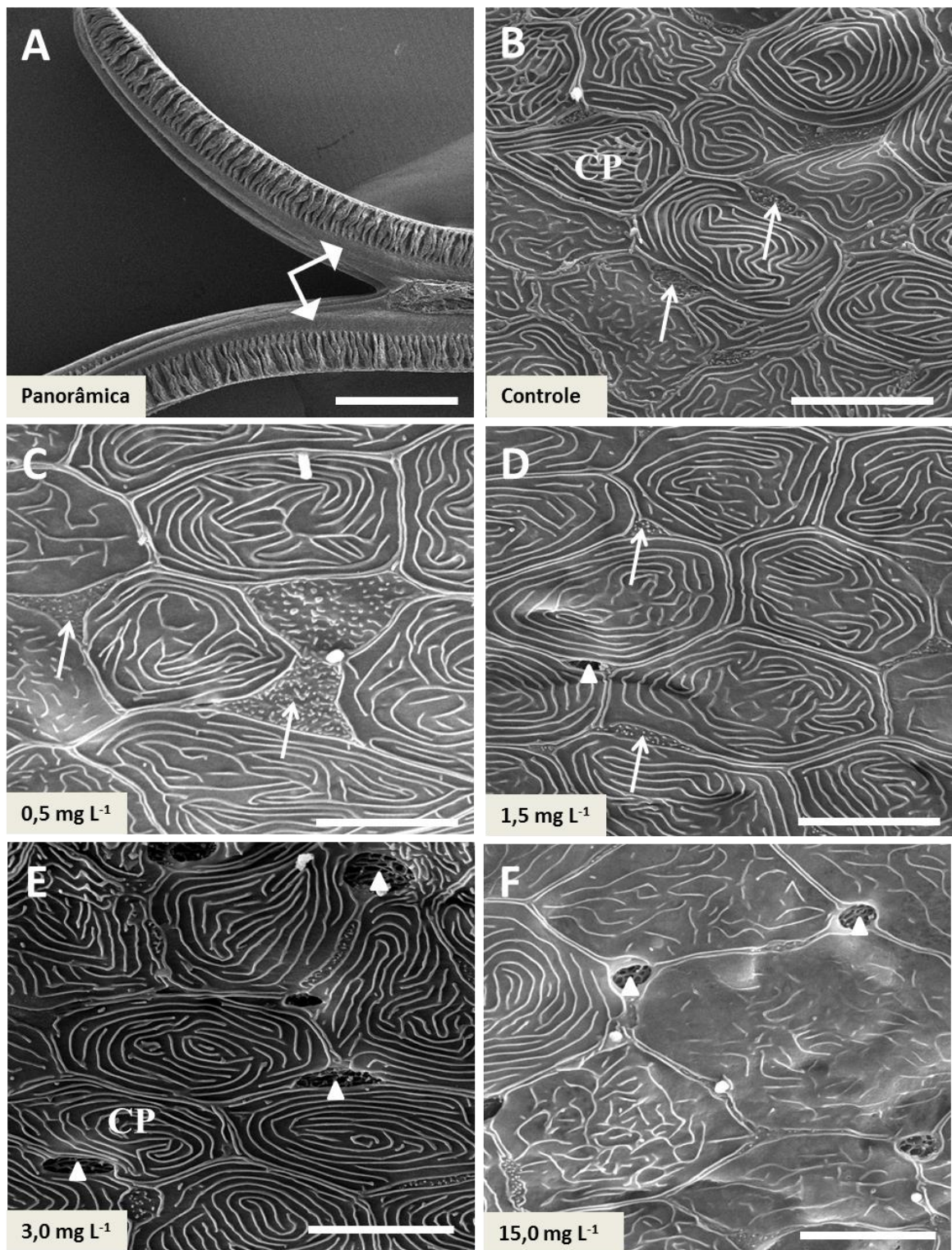


Fig. 6 - Eletromicrografias de varredura mostrando superfície do epitélio do filamento branquial de *Prochilodus lineatus*. (A) Filamentos branquiais mostrando as lamelas e a área analisada (seta dupla; barra de escala = 500 μm). (B) Grupo controle (0,0 mg L^{-1} de NP-TiO₂) e (C, D, E F) grupos expostos por 14 dias a 0,5; 1,5; 3,0 e 15,0 mg L^{-1} de NP-TiO₂, respectivamente (barra de escala= 10 μm). Setas indicam as células ricas em mitocôndrias com superfície apical com microvilosidades (CRMm) e pontas de seta indicam CRM com superfície apical similar à esponja (CRMe). CP= células pavimentosas.

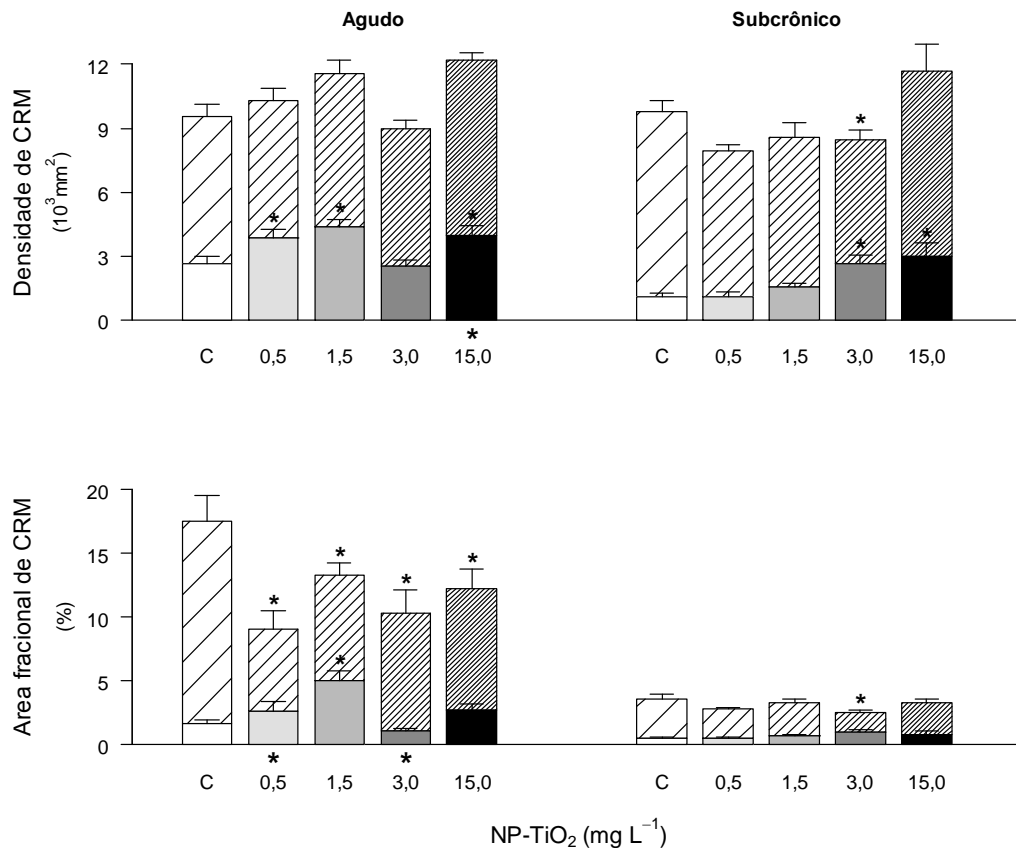


Fig. 7 - Densidade e área fracional de células ricas em mitocôndrias (CRM) semelhantes à esponja (CRMe) (colunas em escala de cinza) e com microvilosidades (CRMm) (colunas hachureadas) encontradas por microscopia eletrônica de varredura em filamentos e lamelas da brânquia de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de NP- TiO₂ durante 48 h (exposição aguda) e 14 dias (exposição subcrônica). Os valores referem-se à média ± EPM. A diferença entre as médias foi testada por ANOVA, $p < 0,05$ (exceto para densidade de CRM semelhantes à esponja, para a qual foi feito o teste de Kruskal-Wallis) C= Contro (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂). * Indicam diferença significativa entre cada tratamento e seu controle; * na base da coluna indicam quando o grupo foi diferente do controle considerando a soma dos dois tipos de CRM.

4 Discussão

4.1 Osmolalidade e íons plasmáticos

A diminuição da osmolalidade plasmática após exposição aguda a NP-TiO₂, neste estudo, evidencia que as NP, nas concentrações utilizadas nos experimentos, alteraram o equilíbrio iônico nos peixes estudados. Como a concentração plasmática dos íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻ não alteraram, a diminuição da osmolalidade plasmática pode ter sido causada pela diminuição na concentração dos íons cálcio (Ca²⁺), que assim como os íons Na⁺ e Cl⁻ são ativamente absorvidos pelas CRM (JÜRSS e BASTROP, 1995). Metais de transição, como o Ti, podem inibir a atividade da Ca²⁺-ATPase, a força motriz da tomada de cálcio nas

brânquias e intestinos, o que leva à redução da concentração de Ca^{2+} plasmático (WENDELAAR BONGA e LOCK, 2008; LIONETTO et al., 2000).

Após exposição subcrônica a NP-TiO₂, a osmolalidade plasmática não foi alterada, o que sugere que os peixes expostos às NP-TiO₂ foram capazes de ajustar e compensar o desequilíbrio osmótico inicial provocado pela ação das NP-TiO₂. O aumento da densidade das de CRM em contato com a água, pode ter sido a responsável por manter a absorção de íons.

4.2 Análises bioquímicas em brânquias e rins

Os teleósteos possuem mecanismos eficientes para a manutenção da homeostasia osmo-iônica apesar das variações na qualidade da água, como temperatura, pH, composição iônica, alcalinidade e poluição. As brânquias são o primeiro órgão de contato com o meio externo, sendo de grande importância na regulação iônica, equilíbrio ácido-base e nas trocas gasosas (PERRY, 1997; HIROSE et al., 2003; EVANS et al., 2005, WENDELAAR BONGA e LOCK, 2008).

