

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Exposição aguda e subcrônica ao níquel em peixe-zebra
(*Danio rerio*): avaliação de parâmetros morfológicos e comportamentais

DÉBORA DREHER NABINGER

PORTO ALEGRE, 2017

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Exposição aguda e subcrônica ao níquel em peixe-zebra
(*Danio rerio*): avaliação de parâmetros morfológicos e comportamentais**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular
como requisito para obtenção
do título de Mestre

DÉBORA DREHER NABINGER

Orientadora: Profa. Dra. Carla Denise Bonan

PORTO ALEGRE, 2017

Ficha Catalográfica

N116e Nabinger, Débora Dreher

Exposição aguda e subcrônica ao níquel em peixe-zebra (*Danio rerio*) : avaliação de parâmetros morfológicos e comportamentais / Débora Dreher Nabinger . – 2017.

86 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Denise Bonan.

1. Cognição. 2. Desenvolvimento. 3. Locomoção. 4. Níquel. 5. Peixe-zebra. I. Bonan, Carla Denise. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, ao Instituto de Toxicologia e Farmacologia e ao Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso pelas instalações e disponibilidade de equipamentos.

A minha orientadora, Dra. Carla Denise Bonan, pela confiança, tempo dedicado, orientação no trabalho e pelos ensinamentos profissionais.

A todos os colegas de laboratório, obrigada pela gentil acolhida. Em especial, agradeço a Stefani Altenhofen, Paula Bitencourt e Laura Nery. A parceria nos experimentos e conhecimento de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho. E também a Natália Eltz, Camila Miguel, Luiza Nazário, Fabiano Peres e Bruno Giacobbo que juntamente com as gurias contribuíram para o trabalho com discussões científicas e pelas maravilhosas horas de lazer.

E principalmente aos meus pais, Legario Guilherme Nabinger e Magda Dreher Nabinger, a minha irmã, Augusta Dreher Nabinger e ao meu namorado, Daniel Simon, que estiveram sempre comigo, me dando forças, afeto e carinho e me ajudando nos momentos que mais precisei. Tenho a vocês uma eterna gratidão. Muito obrigado!

RESUMO

Metais são algumas das substâncias mais tóxicas de grande preocupação ambiental. O níquel é um destes agentes, sendo que este metal pesado é naturalmente presente na crosta terrestre. Entretanto, níveis excessivos de níquel levam à contaminação ambiental e podem causar sérios e irreversíveis problemas de saúde. O presente estudo visa avaliar os efeitos tóxicos da exposição aguda e subcrônica ao níquel, em peixe-zebra (*Danio rerio*), no estágio larval e adulto. Os animais foram expostos a quatro diferentes concentrações (0,025, 2, 5 e 15 mg/L NiCl₂) ou água (grupo controle) e submetidos a dois tratamentos: agudo e subcrônico. As larvas foram expostas por 2 horas (tratamento agudo: larvas de 5 dias pós-fertilização - dpf - tratadas por 2 horas) ou 11 dias (tratamento subcrônico: larvas tratadas do momento da fertilização até 11 dpf). Os animais adultos foram expostos por 12 horas (tratamento agudo) ou 96 horas (tratamento subcrônico). Nos dois tratamentos, larvas e adultos expostos apresentaram um aumento dependente da concentração nos níveis de NiCl₂, comparados com animais do grupo controle. A taxa de sobrevivência das larvas e embriões não foi alterada pelos tratamentos. Entretanto, atraso na eclosão dos ovos, diminuição dos batimentos cardíacos e alterações morfológicas (diminuição do comprimento corporal e área ocular aos 5 e 8 dpf) foram observados em animais tratados subcronicamente. O comportamento aversivo e exploratório não mostrou diferenças significativas entre as concentrações de NiCl₂, no tratamento agudo. Diferentemente, larvas subcronicamente tratadas, analisadas aos 5 dpf, apresentaram diferenças no comportamento exploratório, exibindo diminuição na distância percorrida e na velocidade média, na concentração de 0,025 mg/L, enquanto houve um aumento dos mesmos parâmetros em altas concentrações (5 e 15 mg/L). Ao longo dos 11 dias de tratamento, o comportamento exploratório diminuiu significativamente, na concentração de 15 mg/L, aos 8 e 11 dpf. Além disso, larvas submetidas ao tratamento subcrônico com altas concentrações de NiCl₂ (2, 5 e 15 mg/L) apresentaram comprometimento no comportamento aversivo. Em animais adultos, o tratamento agudo não promoveu alterações na atividade locomotora. Por outro lado, animais expostos à concentração de 15 mg/L no tratamento subcrônico demonstraram efeito ansiogênico. A interação social não foi alterada pelos tratamentos. Entretanto, a exposição ao NiCl₂ levou a