Nas brânquias e rins são encontradas as CRM, ricas em mitocôndrias e consideradas os locais primários de absorção ativa dos íons sódio (Na^+), cloreto (Cl^-) e cálcio (Ca^{2+}) em peixes de água doce (EVANS et al., 2005). As CRM são ricas em Na^+/K^+ -ATPase, enzima encontrada na membrana baso-lateral dessas células e no sistema tubular dessas células que é contínuo à membrana baso-lateral. A Na^+/K^+ -ATPase remove Na^+ para o meio extracelular e K^+ para o meio intracelular gerando um gradiente osmo-elétrico que favorece a entrada de íons Na^+ do meio externo para o interior das CRM, através de canais de Na^+ e trocadores como $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, Na^+/H^+ ou NH_4^+ localizados na membrana apical (PERRY, 1997). O Na^+ entra passivamente pelos canais de Na^+ devido a um gradiente eletroquímico favorável criado pela H^+ -ATPase que excreta H^+ via membrana apical ou via trocadores $\text{Na}^+/\text{H}^+-\text{NH}_4^+$. A anidrase carbônica hidrata o CO_2 gerando H^+ e HCO_3^- (HWANG e LEE, 2007). A tomada de Cl^- ocorre via membrana apical pelo trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (EVANS e CLAIBORNE, 2009). Dessa forma, a Na^+/K^+ -ATPase, a H^+ -ATPase e a anidrase carbônica são essenciais para manter a regulação iônica em teleósteos.

Neste estudo, as NP-TiO₂ podem dificultar as trocas iônicas nas brânquias após exposição aguda por inibir enzimas com função de osmorregulação. Essa inibição pode ter ocorrido por interação direta com as NPs ou dissociação das NP em íons titânio (Ti) que podem ter se ligado a essas enzimas, causando sua inibição nos primeiros dias de exposição. Li et al. (1996) descreveram esta afinidade de metais por ATPases e Federici et al. (2007)

relatarem que em *Oncorhynchus mykiss* expostos a NP-TiO₂ em água doce, a inibição da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase branquial foi causada pelas NP.

Com a inibição da atividade H⁺-ATPase no presente estudo, a extrusão ativa de H⁺ via membrana apical diminui, o que impede a criação de um gradiente eletroquímico favorável para o influxo de Na⁺ através de canais de Na⁺ seletivos (PERRY et al., 2003). Adicionalmente, a inibição da atividade da anidrase carbônica que também ocorreu, diminui a geração de HCO₃⁻ e H⁺ conferindo menor capacidade para reter HCO₃⁻ via transporte pela membrana basolateral e secreção de prótons através da membrana apical das CRM (SATTIN et al. 2010; PAULINO et al. 2012). Contudo, o organismo compensou esse efeito ao longo do tempo e no ensaio subcrônico não ocorreu desequilíbrio osmótico, uma vez que não foram observadas alterações nos íons plasmáticos e na atividade das enzimas com função de osmorregulação.

4.3 Identificação de CRM e MEV

As trocas iônicas ocorrem principalmente nas CRM encontradas no epitélio dos filamentos, nas lamelas branquiais e nos túbulos renais (PERRY, 1997; HIROSE et al., 2003). As CRM são caracterizadas como células grandes e arredondadas, ricas em mitocôndrias e com um extenso sistema de membranas tubulares (WENDELAAR BONGA e LOCK, 2008; CAMARGO et al., 2009). Nessas membranas é observada alta densidade de unidades de ATPases que são responsáveis por trocas iônicas como a Na⁺/K⁺-ATPase e a Ca²⁺-ATPase, bem como canais de íons e outros mecanismos de transporte iônico (WENDELAAR BONGA e LOCK, 2008). Nos teleósteos de água doce, que sofrem constante perda de íons, uma das principais funções fisiológicas das CRM é absorver Ca²⁺, Na⁺ e Cl⁻ e transportar para o meio intersticial, garantindo o equilíbrio iônico do peixe (JÜRSS e BASTROP, 1995).

Em casos de contaminação aquática por metais, as brânquias e os rins são os órgãos mais afetados. As CRM podem ser alvo do acúmulo de metais, que se ligam às ATPases, proteínas de membrana que são ricas em cisteína, e possuem grande afinidade por metais (LI et al., 1996). O aumento da proliferação das CRM em brânquias e rins pode compensar a ação dos metais sobre elas (ORONSAYE e BRAFIELD, 1984; PRATAP e WENDELAAR BONGA, 1993; PELGROM et al., 1995; MAZON et al., 2002) e o aumento da expressão de metalotioneína nas CRM recém-diferenciadas pode proteger essas células dos danos causados pelos metais (WENDELAAR BONGA e LOCK, 2008). A proliferação de CRM provavelmente não ocorreu nos rins após exposição subcrônica de 15,0 mg L⁻¹ NP- TiO₂

devido à maior perda de tecido constatada pela observação de focos de necrose que foram observados neste órgão.

A diminuição da área fracional das CRM nos filamentos branquiais após exposição aguda a 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ pode estar relacionada à diminuição da AFCRM maduras e reflete um ajuste funcional e morfológico dessas células. (WENDELAAR BONGA e VAN DER MEIJ, 1989). A proliferação de CRM nos filamentos branquiais também poderia explicar porque a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase e da H⁺-ATPase nos grupos tratados com NP-TiO₂ não diferiu do controle após exposição subcrônica. A hipótese de aumento de produção da metalotioneína nessas CRM recém-diferenciadas, como já postulado por Wendelaar Bonga e Lock (2008), provavelmente evitou os danos causados por NP-TiO₂. Em um experimento de exposição ao cobre, um metal de transição, a metalotioneína só começou a ser sintetizada após 48 horas de exposição, e é conhecido que a expressão dessa proteína só ocorre na fase inicial do desenvolvimento celular (DANG et al., 1999).

Um aspecto interessante da proliferação de CRM é que ela não ocorreu nas lamelas branquiais, como observado em outro estudo, que propôs que ao se instalarem nas lamelas, as CRM ficam mais próximas da corrente sanguínea, aumentando sua eficiência no transporte de íons (DANG et al., 2000). Provavelmente a proliferação de CRM nos filamento branquiais foi suficiente para evitar os danos provocados pelas NP-TiO₂ e para a manutenção da homeostase e do equilíbrio osmótico do organismo.

5 Conclusões

Este estudo sugere que as NP-TiO₂ causam desequilíbrio osmorregulatório em *P. lineatus* nos primeiros dias de exposição (exposição aguda), mas ajustes fisiológicos podem ter sido capazes de manter a homeostase após exposição subcrônica. As NP-TiO₂ inibem a atividade de enzimas com função de osmorregulação em brânquias, mas não em rins após curto período de exposição, sendo que alterações severas na osmolalidade e na concentração de íons plasmáticos são evitados após exposição subcrônica devido à proliferação de novas CRMe nos filamentos branquiais e CRM nos túbulos renais, com um provável aumento na expressão da metalotioneína evitando a apoptose celular.

6 Agradecimentos

Este estudo foi realizado na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2011/10339-0) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia- Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq Proc. 573949/2008-5). Os autores são gratos à Estação de Aquicultura da Usina Hidroelétrica de Furnas pelo fornecimento dos peixes.

7 Referências

- BINDON, S.D.; FENWICK, J.C.; PERRY, S.F. Branchial chloride cell proliferation in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: implications for gas transfer. *Can. J. Zool.*, v. 72, 1395-1412, 1994.
- BONE, Q.; MOORE, R.H. *Biology of fishes*. 3. ed. New York: Taylor & Francis Group, 2008. 478 p.
- CAMARGO, M.M.P.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.*, v. 94, 40-46, 2009.
- DANG, Z.; LOCK, R.A.C.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S.E. The metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. *Am. J. Physiol.*, v. 277, R320-R331, 1999.
- DANG, Z.; LOCK, R.A.C.; FLICK, G.; WENDELAAR BONGA, S.E. Na⁺/K⁺-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to cooper. *J. Exp. Biol.*, v. 151, 517-428, 2000.
- EVANS, D.H.; CLAIBORNE, J.B. Osmotic and ionic regulation in fish. In: EVANS, D.H. *Osmotic and ionic regulation- cells and animals*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2002. p. 295-366.
- EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.*, v. 85, 97-177, 2005.
- 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. *Aquat. Toxicol.*, v. 84, 415-430, 2007.
- GIBBS, A.; SOMERO, G.N. Pressure Adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. *J. Exp. Biol.*, v. 143, 475-492, 1989.
- HALL, S.; BRADLEY, T.; MOORE, J.T.; KUYKINDALL, T.; MINELLA, L. Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO₂ particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO₂ toxicity. *Nanotoxicol.*, v. 3, 91-97, 2009.
- HAO, L.H.; WANG, Z.Y.; XING, B.S. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *J. Environ. Sci.*, v. 21, 1459-1466, 2009.
- HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major componentes of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol. B*, v. 136, 593-620, 2003.
- HWANG, P.P.; LEE, T.H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comput. Biochem. Physiol. A*, v. 148, 479-497, 2007.

- IQBAL, F.; QURESHI, I.Z.; ALI, M. Histopathological changes in the kidney of common carp, *Cyprinus carpio* following nitrate exposure. J. Res. Sci., v. 15, 411-418, 2004.
- JÜRSS, K.; BASTROP, R. The function of mitochondria-rich cells (chloride cells) in teleost gills. Rev. Fish Biol. Fisheries, v. 5, 235-255, 1995.
- LI, J.; LOCK, R.A.C.; KLAREN, P.H.M.; SWARTS, H.G.P.; SCHUURMANS STEKHOVEN, F.M.A.H.; AND WENDELAAR BONGA, S.E. Kinetics of copper inhibition of Na^+/K^+ -ATPase. Toxicol. Lett., v. 87, 31-38, 1996.
- LIONETTO, M.G.; GIORDANO, M.E.; VILELLA, S.; SCHETTINO, T. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. Aquat. Toxicol., v. 48, 561-571, 2000.
- LIU, H.; MA, L.; ZHAO, J.; LIU, J.; YAN, J.; RUAN, J.; HONG, F. Biochemical Toxicity of Nano-anatase TiO_2 Particles in Mice. Biol. Trace Elem. Res., v. 129, 170-180, 2009.
- MAZON, A.F.; CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. Environ. Res., v. 88, 52-63, 2002.
- MORON, S.E.; OBA, E.T.; ANDRADE, C.A.; FERNANDES, M.N. Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the Erythrinids *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*. J. Exp. Zool., v. 298, 93-104, 2003.
- MULLER, N.C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. Environ. Sci. Technol., v. 42, 4447-4453, 2008.
- ORONSAYE, J.A.O.; BRAFIELD, A.E. The effect of dissolved cadmium on the chloride cells of the gills of the Stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. J. Fish. Biol., v. 25, 253-258, 1984.
- PAULINO, M.G.; SAKURAGUI, M.M.; FERNANDES, M.N. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a Neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. Chemosphere, v. 86, 1-7, 2012.
- PELGROM, S.M.G.J.; LAMERS, L.P.M.; LOCK, R.A.C.; BALM, P.H.M.; WENDELAAR BONGA, S.E. Interactions between copper and cadmium modify metal organ distribution in mature tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Environ. Pollut., v. 90, 415-423, 1995.
- PERRY, S.F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. Annu. Rev. Physiol., v. 59, 325-347, 1997.
- PERRY, S.F.; SHAHSAVARANI, A.; GEORGALIS, T.; BAYAA, M.; FURIMSKY, M.; THOMAS, S.L.Y. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. J. Exp. Zool., v. 300a, 53-62, 2003.
- PRATAP, H.B.; WENDELAAR BONGA, S.E. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and Na^+/K^+ -ATPase activity in the gills of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. Aquat. Toxicol., v. 26, 133-150, 1993.

REIJNDERS, L. Hazards of TiO₂ and Amorphous SiO₂ Nanoparticles. In: KHAN, H.A.; ARIF, I.A. Toxic Effects of Nanomaterials. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2012. p. 85-96.

SATTIN, G.; MAGER, E.M.; GROSELL, M. Cytosolic carbonic anhydrase in the gulf toadfish is important for tolerance to hypersalinity. *Comp. Biochem. Physiol. A*, v. 156, 169-175, 2010.

SCOWN, T.M.; VAN 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. *Toxicol. Sci.*, v. 109, 372-380, 2009.

VITALE, A.M.; MONSERRAT, J.M.; CASTILHO, P.; RODRIGUEZ, E.M. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C*, v. 122, 121-129, 1999.

WANG, J.; ZHOU, G.; CHEN, C.; YU, H.; WANG, T.; MA, Y.; JIA, G.; GAO, Y.; LI, B.; SUN, J.; LI, Y.; JIAO, F.; ZHAO, Y.; CHAI, Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Lett.*, v. 168, 176-185, 2007.

WENDELAAR BONGA, S.E.; LOCK, R.A.C. The osmoregulatory system. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. The toxicology of fishes. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 401-415.

WENDELAAR BONGA, S.E.; VAN DER MEJI, C.J.M. Degeneration and death, by apoptosis and necrosis, of the pavement and chloride cells in the gills of the teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Cell Tissue Res.*, v. 255, 235-243, 1989.

XIONG, D.W.; FANG, T.; YU, L.P.; SIMA, X.F.; ZHU, W.T. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci. Total Environ.*, v. 409, 1444-1452, 2011.

ZHU, X.S.; WANG, J.X.; ZHANG, X.Z.; CHANG, Y.; CHEN, Y.S. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from *Daphnia* to zebrafish in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere*, v. 79, 928-933, 2010.

CAPÍTULO 4

Respostas antioxidantes e alterações histopatológicas no fígado do peixe Neotropical *Prochilodus lineatus* após exposição aguda e subcrônica a nanopartículas de dióxido de titânio

RESUMO

A toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂) foi investigada no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos a NP-TiO₂ com ênfase em possíveis danos hepáticos oxidativos e morfológicos. Juvenis *P. lineatus* foram expostos a 0, 0,5; 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ durante 48 h (exposição aguda) e 14 d (exposição subcrônica). No fígado, a exposição aguda a NP-TiO₂ não alterou a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona-S-transferase (GST), e os níveis de metalotioneína e lipoperoxidação (LPO), mas diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumentou o conteúdo de GSH. Após exposição subcrônica a NP-TiO₂, a produção de ERO, a atividade da enzima CAT e os níveis de metalotioneína e LPO não foram alterados, mas a atividade da SOD diminuiu enquanto a atividade da GST e os níveis de GSH aumentaram. Desarranjo dos cordões hepáticos e alterações morfológicas degenerativas como ausência de núcleo e nucléolo, degeneração celular e necrose em casos mais severos, foram encontrados após exposição a NP-TiO₂. A GSH demonstrou ter um papel essencial na manutenção do equilíbrio redox no fígado prevenindo a lipoperoxidação após exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂. No entanto, as NP-TiO₂ podem prejudicar as funções hepáticas nas concentrações estudadas uma vez que a porção do tecido funcional foi reduzida devido aos danos degenerativos.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes. Glutaciona. Metalotioneína. Hepatócitos.

Introdução

As nanopartículas de dióxido de titânio (NP-TiO₂) apresentam grande área de superfície de contato, maior reatividade, condutividade e absorção (MASCANGIOLI e ZHANG, 2003). Essas propriedades permitem que elas sejam utilizadas na indústria para produção de bens comuns como cosméticos, produtos de higiene pessoal, filtros, corante para alimentos e tintas, liberação de medicamentos, sensores para fotocatalise e eletroeletrônicos (MULLER e NOWACK, 2008). Apesar das aplicações promissoras das NP-TiO₂, ainda é dada pouca atenção ao impacto dessas nanopartículas no ambiente, que são descartadas sem tratamento por falta de regulamentação específica. As NP-TiO₂ tendem a se aglomerar e agregar na água e podem interagir com a matéria orgânica em suspensão afetando principalmente organismos filtradores e detritívoros como o curimba, *Prochilodus lineatus* (OBERDORSTER et al., 2005; CLEMENTE et al., 2012).

Xenobióticos como as NP-TiO₂, após serem absorvidos por organismos aquáticos, podem afetar seu metabolismo celular, levando a uma disfunção bioquímica e, conseqüentemente a uma disfunção fisiológica. Essas disfunções podem resultar em adaptações bioquímicas que, dependendo do tempo de exposição à NP, podem levar a alterações morfológicas (SCHLENK et al., 2008). Por serem compostas de titânio, um metal de transição, as NP-TiO₂ podem causar desequilíbrio redox por meio de um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), ou por inibição da produção ou inativação de componentes do sistema de defesa antioxidante (HERMES-LIMA, 2004). Essas disfunções podem resultar em reorganização do aparato antioxidante para manter a homeostase do organismo, e podem resultar também em respostas morfológicas para impedir a absorção de mais NP-TiO₂ no organismo. Além disso, a exposição a NP-TiO₂ podem causar danos no tecido hepático como a presença de células desordenadas, núcleos apoptóticos e focos com acúmulo de lipídeos (FEDERICI et al., 2007; HAO et al., 2009).

O fígado é considerado um órgão-alvo de xenobióticos principalmente por ser responsável pelo metabolismo dos xenobióticos que são transportados pelo sangue. No tecido hepático, a NP pode causar desequilíbrio redox, com conseqüentes alterações bioquímicas como ativação/produção das enzimas do aparato antioxidante. Em teleósteos de água doce, por exemplo, pode haver redução no conteúdo de glutathiona reduzida e inibição das enzimas SOD e CAT após exposição subcrônica a NP-TiO₂ (FEDERICI et al., 2007; HAO et al., 2009).

Desta forma este estudo teve como objetivo investigar o efeito das NP-TiO₂ no fígado de *Prochilodus lineatus* testando as seguintes hipóteses: 1) As NP-TiO₂ podem causar o

aumento da produção de ERO, que por sua vez vão gerar respostas antioxidantes no fígado para manter o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes; 2) Danos morfológicos no tecido hepático são causados pela exposição a NP-TiO₂.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais

Jovens de *P. lineatus* (massa corpórea: $31,06 \pm 0,39$ g, comprimento total: $14,38 \pm 0,06$ cm) obtidos da Estação de Aquicultura da Usina Hidroelétrica de Furnas, São José da Barra, MG, Brasil, foram aclimatados durante dois meses em tanques de 1000 L com água corrente, sem cloro e aeração constante. Os animais foram alimentados “*ad libitum*” com ração comercial para peixes (FRI-ACQUA 40, Fri-Ribe Rações, 40 % de proteína). As variáveis físicas e químicas da água (temperatura: 22,49-26,34 °C, oxigênio dissolvido: 6,19-7,82 mg L⁻¹, pH: 6,31-7,73, condutividade: 40-58 μS cm⁻³, alcalinidade: 35-43 mg L⁻¹ como CaCO₃ e dureza total: 39-50 mg L⁻¹ como CaCO₃) foram monitoradas e se mantiveram constantes durante o período de aclimação e dos ensaios de toxicidade.

2.2 Exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂

Posteriormente, *P. lineatus* foram expostos a 0 (grupo controle), 0,5; 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ (Concentração nominal: 0, 1, 5, 10 e 50 mg L⁻¹ de NP-TiO₂) durante 48 h (exposição aguda) e 14 dias (exposição subcrônica). Essas foram as concentrações a que algumas espécies mostraram sensibilidade em outros trabalhos (FEDERICI et al., 2007; HALL et al., 2009; HAO et al., 2009; XIONG et al., 2011) uma vez que a CL50 das NP-TiO₂ em *P. lineatus* foi maior que 100 mg L⁻¹. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em cinco aquários, em duplicata (n=10 peixes/tanque 200 L), em sistema semi-estático com renovação de 80% da água com NP-TiO₂ a cada 24h. Durante a exposição subcrônica os animais foram alimentados a cada três dias imediatamente antes da renovação da água dos aquários.

Após o período de exposição aguda e subcrônica às NP-TiO₂, os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹), e em seguida, foram pesados, medidos e sacrificados via secção medular. Amostras de fígado foram coletadas e armazenadas a -80°C para análises bioquímicas e/ou fixadas em glutaraldeído 2,5% com tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,3 para análises morfofuncionais. Um total de 12 animais por grupo de exposição foi utilizado para as análises bioquímicas e 8 animais para análises morfológicas e da concentração de titânio tecidual. A realização dos experimentos foi aprovada pelo Comitê de Ético Animal (Protocolo n° 027/2011) e Comitê de Ética Ambiental (Protocolo n° 002/2011) da UFSCAR.