uma diminuição do comportamento agressivo (tratamento subcrônico) e comprometimento de memória (tratamento agudo e subcrônico), em todas as concentrações testadas, quando comparados ao grupo controle. No sentido de avaliar se a exposição ao níquel produziu alterações no sistema hematológico, avaliamos diferentes células leucocitárias em animais adultos. Os resultados encontrados mostraram um aumento significativo de monócitos em animais expostos de forma aguda e subcrônica na concentração de 2 mg/L comparado aos controles. Além disso, para verificar se as alterações comportamentais observadas em animais tratados estavam relacionadas com mecanismos de morte celular e neuronal, foram realizadas análises de morte apoptótica em larvas e de marcadores específicos de morte neuronal em larvas e adultos. Os resultados de morte apoptótica, demonstraram um aumento significativo de morte celular em larvas tratadas de forma aguda na concentração de 15 mg/L. No tratamento subcrônico, aos 5 dpf, houve um aumento de morte apoptótica na concentração de 5 mg/L, em 8 dpf nas concentrações de 5 e 15 mg/L e em 11 dpf nas concentrações de 2 e 5 mg/L. Na análise de marcadores específicos de morte neuronal, os resultados sugerem que as concentrações de NiCl₂ testadas em larvas e adultos não alteraram os níveis de proteína dos marcadores de morte celular. Estes resultados sugerem que a exposição prolongada ao níquel, em estágios iniciais do desenvolvimento do peixe-zebra, leva a alterações morfológicas, fisiológicas e déficits na cognição e locomoção, enquanto que, em animais adultos, foi observado um efeito ansiogênico, comprometimento de memória e diminuição do comportamento agressivo. Estas alterações morfológicas e comportamentais podem estar associadas a efeitos neurotóxicos causados por este metal.

Palavras-chave: agressividade; cognição; desenvolvimento; locomoção; níquel; peixe-zebra.

ABSTRACT

Metals are some of the more toxic substances in the environment. Nickel is one of them and this heavy metal is naturally present in the earth's crust. However, excessive levels of nickel lead to environmental contamination and can cause serious and irreversible health problems. The aim of this study was to evaluate the toxicological effects of nickel exposure on cognition and behavior, in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). Larvae and adult zebrafish were exposed to four different concentrations (0.025, 2, 5, and 15 mg/L NiCl₂) or water (control group) in two treatments: acute and subchronic. Larvae were exposed to NiCl₂ for 2 hours (acute treatment: 5-day-old larvae treated for 2 hours) or 11 days (subchronic treatment: 11-day-old larvae treated since fertilization) and adults were exposed for 12 hours (acute treatment) or 96 hours (subchronic treatment). In both treatments, for larvae and adults, exposed animals had a significant concentration-dependent increase in nickel levels compared to control group. For larvae, the survival rate was similar in both treated groups compared to control. However, a significant delay of hatching, a decreased heartbeat rate and morphological alterations (decrease of body length and ocular area at 5 and 8 days post-fertilization, dpf) were observed in subchronically-treated animals. Aversive and exploratory behavior showed no significant differences among doses in acute treatment. In contrast, larvae analyzed at 5 dpf in subchronic treatment displayed differences in exploratory behavior, showing decrease in distance traveled and mean speed, at 0.025 mg/L, whereas there was an increase at same parameters in higher doses (5 and 15 mg/L). Over the 11 days of treatment, the locomotor behavior decreased significantly, at 15 mg/L, at 8 and 11 dpf. Furthermore, subchronic-treated larvae showed impaired aversive long-term memory in the inhibitory avoidance task in high doses analyzed (2, 5 and 15 mg/L). For adults, acute treatment did not alter the locomotor activity. Besides, animals submitted to the concentration of 15.0 mg/L, in subchronic treatment, showed anxiogenic effects. The social behavior was not altered by treatments. However, the exposure to NiCl₂ caused a decrease in aggressive behavior (subchronic treatment) and impaired memory (acute and subchronic treatments) in all doses compared to controls. In order to evaluate if nickel exposure produced alterations in the hematological system, we analyzed different blood cells in adult animals. The