2.3 Concentração de titânio

Amostras de tecido foram secas a 60 °C até peso constante e então foram digeridas a 60°C durante 48h em ácido nítrico (HNO₃) concentrado (Ultrapur- Merck, 69%) na proporção 1:5 (mg de tecido: µL HNO₃) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na proporção 1:8 (H₂O₂: HNO₃). Após a digestão as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 g e o sobrenadante foi usado para análise. A concentração de titânio nas amostras foi lida em espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite acoplado (AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA) no Laboratório de Ecofisiologia Animal da Universidade Estadual de Londrina.

2.4 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram feitas utilizando leitora de microplaca (SpectraMax[®] M5 Multi-Mode, Molecular Devices, USA) e a determinação da concentração de proteína tecidual (mg mL⁻¹) para a expressão da atividade das enzimas foi determinada utilizando kit comercial Micropote Pirogalol da Doles[®] (Doles Reagentes, Goiânia, Brasil).

As ERO (diclorofluoresceína mg proteína⁻¹) foram determinadas quantificando a conversão do reagente 2,7-diacetato de diclorofluoresceína para 2,7-diclorofluoresceína fluorescente, com excitação/emissão a 370/445 nm (VIARENGO et al., 1999) no mesmo dia da coleta. A atividade da SOD (U SOD min⁻¹ mg proteína⁻¹) foi determinada a $\lambda = 550$ nm pela inibição da taxa de redução do citocromo C pelo radical superóxido (MCCORD e FRIDOVICH, 1969), a da CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ metabolizado min⁻¹ mg proteína⁻¹) foi mensurada pelo decaimento da concentração de H₂O₂ a $\lambda = 240$ nm (BEUTLER, 1975), a da GPx (nmol NADPH min⁻¹ mg proteína⁻¹) foi determinada pela oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) em presença de t-butyl e leitura a $\lambda = 340$ nm (BEUTLER, 1984); a da glutathione-S-transferase (GST; nmol CDNB min⁻¹ mg proteína⁻¹) foi mensurada utilizando como substrato o reagente 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e leitura a $\lambda = 340$ nm (HABIG et al., 1974). Os níveis de GSH (nmol GSH mg proteína⁻¹) foram medidos com base na reação do 2,3 naftalenedicarboxialdeído (NDA) com a GSH formando um composto fluorescente com excitação/emissão a 472/528 nm (WHITE et al., 2003) e os níveis de peroxidação lipídica (LPO; μM hidroperóxido de cumeno (CHP) mg proteína⁻¹) foram determinados após a oxidação de Fe⁺² (Ferro reduzido) a Fe⁺³ (Ferro oxidado), na presença do reagente alaranjado xilenol (Ferrous Oxidation- Xylenol Orange- FOX) formando Fe⁺³-xilenol com absorvância em $\lambda = 560$ nm (JIANG et al., 1991). A concentração de metalotioneína (ng MT mg Pt⁻¹) foi determinada pela concentração de grupamentos sulfidrilas

(VIARENGO et al., 1997), utilizando o reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico, DTNB) com leitura em 412 nm.

2.5 Histopatologia hepática

Amostras de fígado fixadas em glutaraldeído 2,5%, com tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,3 foram desidratadas em séries crescentes de etanol, incluídas em historesina (Historesin, LEICA, Alemanha) e secções histológicas (3 µm espessura) foram efetuadas em micrótomo (MICROM HM 360, MICROM International GmbH). As secções histológicas do fígado foram coradas com azul de toluidina e fucsina básica para análise em microscópio de luz (BX 51, Olympus, Denmark). As alterações histopatológicas (em 20 campos aleatórios) foram quantificadas e os Índices de Alteração Histológica (IAH) foram calculados. O IAH foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $IAH = 10^0 \cdot \Sigma I + 10^1 \cdot \Sigma II + 10^2 \cdot \Sigma III$, onde ΣI , ΣII , ΣIII referem-se ao somatório total de alterações para os estágios I, II e III, respectivamente (Estágio I: lesões não muito severas e que não afetam o funcionamento do órgão, reversíveis e pontuais; Estágio II: lesões moderadamente severas e que podem afetar o funcionamento do órgão, podem ser ou não irreversíveis, mas, geralmente são pontuais; e Estágio III: lesões muito severas e irreversíveis cujo funcionamento do órgão fica muito alterado) e os fatores potenciais (10^0 , 10^1 e 10^2) referem-se à severidade da lesão (POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

O índice obtido para cada peixe foi usado para calcular o índice médio para cada tratamento (controle e grupos expostos ao NP-TiO₂). O IAH foi classificado em quatro categorias (1-10= funcionamento normal do órgão; 11-20= danos leves a moderado; 21-50= alterações moderadas a severas no órgão; 51-100= alterações severas no órgão; e >100= danos irreparáveis no órgão), e a severidade dos danos no tecido branquial foi comparada entre os grupos.

2.6 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Após o teste de normalidade, homogeneidade de variância e linearidade, aplicou-se o teste paramétrico Análise de Variância (ANOVA) de uma via ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. No caso em que diferenças significativas foram detectadas no teste de ANOVA, o teste de Dunnett foi aplicado para verificar onde ocorreram as diferenças. Todos os testes foram efetuados com nível de significância de 0,05 usando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft, Estados Unidos).

3. Resultados

3.1 Concentração de titânio tecidual

A concentração de titânio nas amostras é apresentada na Tabela 1. A concentração de titânio aumentou significativamente ($p < 0,05$) em fígados de animais expostos a $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO₂ após 14 dias de exposição.

Tabela 1 - Concentração de titânio no fígado de *Prochilodus lineatus* exposto a NP-TiO₂ por 14 dias

Tratamento	$\mu\text{g Ti g}^{-1}$
Controle	$0,14 \pm 0,02$
$0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO ₂	$0,34 \pm 0,06$
$1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO ₂	$0,53 \pm 0,09$
$3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO ₂	$0,58 \pm 0,10$
$15,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO ₂	$1,49 \pm 0,35$ *

Dados são média \pm EPM. Controle= ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO₂). * representam diferença significativa entre cada tratamento e seu respectivo grupo controle. Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

3.2 Respostas antioxidantes

Não ocorreu mortalidade de peixes durante os experimentos realizados. A exposição aguda (48 h) a $1,5$; $3,0$ e $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO₂ causou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na produção de ERO e um aumento significativo ($p < 0,05$) no conteúdo de GSH em relação ao grupo controle (Fig. 1). Entretanto, as NP-TiO₂ não alteraram significativamente ($p > 0,05$) a atividade da enzima de biotransformação (GST), enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) e os níveis de GSH, metalotioneína e LPO no fígado após exposição aguda (Fig. 1).

A exposição subcrônica (14 dias) a NP-TiO₂ não alterou significativamente ($p > 0,05$) a produção de ERO, assim como a atividade da CAT e os níveis de metalotioneína e LPO no fígado em todos os tratamentos testados (Fig. 1). No entanto, após exposição subcrônica a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-TiO₂ a atividade da GST aumentou significativamente ($p < 0,05$) enquanto a atividade da SOD e da GPx diminuíram significativamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Fig. 1). Para o tratamento com maior concentração de NP-TiO₂ ($15,0 \text{ mg L}^{-1}$) a atividade da SOD diminuiu significativamente ($p < 0,05$) enquanto a atividade da GST e o conteúdo de GSH aumentaram significativamente ($p < 0,05$).

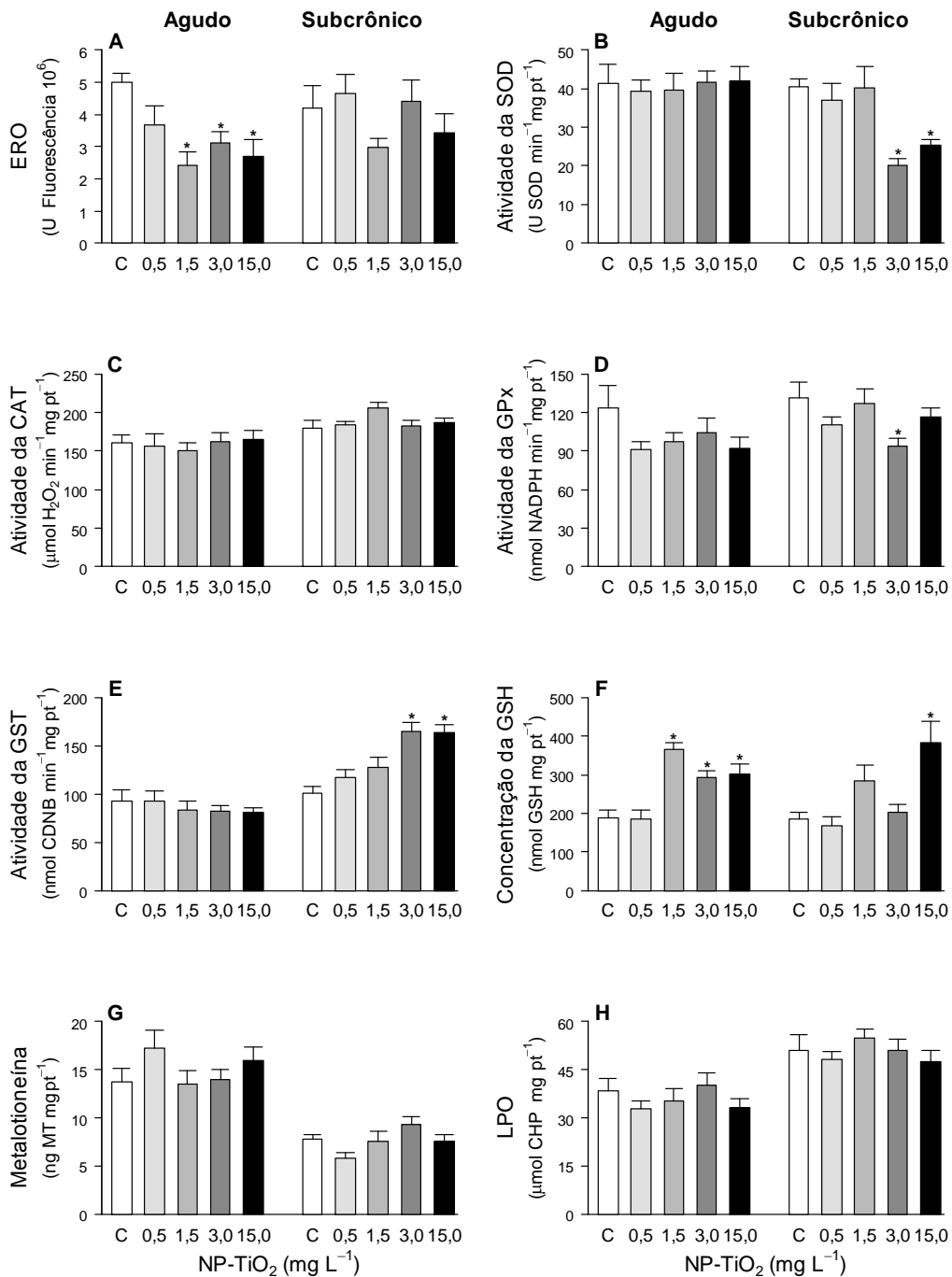


Fig. 1 - Espécies reativas de oxigênio, (ERO) (A); atividade da superóxido dismutase (SOD) (B), catalase (CAT) (C), glutaciona peroxidase (GPx) (D) e glutaciona S-transferase (GST) (E); conteúdo de glutaciona (GSH) (F), conteúdo de metalotioneína (G) e níveis de peroxidação lipídica e (LPO) (G) no fígado de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO₂. C= Controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂), U = unidade, pt= proteína. Dados são media ± E.P.M. * Indicam diferenças significantes do respectivo grupo controle (agudo ou subcrônico) (ANOVA, p <0.05); Kruskal-Wallis foi aplicado para SOD na exposição subcrônica (p <0.05).

3.3 Histopatologia hepática

A Fig. 2 mostra a morfologia do fígado do grupo controle (Fig 2A) e as histopatologias hepáticas mais frequentes encontradas em *P. lineatus* expostos a NP-TiO₂ (Fig. 2B a 2F).

A frequência das alterações histopatológicas é mostrada na Tabela 2. A exposição aguda a NP-TiO₂ causou uma baixa frequência de patologias no tecido hepático em todos os estágios de severidade. Patologias (estágio I) como desarranjo dos cordões hepáticos ocorreram em todas as concentrações de NP-TiO₂ a que os animais foram submetidos, sendo encontradas também células com núcleo periférico nos animais expostos a $\geq 1,5$ mg L⁻¹ de NP-TiO₂ e deformação no contorno celular nos peixes exposta a 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂. Histopatologias classificadas no estágio II como ausência de núcleo ocorreram em todos os tratamentos com NP-TiO₂ sendo acompanhado por degeneração citoplasmática nos peixes expostos a 1,5 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂. Necrose, histopatologia classificada no estágio III, ocorreu em alguns animais expostos a 3,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂. Após exposição subcrônica, as NP-TiO₂ também causaram desarranjo nos cordões hepáticos em concentrações $\geq 1,5$ mg L⁻¹ de NP-TiO₂. Patologias de estágio II como degeneração nuclear ocorreram em peixes expostos a 3,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂, ausência de núcleo ocorreram em animais expostos a 0,5 e 3,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ e ausência de nucléolo em animais expostos a 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂. Necrose também foi observada após exposição subcrônica a 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂.

O IAH calculado para os fígados de *P. lineatus* analisados após exposição aguda a NP-TiO₂ foi significativamente maior ($p < 0,05$) que o controle (IAH= $17,88 \pm 2,64$) para 1,5; 3,0 e 15,0 mg L⁻¹ NP-TiO₂ e estiveram entre 21 e 50 para todos os tratamentos, o que indica alterações moderadas a severas no órgão (Fig. 3). Após 14 dias de exposição não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) do IAH dos animais expostos a NP-TiO₂ quando comparados ao grupo controle (IAH= $21,38 \pm 4,42$) (Fig. 3).

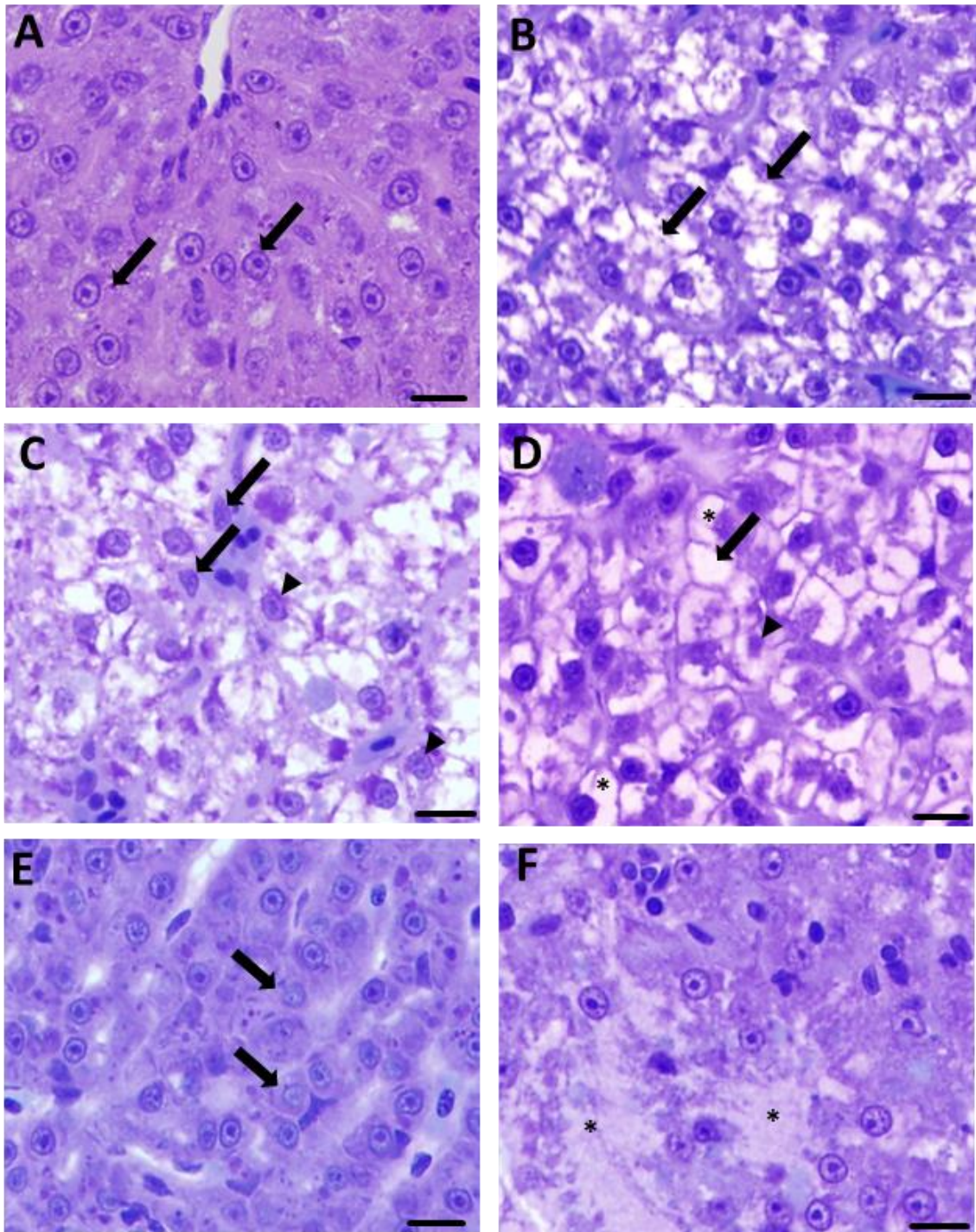


Fig. 2 - Fígado de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de NP-TiO₂. (A) Grupo controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂), aspecto normal da morfologia do fígado, hepatócitos em arranjo cordonal (seta); (B-F) Alterações histopatológicas em fígados de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de NP-TiO₂: (B) Deformação no contorno celular (seta); (C) Deformação no contorno nuclear (seta), Núcleo na periferia da célula (ponta de seta) e desarranjo dos cordões hepáticos; (D) Ausência de núcleo (seta preta), Degeneração nuclear (ponta de seta), Degeneração citoplasmática (asterisco); (E) Ausência de nucléolo (seta); (F) Necrose focal (asterisco). Barra de escala: 20 μm.

Tabela 2 - Alterações histopatológicas em fígado de *Prochilodus lineatus* expostos NP-TiO₂

Alteração	E	C	NP-TiO ₂ (mg L ⁻¹)			
			0,5	1,5	3,0	15,0
Exposição Aguda (48 horas)						
Hipertrofia nuclear	I	0	0+	0	0	0
Atrofia nuclear	I	0	0	0	0	0
Hipertrofia celular	I	0	0+	0	0+	0+
Deformação no contorno nuclear	I	0	0	0+	0+	0+
Deformação no contorno celular	I	0+	0+	0+	+	+
Núcleo na periferia da célula	I	0+	0+	+	+	+
Desarranjo dos cordões hepáticos	I	0+	+	+	+	+
Agregados de melanomacrófagos	I	0+	0+	0+	0+	0+
Vacuolizações citoplasmáticas	I	0+	0+	0	0+	0+
Aumento no calibre dos vasos	I	0+	0	0+	0+	0+
Aumento na frequência dos vasos	I	0	0	0+	0+	0+
Grânulos eosinófilos	I	+	+	+	+	+
Degeneração citoplasmática	II	0+	0+	+	0+	+
Degeneração nuclear	II	+	+	+	+	+
Ausência de núcleo	II	0+	+	+	+	+
Ausência de nucléolo	II	0+	0+	0+	0+	0+
Ruptura dos vasos	II	0	0	0	0+	0
Congestão	II	0+	0+	0+	0+	0+
Núcleos picnóticos	II	0	0+	0	0	0
Necrose	III	0	0	0+	+	0+
Exposição Subcrônica (14 dias)						
Hipertrofia nuclear	I	0	0+	0	0	0
Atrofia nuclear	I	0	0	0	0	0+
Hipertrofia celular	I	0	0	0+	0	0+
Deformação no contorno nuclear	I	0+	0+	0+	0+	0+
Deformação no contorno celular	I	0+	0+	0+	0+	0+
Núcleo na periferia da célula	I	0+	0+	0+	0+	0+
Desarranjo dos cordões hepáticos	I	0+	0+	+	+	+
Agregados de melanomacrófagos	I	0+	0+	0+	0+	0+
Vacuolizações citoplasmáticas	I	0+	0+	0+	0+	0+
Aumento no calibre dos vasos	I	0+	0+	0+	0+	0+
Aumento na frequência dos vasos	I	0+	0	0	0	0
Grânulos eosinófilos	I	+	+	+	+	+
Degeneração citoplasmática	II	+	+	+	+	+
Degeneração nuclear	II	+	+	+	++	+
Ausência de núcleo	II	0+	+	0+	+	0+
Ausência de nucléolo	II	0+	0+	+	+	0+
Ruptura dos vasos	II	0	0	0	0+	0
Congestão	II	0+	0+	0+	0+	0+
Núcleos picnóticos	II	0	0	0	0	0
Necrose	III	0	0	0+	+	+

E= estágio, C= Controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂). 0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente. Método de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994).