results showed that treated animals submitted to the concentration of 2.0 mg/L, in acute and subchronic treatment, presented an increase of monocytes. Furthermore, to verify if the behavioral alterations observed in treated animals were related to mechanisms of neuronal death, analyzes of apoptotic death in larvae and specific markers of neuronal death in larvae and adults were performed. The results of apoptotic death demonstrated a significant increase in cell death in acutely treated larvae at a concentration of 15 mg/L. In the subchronic treatment, at 5 dpf, there was an increase in apoptotic death at concentration of 5 mg/L, at 8 dpf, in concentrations of 5 and 15 mg/L and at 11 dpf, in concentrations of 2 and 5 mg/L. In the analysis of specific markers of neuronal death, the results suggest that NiCl₂ concentrations tested in larvae and adults did not alter the protein levels of cell death markers. These results suggest that prolonged exposure to nickel in early life stages of zebrafish development leads to morphological and physiological alterations and cognition and locomotor deficits, whereas it may cause anxiogenic effects, impaired memory and decrease aggressive behavior in adult stage. These morphological and behavioral alterations may be associated to neurotoxic effects damage caused by this metal.

Keywords: aggression; cognition; development; locomotion; nickel; zebrafish.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA: adenosina desaminase

ADO: adenosina

ATP: adenosina 5'-trifosfato

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

HPF: horas pós-fertilização

DPF: dias pós-fertilização

NTPDases: nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

OMS: Organização Mundial da Saúde

ROS: espécies reativas de oxigênio

SNC: sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentagem de células observadas em animais adultos após tratamento agudo e subcrônico com NiCl_2 (página 61).

Figura 2. Análise de apoptose através da técnica de laranja de acridina em larvas submetidas ao tratamento agudo (a) e subcrônico (b, 5 dpf; c, 8 dpf; d, 11 dpf) (página 63).

Figura 3. Imagens das larvas submetidas à técnica de laranja de acridina (a esquerda da imagem: vista lateral; a direita da imagem: vista superior) (página 64).

Figura 4. Influência da exposição ao NiCl_2 em alvos apoptóticos como p53, bax- α e capase-8 em larvas e adultos de peixe-zebra por *Western blot* (página 65).

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Introdução, objetivos e justificativa	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. METAIS PESADOS	12
1.2. NÍQUEL	13
1.2.1. Níquel e neurotoxicidade	16
1.2.2. Níquel no ambiente aquático	17
1.3. PEIXE-ZEBRA	18
1.3.1. Peixe-zebra e desenvolvimento	19
1.3.2. Peixe-zebra e comportamento	21
1.3.3. Peixe-zebra e níquel	23
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. OBJETIVO GERAL	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
CAPÍTULO 2 – Artigo científico	27
CAPÍTULO 3 – Resultados preliminares	60
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
5. PERSPECTIVAS	70
6. REFERÊNCIAS	72
7. ANEXO	85

CAPÍTULO 1

**INTRODUÇÃO,
OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA**

1. INTRODUÇÃO

1.1. METAIS PESADOS

Os metais compõem um grupo de elementos químicos sólidos no seu estado puro (com exceção do mercúrio, que é líquido) caracterizados pelo seu brilho, dureza, boa condutividade de eletricidade e calor, maleabilidade, além de elevados pontos de fusão e ebulição. Dentre estes elementos, existem alguns que apresentam uma densidade ainda mais elevada do que a dos demais, e, por isso são denominados metais pesados (Tchounwou et al., 2012).

Os metais pesados são constituintes naturais de todos os ecossistemas, presentes no ar, solo e água (Apostoli, 2002). Sua distribuição no ambiente é resultante de processos naturais como atividade vulcânica, erosões e atividade bacteriana (Florea e Büsselberg, 2006). No entanto, nas últimas décadas, a distribuição de metais tem aumentado e inúmeras alterações ambientais têm sido observadas, sobretudo provenientes dos processos de urbanização e industrialização. Esses processos incluem principalmente a queima de combustíveis fósseis, processos industriais e agrícolas, mineração e garimpo (Florea e Büsselberg, 2006; Tchounwou et al., 2012).

Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde as bactérias até mesmo os seres humanos, mas eles são requeridos em baixas concentrações. Além disso, a essencialidade de determinados metais varia de acordo com o grupo de organismo (Tchounwou et al., 2012). Em animais, alguns metais pesados participam, em baixas quantidades, de certas atividades metabólicas, como, por exemplo, o cobalto, que participa da produção das hemácias; o cobre, que interage com diversas enzimas e é essencial para a síntese da hemoglobina; o vanádio, que interfere na atividade da insulina; entre outros (Gooneratne et al., 1989; Mouser, 2004; Frisk et al., 2006; Tchounwou et al., 2012). Embora alguns metais apresentem funções biológicas em pequenas concentrações, no geral, metais pesados não são metabolizáveis (os organismos vivos não podem degradá-los), o que faz com que permaneçam em caráter cumulativo ao longo da cadeia alimentar causando riscos

à saúde de acordo com o aumento das concentrações e o tempo de exposição (Wang e Shi, 2001).