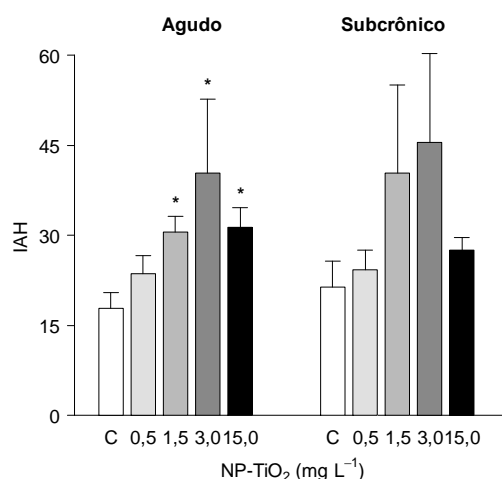


Fig. 3 - Índice de alteração histopatológica (IAH) em fígados de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda (48 horas) e subcrônica (14 dias) a NP-TiO₂. C= Controle (0,0 mg L⁻¹ de NP-TiO₂). * Indicam diferença significativa entre cada tratamento e seu controle, Kruskal-Wallis (p < 0,05).

4 Discussão

4.1 Estresse oxidativo

Por ser um metal de transição, o titânio pode, através das reações de Fenton e Haber-Weiss, acelerar a produção do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), que embora tenha meia-vida curta, na escala de nanosegundos, é umas das ERO mais reativas e deletérias ao organismo (ERCAL et al., 2001; HERMES-LIMA, 2004; HENKEL, 2011). No entanto, os peixes possuem um sistema antioxidante bem desenvolvido e eficiente, semelhante ao de mamíferos, que atua sequestrando as ERO e que, assim, contrabalança a ação desses radicais evitando danos celulares (PANDEY et al., 2003). Esse sistema de defesa antioxidante age individualmente ou de forma conjunta para eliminar as ERO e prevenir eventuais danos celulares, mantendo assim o equilíbrio redox.

Como a produção de ERO neste estudo diminuiu enquanto era esperado um aumento após a exposição às NP-TiO₂, pode-se concluir que o sistema de defesa foi ativado através do aumento da produção de GSH prevenindo a lipoperoxidação. Desta forma, a GSH provavelmente foi o principal meio de controle antioxidante do organismo uma vez que não ocorreu indução da atividade das enzimas e compostos antioxidantes estudados. A GSH, além de importante cofator para a GPx e GST, tem um papel de antioxidante não enzimático e pode reagir com várias espécies reativas, entre elas o radical $\cdot\text{OH}$ (DI GIULIO e MEYER, 2008). A GSH é um tripeptídeo hidrossolúvel considerado como um tiol celular essencial para o organismo, participando nas reações de potencial redox e formação de tioéter. O principal

aminoácido constituinte da GSH é a cisteína, cujo grupo tiol é a porção ativa de reações antioxidantes (SIES, 1999). Os metais possuem afinidade pelos grupos sulfidrilas de proteínas e moléculas, como a GSH, ligando-se a esses grupos por meio de ligações covalentes (QUIG, 1998). Muitos estudos evidenciaram o aumento nos níveis de GSH em animais após exposição a compostos tóxicos, o que indica o seu envolvimento na remoção de produtos metabolizados ou de metais como forma de proteção do organismo contra a ocorrência de estresse oxidativo (OTTO e MOON, 1995; REGOLI e PRINCIPATO, 1995; ZHANG et al., 2004). Assim como nas brânquias (capítulo 2), o aumento dos níveis de GSH no fígado parece ter atuado como principal meio de manutenção do equilíbrio redox, prevenido a lipoperoxidação nos animais expostos a NP-TiO₂ por 48 h neste estudo.

A inibição enzimática por metais em peixes já é conhecida (GARCEAU et al., 2010) e o titânio das nanopartículas pode se dissociar em cátions que provavelmente competem com cofatores enzimáticos (íons) pelo sítio alostérico da SOD causando sua inibição (DONALDSON, 1991; ERCAL et al., 2001). Em *Danio rerio* e *Cyprinus carpio* a SOD também foi inibida após exposição a NP-TiO₂ no fígado em exposição subcrônica a NP-TiO₂ (HAO et al., 2009; XIONG et al., 2011). Da mesma forma, o íon titânio também poderia competir com os íons de selênio pelo sítio alostérico da GPx, como é descrito para outros metais como o chumbo (ERCAL et al., 2001).

O aumento da atividade da GST pode ter sido devido ao processo de biotransformação das nanopartículas conjugando-as com a GSH e formando composto menos tóxicos ao organismo, ou ainda realizando a metabolização de lipoperóxido formados pela reação de Fenton, o que controla os níveis de lipoperoxidação. Em peixes, a GST é conhecida por metabolizar xenobióticos, como os metais, e produtos da lipoperoxidação em compostos menos tóxicos, evidenciando seu importante papel na defesa do organismo contra danos oxidativos (MODESTO e MARTINEZ, 2010; MONTEIRO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2013). Como a molécula da GST é muito mais complexa que o tripeptídeo GSH, provavelmente a GST demora mais tempo para ser expressa e sua atividade aumentou apenas após a exposição subcrônica. Portanto, a exposição de *P. lineatus* a NP-TiO₂ não causou distúrbios oxidativos em seu organismo por meio do controle da produção de ERO, evitando interação das NP com os componentes celulares através do aumento dos níveis de GSH após exposição aguda e do aumento da atividade da GST e do conteúdo de GSH após exposição subcrônica.

4.2 Histopatologia hepática

Além do papel de síntese, metabolização e redistribuição de compostos endógenos, tais como proteínas e outras moléculas essenciais, no armazenamento de compostos essenciais como vitaminas e glicogênio, na função imunológica e na produção e secreção da bile, o fígado é um órgão com importante função na biotransformação de xenobióticos transportados pela corrente sanguínea através de sua inativação e excreção (EVANS, 1993; HINTON et al., 2008). O órgão é constituído principalmente por hepatócitos, células ricas em enzimas antioxidantes e de biotransformação, além de canais e transportadores na membrana celular, que estão em contato direto com os sinusóides hepáticos fenestrados (HINTON et al., 2008). Esse contato direto facilita a troca entre sangue e hepatócitos como a entrada de xenobióticos no órgão, que serão metabolizados no interior dos hepatócitos e excretados.

Estudos de biodistribuição evidenciam que, em altas concentrações (50 mg kg^{-1}), as NP-TiO₂ são capazes de atingir a circulação sanguínea e ficarem retidas no fígado em mamíferos podendo induzir estresse oxidativo nos hepatócitos e comprometer a morfologia e viabilidade dos hepatócitos (MEENA e PAULRAJ, 2012; SHI et al., 2013). Em peixes, as NP-TiO₂ também causam distúrbios no sistema de defesa antioxidante do tecido hepático, mas não se sabe se as NP-TiO₂ ficam retidas no órgão na forma de aglomerados ou são metabolizadas totalmente (HAO et al., 2009; XIONG et al., 2011).

No presente estudo, alterações histopatológicas no tecido hepático incluem desarranjo dos cordões hepáticos, deslocamento do núcleo para a periferia da célula, deformação no contorno celular, ausência de núcleo, degeneração citoplasmática e necrose. Um aumento na intensidade metabólica ocorre para degradar as NP-TiO₂ hipertrofiando a célula e ocasionando o deslocamento do núcleo para a periferia da célula e posteriormente alterações morfológicas degenerativas. A acumulação de NP-TiO₂ no fígado observada neste estudo após exposição subcrônica evidencia que as NP são transportadas para o fígado pela corrente sanguínea e a desestruturação do arranjo cordonal dos hepatócitos permanece em exposição subcrônica, assim como as alterações morfológicas degenerativas como a completa degeneração dos componentes celulares e necrose focal. Esses resultados demonstram que as NP-TiO₂ podem prejudicar as funções hepáticas nas concentrações estudadas uma vez que a porção do tecido funcional foi reduzida.

Embora as NP-TiO₂ não tenham causado lipoperoxidação neste estudo, as NP se acumulam no tecido hepático e posteriormente podem causar danos nas membranas celulares dos hepatócitos resultando em alterações degenerativas, com consequente desarranjo dos cordões hepáticos e necrose, em casos mais severos. Células necróticas com núcleo

condensado e aparência de corpos apoptóticos no tecido hepático são comumente encontradas em peixes expostos a NP-TiO₂ e semimetais como cobre e zinco e associadas ao estresse oxidativo, sendo que o grau de comprometimento da função hepática é dependente da concentração de exposição (FEDERICI et al 2007; HAO et al. 2009; AL-BAIRUTY et al., 2013; BOYLE et al 2013; RAMSDEN et al., 2013).

5 Conclusões

Em conclusão, a GSH provavelmente foi o principal meio para manutenção do equilíbrio redox prevenindo a lipoperoxidação após exposição aguda e subcrônica a NP-TiO₂. Além disso, a GST parece estar envolvida no processo de desintoxicação das nanopartículas ou metabolização de lipoperóxido após exposição subcrônica. No entanto, as NP-TiO₂ podem prejudicar as funções hepáticas nas concentrações estudadas uma vez que a porção do tecido funcional foi reduzida devido aos danos degenerativos.

6 Agradecimentos

Este estudo foi realizado na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2011/10339-0) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia- Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq Proc. 573949/2008-5). Os autores são gratos à Estação de Aquicultura da Usina Hidroelétrica de Furnas, pelo fornecimento dos peixes e, aos doutores Cláudia Bueno dos Reis Martinez e Wagner Ezequiel Riso, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, pela ajuda na quantificação de titânio na água e tecidos estudados.

7 Referências

- AL-BAIRUTY, G.A.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D.; HENRY, T.B. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, v. 126, 104-115, 2013.
- BEUTLER, E. Red cell metabolism: A manual of biochemical methods. 2. ed. New York: Grune & Straton, 1975. 160 p.
- BOYLE, D.; AL-BAIRUTY, G.A.; HENRY, T.B.; HANDY, R.D. Critical comparison of intravenous injection of TiO₂ nanoparticles with waterborne and dietary exposures concludes minimal environmentally-relevant toxicity in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Environ. Pollution*, v. 182, 70-79, 2013.
- CLEMENTE, Z.; CASTRO, V.L.; JONSSON, C.M.; FRACETO, L.F. Ecotoxicology of nano-TiO₂, an evaluation of its toxicity to organisms of aquatic ecosystems. *Int. J. Environ. Res.*, v. 6, 33-50, 2012.
- DI GIULIO, R.T.; MEYER, J.N. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. The toxicology of fishes. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 273-324.
- DONALDSON, W.E. Interaction of dietary lead with fish oil and antioxidant in chicks. *Biol. Trace Elem. Res.*, v. 31, 215-222, 1991.
- ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress. Part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 1, 529-539, 2001.
- EVANS, D.H. The physiology of fish. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1993. 592 p.
- 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. *Aquat. Toxicol.*, v. 84, 415-430, 2007.
- GARCEAU, N.; PICHAUD, N.; COUTURE, P. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquat. Toxicol.*, v. 98, 107-112, 2010.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, v. 249, 7130-7139, 1974.
- HALL, S.; BRADLEY, T.; MOORE, J.T.; KUYKINDALL, T.; MINELLA, L. Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO₂ particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO₂ toxicity. *Nanotoxicol.*, v. 3, 91-97, 2009.
- HAO, L.H.; WANG, Z.Y.; XING, B.S. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *J. Environ. Sci.*, v. 21, 1459-1466, 2009.
- HENKEL, R.R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male

fertility. *Asian J. Androl.*, v. 13, 43-52, 2011.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radical. In: STOREY, K.B. *Functional metabolism: regulation and adaptation*. New York: John Wiley & Sons, 2004. p. 319-368.

HINTON, D.E.; SEGNER, H.; AU, D.W.T.; KULLMAN, S.W.H.; HARDMAN, R.C. Liver toxicity. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. *The toxicology of fishes*. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 327-400.

JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, v. 26, 853-856, 1991.

MASCIANGIOLI, T.; ZHANG, W.X. Environmental technologies at the nanoscale. *Environ. Sci. Technol.*, v. 37, 102-108, 2003.

MCCORD, J.E.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, v. 244, 6049-6055, 1969.

MEENA, R.; PAULRAJ, R. Oxidative stress mediated cytotoxicity of TiO_2 nano anatase in liver and kidney of Wistar rat. *Toxicol. Environ. Chem.*, v. 94, 146-163, 2012.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Roundup (R) causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, v. 78, 294-299, 2010.

MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829). *Ecotox.*, v. 19, 105-123, 2010.

MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Dietary intake of inorganic mercury: bioaccumulation and oxidative stress parameters in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotox.*, v. 22, 446-456, 2013.

MULLER, N.C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ. Sci. Technol.*, v. 42, 4447-4453, 2008.

OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.*, v. 113, 823-839, 2005.

Otto, D.M.; Moon, T.W. 3, 30, 4, 40-Tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 77, 281-287, 1995.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BINHAFEEZ, B.; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci. Total Environ.*, v. 309, 105-115, 2003.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: Fishing News Books, 1994. p. 339-352.

QUIG, D. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Alter. Med. Rev.*, v. 3, 262-270, 1998.

RAMSDEN, C.S.; HENRY, T.B.; HANDY, R.D. Sub-lethal effects of titanium dioxide nanoparticles on the physiology and reproduction of zebrafish. *Aquat. Toxicol.*, v. 126, 404-413, 2013.

REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory condition: implication for the use of biomarkers. *Aquat. Toxicol.*, v. 31, 143-164, 1995.

SCHLENK, D.; HANDY, R.; STEINERT, S.; DEPLEDGE, M.H.; BENSON, W. Biomarkers. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D. The toxicology of fishes. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 683-731.

SHI, H.; MAGAYE, R.; CASTRANOVA, V.; ZHAO, J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.*, v. 10-15, 2013.

SIES, H. Glutathione and its cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 27, 916-921, 1999.

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. *Mar. Environ. Res.*, v. 44, 69-84, 1997.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CAVALETTO, M.; MARCHI, B.; PANZANO, E.; BLASCO, J. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.*, v. 46, 1612-1619, 1999.

WHITE, C.C.; VIERNES, H.; KREJSA, C.M.; BOTTA, D.; KAVABAGG, D.T.J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal. Biochem.*, v. 318, 175-180, 2003.

XIONG, D.W.; FANG, T.; YU, L.P.; SIMA, X.F.; ZHU, W.T. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci. Total Environ.*, v. 409, 1444-1452, 2011.

ZHANG, J.; SHEN, H.; WANG, X.; WU, J.; XUE, Y. Effects of chronic exposure of 2, 4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, v. 55, 167-174, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso das NP-TiO₂ e sua consequente deposição no meio ambiente continuam exibindo um crescimento acelerado atualmente. Assim como para todos os compostos utilizados em larga escala, um estudo detalhado da toxicologia dos nanomateriais é necessário para tornar seu uso mais seguro para o meio ambiente. Uma das maiores dificuldades para os estudo das NP é a sua caracterização e sua interação com sistemas biológicos uma vez que elas se comportam de forma distinta de acordo com as variações do meio.

Embora as agências de regulamentação brasileiras ainda não tenham normas específicas para a utilização das NP, já é bastante comum encontrá-las em grande quantidade na composição de produtos industrializados. No entanto, o início dos estudos das interações das NP-TiO₂ com sistemas biológicos no Brasil é recente e seus resultados são pouco elucidativos. Neste estudo, a utilização de *P. lineatus*, espécie nativa da região Neotropical, foi importante para caracterizar o possível impacto das NP-TiO₂ em corpos d'água do Brasil considerando o seu aspecto ecológico e comercial.

As NP-TiO₂ não foram consideradas letais para *P. lineatus* uma vez que a CL50; 48h foi maior que 100 mg L⁻¹, limite de concentração estabelecido pela ABNT. No entanto, este estudo sugere que a exposição por períodos prolongados a altas concentrações das NP-TiO₂ podem representar perigo, pois se acumulam em diferentes tecidos do organismo e causam alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas em órgãos vitais desse peixe. Muitos estudos evidenciam o papel genotóxico das NP-TiO₂, o que não se observou em *P. lineatus*. No entanto, as NP-TiO₂ mostraram neurotoxicidade após exposição aguda além de distúrbios hematológicos em exposição crônica. Portanto, os animais podem sofrer alteração no desenvolvimento neuromotor com consequente vulnerabilidade a predadores e prejuízo de sua capacidade reprodutiva, além de dificuldade respiratória devido à deficiência no transporte de oxigênio. As NP-TiO₂ também parecem diminuir a imunidade de *P. Lineatus* afetando negativamente a produção ou manutenção das células de defesa. Esse efeito na imunidade reduz a capacidade do organismo de resistir a patógenos e outras enfermidades.

A análise da formação de ERO em tecidos de peixes após exposição a NP-TiO₂ foi inovadora nesta tese e ajudou a demonstrar o provável papel oxidante das NP-TiO₂ no organismo de *P. lineatus*. Nas concentrações estudadas, a GSH parece ser o principal meio de reestabelecimento do equilíbrio redox prevenindo a lipoperoxidação em brânquias e fígado. A GST também teve papel importante no fígado para prevenir a lipoperoxidação após exposição subcrônica através do processo de conjugação das nanopartículas ou metabolização de

lipoperóxido. Nos rins, a GSH também teve um papel importante prevenindo a liperoxidação, a qual ocorreu apenas na maior concentração em um curto período de exposição, mas o balanço oxidativo parece se restabelecer quando a exposição é mais longa.

Um aspecto notável desta tese foi a avaliação detalhada do efeito das NP-TiO₂ em biomarcadores com função de osmorregulação, tanto fisiológicos como morfológicos. As disfunções fisiológicas causadas pelas NP-TiO₂ e suas consequentes adaptações bioquímicas podem ter levado a adaptações morfológicas que impedem a absorção de mais NP-TiO₂ pelo organismo. No entanto, essas adaptações morfológicas, como alterações epiteliais no tecido branquial, podem levar a uma dificuldade respiratória e desequilíbrio osmótico e iônico. De fato, distúrbios osmorregulatórios ocorreram após exposição aguda, mas foram evitados após exposição subcrônica possivelmente devido a essas mudanças no tecido branquial. Além disso, a proliferação de novas CRMe ativas nos filamentos branquiais e CRM nos túbulos renais podem ter contribuído para a manutenção do equilíbrio osmótico e iônico. No fígado e nos rins, as disfunções bioquímicas resultaram em mudanças morfológicas degenerativas que acabaram prejudicando a função do órgão pela redução do tecido funcional.