Portanto, a exposição excessiva a metais é potencialmente prejudicial à saúde, especialmente tratando-se de compostos metálicos e alguns metais pesados (Florea e Büsselberg, 2006; Marchetti, 2014). Uma exposição prolongada a esses compostos e metais pode resultar em desregulação de vias celulares, causando toxicidade, além de afetar organelas e componentes celulares, como membrana celular, mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático, núcleo e algumas enzimas envolvidas no metabolismo e sistema de reparo de danos do DNA (Wang e Shi, 2001). Essas alterações podem interferir nas funções de órgãos como fígado e rins, além de sistemas, como o sistema hematopoiético e o sistema nervoso central (SNC) (Florea e Büsselberg, 2006).

1.2. NÍQUEL

O níquel (Ni) é um metal pesado naturalmente presente no meio ambiente, formando cerca de 0,008% da crosta e 10 a 20% do núcleo terrestre (Denkhaus e Salnikow, 2002; Valko et al., 2005). Entretanto, suas concentrações no ambiente têm aumentado devido à exploração humana e desenvolvimento de indústrias. Por apresentar características físico-químicas únicas, o níquel é muito utilizado em diversas áreas como na medicina, agricultura e indústria, principalmente nos processos de galvanização e na fabricação de aço inoxidável, baterias, pilhas e pigmentos (Denkhaus e Salnikow, 2002; Zhou et al., 2008; Alsop e Wood, 2011; Muñoz e Costa, 2012). Como resultado, a sua ampla utilização (produção, processamento e reciclagem) leva ao aumento desse metal nos ciclos biogeoquímicos e, conseqüentemente, na contaminação ambiental e na exposição ocupacional, uma vez que a poluição do níquel ocorre na água, solo e ar (Muñoz e Costa, 2012; Wu et al., 2016).

Assim como outros metais, a toxicidade do níquel é dependente da via de exposição, da solubilidade do composto e da forma química na qual se encontra (Schaumlöffel, 2012). O níquel é capaz de formar compostos inorgânicos insolúveis, como os óxidos e sulfetos, e solúveis, como os hidróxidos, nitratos,

sulfatos e cloretos. Dentre os compostos formados, os solúveis são mais prejudiciais à saúde, sendo que o sulfato e o cloreto de níquel (NiSO_4 e NiCl_2) são os mais tóxicos, ambos classificados como carcinogênicos (Das et al., 2008; Schaumlöffel, 2012).

Em plantas e bactérias, a importância e essencialidade do níquel são bem documentadas. A primeira constatação da essencialidade do níquel para os seres vivos foi realizada por Dixon et al. (1975), quando demonstraram que a enzima urease apresenta dois átomos de níquel na sua composição estrutural. A essencialidade do níquel nas plantas superiores foi evidenciada posteriormente (Eskew et al., 1983), sendo que as plantas testadas apresentaram necrose na extremidade das folhas, devido ao acúmulo de ureia em concentrações tóxicas, como consequência da baixa atividade da urease devido à deficiência de níquel. Posteriormente, outras funções do níquel nas plantas também foram constatadas e, o mesmo foi classificado como essencial em concentrações adequadas (Brown et al., 1987; Eskew et al., 1984). Em vários gêneros de bactérias (terrestres e aquáticas), archaea e eucariotos unicelulares, o níquel é necessário para a biossíntese de metaloenzimas incluindo urease, CO-desidrogenase, acetil-CoA sintase, metil-coenzima M redutase, Ni-superóxido dismutase, dioxigenase acirredutona, glioxalase I, lactato racemase e em outras possíveis enzimas dependentes de níquel (Jaun e Thauer, 2007; Can et al., 2014; Lubitz et al., 2014; Maroney e Ciurli, 2014; Sheng et al., 2014; Chivers, 2015; Zambelli et al., 2016).

Entretanto, o papel fisiológico do níquel em seres humanos e outros animais não é bem estabelecido. A existência de enzimas contendo níquel em eucariotos superiores (com exceção das plantas) ainda não foi evidenciada (Zambelli et al., 2016). Contudo, este íon metálico foi classificado como um "elemento possivelmente essencial" para animais e seres humanos na década de 70, com base em experimentos em modelos animais (Nielsen e Ollerich, 1974). Corroborando com os achados da época, a presença de proteínas com domínios de ligação ao níquel no proteoma humano sugere que essas proteínas podem justificar pelo menos algumas das respostas celulares específicas à exposição ao níquel. Além disso, em sistemas biológicos, o níquel parece ser capaz de formar complexos com adenosina trifosfato, aminoácidos, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Zambelli et al., 2016). Como resultado da falta de dados robustos sobre sua função biológica, o níquel é muitas vezes considerado apenas pelo seu

potencial toxicológico, sendo que os problemas causados por sua exposição em humanos e animais são bem documentados.

Em humanos e outros animais, as principais formas de absorção de níquel são por ingestão e inalação, ocorrendo também absorção epidérmica (Zambelli et al., 2016). Partículas insolúveis de níquel entram em células (de vertebrados) por fagocitose, enquanto que carbonila de níquel, solúvel em lipídios, é capaz de passar a membrana plasmática. O Ni (II) é transportado para dentro da célula através de canais de cálcio e/ou por transportadores de metal divalente, necessários na captação de ferro (Barceloux, 1999). O transporte de Ni (II) no plasma é promovido pela albumina, aminoácidos (ex.: histidina) e pequenos peptídeos (Van Soestbergen e Sunderman, 1972; Asato et al., 1975).

Além disso, os metais pesados, como o níquel, não são biodegradáveis e, portanto, podem ser acumulados em organismos vivos, aumentando o risco de exposição através da cadeia alimentar, causando doenças e problemas de saúde (Bailey et al., 1999). A absorção pulmonar ocorre rapidamente, principalmente das formas solúveis de níquel, sendo que a forma química do níquel e seu local de deposição nos pulmões irá afetar a extensão da absorção (Das et al., 2008; Zhao et al., 2009; Schaumlöffel, 2012). Através das vias respiratórias, o metal pode ser disseminado para outros tecidos. O níquel pode ser removido de porções do trato respiratório por transporte mucociliar e, chegar até o trato gastrointestinal. Além da dispersão via aérea, a ingestão de níquel, através da água ou alimentos contaminados, por exemplo, aumenta a chance de absorção por essa via (Iyengar e Nair, 2000; Das et al., 2008; Srinivasan e Reddy, 2009; Reddy et al., 2015). Embora este metal seja fracamente absorvido pela epiderme, alguns compostos como sulfato e cloreto de níquel podem penetrar na pele intacta (Fullerton et al., 1986; Das et al., 2008; Schaumlöffel, 2012).

Alergia ao níquel, na forma de dermatite de contato, é a reação mais comum e bem conhecida, ocorrendo até mesmo por exposição aguda (Saito et al., 2016). Já o acúmulo no corpo humano pela exposição crônica pode levar a problemas mais graves como diversas doenças respiratórias, problemas de fertilidade, fibrose pulmonar, doenças cardiovasculares e renais e sérios e irreversíveis danos neuronais, sendo que toda a alteração ocorrida após a exposição pode levar a progressão carcinogênica (Navarro Silvera e Rohan, 2007; Muñoz e Costa, 2012; Pasanen et al., 2012; Marchetti, 2014; Guo et al.,

2015; Xu et al., 2015). Além disso, o níquel é capaz de passar a placenta, influenciando no desenvolvimento pré-natal por ação direta no embrião. A exposição durante o desenvolvimento pode causar danos ao DNA, malformações congênitas, baixo peso e tamanho ao nascer e defeitos na formação do tubo neural (McDermott et al., 2015).

1.2.1. Níquel e neurotoxicidade

A inalação de níquel pode levar à deposição do metal no SNC. Essa deposição ocorre através dos neurônios olfatórios, constituindo uma via de entrada no SNC por escapar à seleção da barreira hematoencefálica (Tjalve e Henriksson, 1999; Sunderman, 2001). Dentre os danos causados, a hiposmia (diminuição do olfato) e anosmia (perda total do olfato) foram observadas em trabalhadores expostos ao níquel. Esse metal pode ser absorvido pelo epitélio olfativo, migrando para os neurônios olfatórios primários, posteriormente para os neurônios olfatórios secundários e terciários (Tjalve e Henriksson, 1999; Sunderman, 2001).