Apesar das NP-TiO₂ não terem se mostrado altamente letais, elas podem prejudicar o organismo dos peixes uma vez que podem se acumular e danificar órgãos essenciais como brânquias, fígado, rins, músculo e cérebro. Adaptações bioquímicas e morfológicas permitiram a manutenção da homeostase do organismo neste estudo, mas podem implicar em alto custo metabólico para o indivíduo comprometendo a sua sobrevivência, saúde, crescimento e reprodução. Estudos adicionais devem ser realizados para determinar os efeitos tóxicos das NP-TiO₂ em longo prazo e utilizando diferentes condições ambientais de modo a se determinar a regulamentação de seu descarte em ambientes aquáticos.

REFERÊNCIAS GERAIS

AVISHAI, N.; RABINOWITZ, C.; MOISEEVA, E.; RINKEVICH, B. Genotoxicity of Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* cellular assay. *Mutat. Res.*, v. 518, 21-37, 2002.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat. Res.*, v. 467, 177-186, 2000.

BARTLING, D.; RADZIO, R.; STEINER, U.; WEILER, E.W. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. *Europ. J. Biochem.*, v. 216, 579-586, 1993.

BELPAEME, K.; DELBEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagen.*, v. 11, 485-492, 1996.

BOSSART, G.D.; DIERAUF, L.A. Clinical pathology. In: DIERAUF, L.A. Handbook of marine mammal medicine. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 383-436.

BRADBURY, S.P.; CARLSON, R.W.; HENRY, T.R.; PADILLA, S.; COWDEN, J. Toxic responses of the fish nervous system. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D. The toxicology of fishes. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 417-455.

BRUNETTI, R.; MAJONE, F.; GOLLA, I.; BELTRAME, C. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 44, 65-68, 1988.

CAMARGO, M.M.P.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.*, v. 94, 40-46, 2009.

CANESI, L.; FABBRI, R.; GALLO, G.; VALLOTTO, D.; MARCOMINI, A.; POJANA, G. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). *Aquat. Toxicol.*, v. 100, 168-177, 2010.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents. *Aquat. Toxicol.*, v. 74, 264-271, 2005.

CARP, O.; HUISMAN, C.L.; RELLER, A. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Prog. in Solid State Chem.*, v. 32 (1-2), 33-117, 2004.

CARVALHO, C.D.; FERNANDES, M.N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, v. 151, 437-442, 2008.

CERQUEIRA, C.C.; FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 52, 83-91, 2002.

CERRADA, M.L.; SERRANO, C.; SANCHEZ-CHAVES, M.; FERNANDEZ-GARCIA, M.; FERNANDEZ-MARTIN, F.; DE ANDRES, A.; RIOBOO, R.J.J.; KUBACKA, A.; FERRER, M. Self-sterilized EVOH-TiO₂ nanocomposites: Interface effects on biocidal properties. *Adv. Funct. Mater.*, v. 18, 1949-1960, 2008.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: MARKERT, B.A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H.G. *Bioindicators and Biomonitoring*. Oxford: Elsevier Science, 2003. p. 639-671.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V.L.; JONSSON, C.M.; FRACETO, L.F. Ecotoxicology of Nano-TiO₂, an evaluation of its toxicity to organisms of aquatic ecosystems. *Int. J. Environ. Res.*, v. 6, 33-50, 2012.

DE LA TORRE, F.R.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comp. Biochem. Physiol. C*, v. 131, 271-280, 2002.

DI GIULIO, R.T.; MEYER, J.N. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. *The toxicology of fishes*. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 273-324.

DUDLER, R.; HERTIG, C.; REBMANN, G.; BULL, J.; MAUCH, F. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v. 4, 14-18, 1991.

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

FADEEL, B.; PIETROIUSTI, A.; SHVEDOVA, A.A. *Adverse effects of engineered nanomaterials: exposure, toxicology, and impact on human health*. Waltham: Academic Press, 2012. 360 p.

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. *Aquat. Toxicol.*, v. 84, 415-430, 2007.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W.P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The human micronucleous project- an international collaborative study on the use of micronucleous technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.*, v. 428, 271-283, 1999.

FERNANDES, M.N.; MAZON, A.F. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L.; Kapoor, B.G. *Fish adaptations*. Enfield: Science Publishers, 2003. p. 203-231.

GALINDO, B.A.; TROILO, G.; COLUS, I.M.S.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genotoxic Effects of Aluminum on the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*. *Water Air Soil Pollut.*, v. 212, 419-428, 2010.

GERNHOFER, M.; PAWET, M.; SCHRAMM, M.; MÜLLER, E.; TRIEBSKORN, R. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery*, v. 8, 241-260, 2001.

GUPTA, S.M.; TRIPATHI, M. A review of TiO₂ nanoparticles. *Chin. Sci. Bull.*, v. 56, 1639-1657, 2011.

GWINN, M.R.; SOKULL-KLUTTGEN, B. Regulation and Legislation In: FADEEL, B.; PIETROIUSTI, A.; SHVEDOVA, A.A. Adverse effects of engineered nanomaterials: exposure, toxicology, and impact on human health. Waltham: Academic Press, 2012. p. 97-117.

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. *Ecotoxicol.*, v.17, 396-409, 2008.

HAO, L.H.; WANG, Z.Y.; XING, B.S. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *J. Environ. Sci.*, v. 21, 1459-1466, 2009.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagen.*, v. 18, 45-51, 2003.

HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 45, 51-88, 2005.

HAYNES, C.L. The emerging field of nanotoxicology. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 398, 587-588, 2010.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G.W.; SALAMON, M.F. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutat. Res. Genet. Tox.*, v. 123, 61-118, 1983.

HENKEL, R.R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J. Androl.*, v. 13, 43-52, 2011.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radical. In: STOREY, K.B. Functional metabolism: regulation and adaptation. New York: John Wiley & Sons, 2004. p. 319-368.

HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol. B*, v. 136, 593-620, 2003.

HYLLAND, K.; FEIST, S.; THAIN, J.; FÖRLIN, L. Molecular/cellular processes and the health of the individual. In: LAWRENCE, A.; HEMINGWAY, K. Effects of pollution on fish: molecular effects and population responses. Oxford: Blackwell Science, 2003. p. 134-178.

JÜRSS, K.; BASTROP, R. The function of mitochondria-rich cells (chloride cells) in teleost gills. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, v. 5, 235-255, 1995.

KEER, M.G. Exames laboratoriais em medicina veterinária. Bioquímica clínica e hematologia. São Paulo: Editora Roca, 2003. 436 p.

L'AZOU, B.; MARANO, F. Nanoparticle toxicity mechanisms: oxidative stress and inflammation. In: HOUDY, P.; LAHMANI, M.; MARANO, F. Nanoethics and nanotoxicology. Berlin: Springer, 2010. p. 87-119.

MALATO, S.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P.; MALDONADO, M.I.; BLANCO, J.; GERNJAK, W. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends. *Catal. Today*, v. 147, 1-59, 2009.

MASCIANGIOLI, T.; ZHANG, W.X. Environmental technologies at the nanoscale. *Environ. Sci. Technol.*, v. 37, 102-108, 2003.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.*, v. 399, 135-147, 1998.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Roundup (R) causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, v. 78, 294-299, 2010.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.*, v. 113, 823-839, 2005.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, v. 136, 291-298, 1984.

PERRY, S.F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 59, 325-347, 1997.

RAHMAN, Q.; LOHANI, M.; DOPP, E.; PEMSEL, H.; JONAS, L.; WEISS, D.G.; SCHIFFMANN, D. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ. Health Perspect.*, v. 110, 797-800, 2002.

RICHETTI, S.K.; ROSEMBERG, D.B.; VENTURA-LIMA, J.; MONSERRAT, J.M.; BOGO, M.R.; BONAN, C.D. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicol.*, v. 32, 116-122, 2011.

ROBICHAUD, C.O.; UYAR, A.E.; DARBY, M.R.; ZUCKER, L.G.; WIESNER, M.R. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment. *Environ. Sci. Technol.*, v. 43, 4227-4233, 2009.

SCHLENK, D.; HANDY, R.; STEINERT, S.; DEPLEDGE, M.H.; BENSON, W. Biomarkers. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D. *The toxicology of fishes*. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 683-731.

SCOWN, T.M.; VAN 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. *Toxicol. Sci.*, v. 109, 372-380, 2009.

SHI, H.; MAGAYE, R.; CASTRANOVA, V.; ZHAO, J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.*, 10-15, 2013.

SPRAGUE, J.B. Factors that modify toxicity. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. New York: Hemisphere, 1985. p. 124-163.

SUTARIYA, V.B.; PATHAK, V.; GROSHEV, A.; CHOUGULE, M.B.; NAIK, S.; PATEL, D.; PATHAK, Y. Introduction--Biointeractions of nanomaterials, challenges and solutions. In: SUTARIYA, V.B.; PATHAK, Y. *Biointeractions of nanomaterials*. Boca Raton: CRC Press, 2015. p. 1-48.

TAN, W.; CHEN, J.; ZHOU, X.; ZHANG, J.; LIN, Y.; LI, X.; XIAO, X. Preparation of nanocrystalline TiO₂ thin film at low temperature and its application in dye-sensitized solar cell. *J. Solid State Electrochem.*, v. 13, 651-656, 2009.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: Villimpress, 2004. 144p.

THERON, J.; WALKER, J.A.; CLOETE, T.E. Nanotechnology and water treatment: applications and emerging opportunities. *Crit. Rev. Microbiol.*, v. 34, 43-69, 2008.

VIGNARDI, C.P.; HASUE, F.M.; SARTÓRIO, P.V.; CARDOSO, C.M.; MACHADO, A.S.D.; PASSOS, M.J.A.C.R.; SANTOS, T.C.A.; NUCCI, J.M.; HEWER, T.L.R.; WATANABE, L.; GOMES, V.; PHAN, N.V. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). *Aquat. Toxicol.*, v. 158, 218-229, 2015.

WANG, J.; ZHOU, G.; CHEN, C.; YU, H.; WANG, T.; MA, Y.; JIA, G.; GAO, Y.; LI, B.; SUN, J.; LI, Y.; JIAO, F.; ZHAO, Y.; CHAI, Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Lett.*, v. 168, 176-185, 2007.

WENDELAAR BONGA, S.E.W.; LOCK, R.A.C. The osmoregulatory system. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D. *The toxicology of fishes*. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 401-415.

WINKLER, J. *Titanium dioxide*. Hannover: Vincentz Network, 2003. 130 p.