Os danos celulares causados pela exposição ao níquel ocorrem em grande parte no SNC. Nesse sentido, alguns estudos têm demonstrado alterações nas funções de canais iônicos (Kang et al., 2006, 2007; Nosal et al., 2013) e modificação em diferentes tipos celulares que levam a importantes alterações funcionais. Em cultura primária de neurônios corticais, foi demonstrado que o níquel promove um aumento significativo da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando perda da viabilidade celular, além da inibição da função mitocondrial, diminuição de ATP e de DNA mitocondrial (Xu et al., 2010, 2015). Em oligodendrócitos, a exposição *in vitro* a íons de metais, incluindo níquel, promoveu citotoxicidade (Issa et al., 2008). Além disso, outro estudo utilizando células PC12, um modelo para desenvolvimento neuronal, demonstrou que o níquel, juntamente com a exposição a outros poluentes, como inseticidas e organoclorados, induz neurotoxicidade durante o desenvolvimento (Slotkin e Seidler, 2009).

Além dos transtornos de desenvolvimento e danos celulares, a neurotoxicidade induzida por metais pesados desenvolve deficiências cognitivas e

motoras, sugerindo que esses metais, como o níquel, podem alterar a atividade sináptica no sistema nervoso central e periférico. Foi observado *in vivo*, que a deposição de níquel no córtex cerebral de camundongos causou déficit de memória espacial e da atividade exploratória nos animais expostos a este metal (He et al., 2013), indicando que a exposição ao níquel pode afetar os sistemas de neurotransmissão.

1.2.2. Níquel no ambiente aquático

Atualmente, devido à ampla ocorrência da poluição proveniente de metais no ambiente aquático, mais atenção tem sido dada a este sistema. Os metais podem estar naturalmente presentes no sistema aquático devido à erosão do solo que chega à água, geralmente ocorrendo em baixos níveis, os quais não causam efeitos deletérios à saúde de organismos (Zhou et al., 2008). Entretanto, partículas em suspensão e sedimentos provenientes da poluição são capazes de ser liberados na água, levando a uma contaminação adicional de metais no ambiente aquático, podendo apresentar alta toxicidade para organismos vivos (Zhou et al., 2008; Zhao et al., 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece a presença de níquel na água na concentração máxima de 0,025 mg/L Ni. Esta é a mesma concentração estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, órgão responsável pelas definições brasileiras) para água doce, salina e salobra. Entretanto, para os padrões de lançamento de efluentes, a concentração estabelecida é de 2,0 mg/L Ni.

Contrariamente ao que a lei prevê, muitos países relatam níveis elevados de níquel em lagos e rios (Villanueva e Botello, 1998; Skerfving et al., 1999; Niu et al., 2015; Gissi et al., 2016; Li et al., 2016; Wang et al., 2016) e várias alterações têm sido observadas em alguns animais, particularmente peixes. Algumas alterações em diferentes espécies de peixes incluem problemas estruturais, como anormalidades na pele, alterações morfológicas e modificações nas brânquias e desenvolvimento muscular; e também alterações moleculares, tais como indução ao estresse oxidativo, apoptose e alterações gênicas. O aumento da mortalidade,

a eclosão tardia de ovos e a diminuição da atividade locomotora também foram relatados (Kienle et al., 2008, 2009; Scheil e Köhler, 2009; Defo et al., 2014; Hussainzada et al., 2014; Marcato et al., 2014; Zheng et al., 2014; Ku et al., 2015).

Devido aos diferentes efeitos observados, a resposta comportamental de peixes tem sido investigada para entender os efeitos da toxicidade causada por poluentes. Algumas espécies de peixes têm sido utilizadas para este tipo de análise. Dentre elas observa-se o uso do peixe-zebra, medaka, dojô, peixinho-dourado, truta arco-íris, entre outros (Zhou et al., 2008).

1.3. PEIXE-ZEBRA

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo, da família dos ciprinídeos. É uma espécie ornamental, também conhecido pelos nomes de bandeirinha, peixe-zebra, paulistinha e bandeira-paulista (Grunwald e Eisen, 2002). O peixe é originário da Índia, sendo encontrado naturalmente em partes do Paquistão, Bangladesh, Nepal e Birmânia (Arunachalam et al., 2013). A espécie comumente habita riachos, canais, lagoas e corpos de água de movimento lento ou estagnado, incluindo campos de arroz. Sua forma é fusiforme e lateralmente comprimida, com a boca direcionada para cima. O macho apresenta listras douradas entre as listras azuis; a fêmea tem uma barriga maior, esbranquiçada e listras prateadas entre as azuis. O peixe-zebra pode crescer até 6,4 cm de comprimento, embora raramente cresça acima de 4 cm em cativeiro. Sua vida útil em cativeiro é de cerca de dois a três anos, embora em condições ideais possa chegar a 5-6 anos de vida (Westerfield, 2000).

Este organismo apresenta uma série de características que o torna atrativo para o desenvolvimento de pesquisas, destacando o fato de ser um animal de pequeno tamanho, com curto tempo de geração (Kalueff et al., 2014; Stewart et al., 2014). Além disso, esse animal possui um rápido metabolismo e uma grande sensibilidade a fármacos e poluentes, absorvendo os componentes diretamente da água pelas suas brânquias acumulando-os em diferentes tecidos, principalmente, no SNC (Karlovič et al., 1998; Goldsmith, 2004). Esta espécie também tem sido comumente utilizada para o estudo de desenvolvimento em

vertebrados e dos mecanismos biológicos relacionados às doenças humanas (Lele e Krone, 1996; Grunwald e Eisen, 2002). Especificamente, essa espécie tem sido utilizada como um importante modelo para a realização de estudos nas áreas de bioquímica (Taylor et al., 2004; Seibt et al., 2009; Siebel et al., 2011), comportamento (Gerlai et al., 2009; Buske e Gerlai, 2011; Cognato et al., 2012), toxicologia (Hill et al., 2005; Senger et al., 2006 a,b; Pereira et al., 2012), pesquisa transgênica (Lillesaar et al., 2009), teratologia (Ton et al., 2006; Padilla et al., 2012) e neurociências (Stewart et al., 2014).

Sua extensiva utilização na pesquisa é decorrente da similaridade de várias características dessa espécie com outros vertebrados, uma vez que cerca de 70% dos genes de peixe-zebra apresentam homologia com genes humanos (Howe et al., 2013). O sistema nervoso desse animal é bem caracterizado e estudado e diversos tipos de sistemas de neurotransmissão são bem conservados entre peixe-zebra e outras espécies, incluindo humanos (Clemente et al., 2004; Schweitzer et al., 2012; Cheng et al., 2014; Stewart et al., 2015). Além disso, o repertório comportamental e sistemas de sinalização presentes nesse organismo, também podem ser comparados a outros grupos de vertebrados (Rico et al., 2011; Stewart et al., 2014).

1.3.1. Peixe-zebra e desenvolvimento

O desenvolvimento do peixe-zebra é bem caracterizado e similar ao de outros vertebrados (Barbazuc et al., 2000; Dooley e Zon, 2000). Os animais se desenvolvem rapidamente, sendo que no primeiro dia (24 horas pós-fertilização, hpf) a maioria dos órgãos já estão formados. Entre 3 e 4 meses, os animais são sexualmente maduros, com fêmeas produzindo centenas de ovos (Legradi et al., 2015). Os embriões se desenvolvem externamente e são protegidos por um cório transparente durante os primeiros 2 a 3 dias de vida. Embriões e larvas jovens apresentam essa característica de transparência; assim, mudanças morfológicas podem ser facilmente monitoradas através de microscopia (Lele e Krone, 1996; Kalueff et al., 2014; Stewart et al., 2014).

No peixe-zebra, o tubo intestinal que dá origem ao fígado, pâncreas, vesícula biliar e intestino é discernível aproximadamente 26 hpf. Uma série de

eventos morfológicos bem caracterizados durante os 4 dias seguintes de desenvolvimento dão origem a um sistema digestivo totalmente funcional, permitindo o início da alimentação, sendo que em períodos anteriores a este estágio, os animais alimentam-se do vitelo (Trotter et al., 2009).

As células cardíacas desenvolvem-se durante a gastrulação (6 hpf). Estas células cardiogênicas atingem o eixo embrionário no estágio de 8 somitos, e formam o primórdio do miocárdio em ambos os lados da linha média. Pelo estágio de 21 somitos, os tubos miocárdicos se aproximaram um do outro e um grupo distinto de células fica medialmente entre eles. Os tubos miocárdicos então se fundem e formam o tubo cardíaco definitivo. Cerca de 22 hpf, o coração está batendo. Embora não sejam morfológicamente distinguíveis até 36 hpf, nesta fase, as câmaras se distinguem em átrio e ventrículo (Stainier et al., 1993).

A neurogênese dos animais também inicia na gastrulação, quando aparecem as primeiras células que originam o sistema nervoso. Ao final da gastrulação (9-10 hpf), o tubo neural é formado, o qual é dividido em diferentes regiões do cérebro e a medula espinhal (Fulwiler e Gilbert, 1991; Legradi et al., 2015). Os primeiros movimentos são visíveis aproximadamente 17 hpf. Cerca de 24 hpf, diferentes partes do cérebro, incluindo prosencéfalo, diencéfalo, telencéfalo, mesencéfalo e cordão espinhal são estabelecidos, e os primeiros neurônios são conectados por axônios. Após 27 hpf, o comportamento torna-se mais complexo. O embrião é capaz de distinguir entre toques na cabeça e cauda e começa a nadar com movimentos coordenados. Cerca de 48 hpf, os ventrículos cerebrais estão formados (Lewis e Eisen, 2003; Hocking et al., 2013).

Aproximadamente 96 hpf, o sistema nervoso está quase completamente desenvolvido, e todos os neurônios catecolaminérgicos e subtipos de células gliais, oligodendrócitos, células de Schwann e astrócitos podem ser identificados (Blader e Strähle, 2000; Hjorth e Key, 2002). O sistema visual é totalmente funcional e pode ser testado cerca de 120 hpf. O peixe-zebra possui dois sistemas mecanosensoriais importantes para a detecção de vibrações e orientação adequada na água. O primeiro é o ouvido interno, e o segundo é a linha lateral, que contém células ciliadas sensoriais semelhantes ao ouvido humano. Testes auditivos utilizando estímulos acústicos ou testes de vibração podem ser realizados a partir de 5 dias pós-fertilização (dpf) (Bhandiwad et al., 2013). O peixe-zebra desenvolve barreira hematoencefálica similar a de

humanos, sendo completamente funcional nos animais com 10 dpf. Este é um aspecto muito importante para os estudos de neurotoxicologia, devido ao fato de que compostos que afetam o encéfalo de larvas podem não ser capazes de entrar no encéfalo de peixes adultos e podem, por conseguinte, ser menos neurotóxicos (Jeong et al., 2008; Eliceiri et al., 2011; Umans e Taylor, 2012).

1.3.2. Peixe-zebra e comportamento

O peixe-zebra apresenta uma série de padrões de comportamento complexos que são altamente comparáveis a roedores e humanos, que podem ser avaliados e empregados em diferentes estudos. Aos 4 dpf, as larvas apresentam um comportamento complexo. O aprendizado pode ser medido de forma confiável em torno de três semanas de idade (de Esch et al., 2012). O comportamento das larvas pode ser avaliado através da análise exploratória (Colwill e Creton, 2012). Nesta análise, os animais são colocados individualmente em uma placa de 24 poços onde é observada a capacidade exploratória e locomotora de cada animal. Nesta análise, é possível estabelecer a distância e a velocidade do nado, além da preferência pela área mais próxima à borda do poço ou central. Este parâmetro permite avaliar ansiedade nos animais. O aprendizado e a memória podem ser testados através do comportamento aversivo (Pelkowski et al., 2011). Nesta tarefa, é avaliada a habilidade cognitiva e a resposta de prevenção a um estímulo visual, sendo que naturalmente os animais evitam o estímulo, nadando para o outro lado.

O repertório de comportamento que pode ser avaliado em animais adultos é extenso. Entre outros, eles demonstram comportamento de medo (Agetsuma et al., 2010; Ogawa et al., 2014), ansiedade (Formella et al., 2012; Parker et al., 2014), agressividade (Norton et al., 2011; Ariyomo et al., 2013), aprendizado (Aoki et al., 2013; Valente et al., 2012), memória (Cognato et al., 2012; Jia et al., 2014) e, interação social (Gerlai et al., 2000; Gerlai, 2003).

Os comportamentos de medo e ansiedade normalmente se sobrepõem. No medo, normalmente o animal evita um local, estímulo ou objeto. Já nas situações de ansiedade (mas também de medo), os animais apresentam uma diminuição na exploração do ambiente, permanecem mais tempo no fundo do aquário,

eventualmente ficam paralisados, apresentam aumento de movimentos operculares, mudança da coloração corporal e movimentos erráticos (zigzague) (Levin et al., 2007; Kalueff et al., 2013).

O comportamento agressivo inclui uma série de condutas complexas dirigidas a um coespecífico, como elevação das nadadeiras, movimento ondulado do corpo, abertura da boca, alteração da coloração corporal, perseguição, movimentos circulares, entre outros. Essas respostas agressivas podem aparecer no contexto da defesa do território, protegendo recursos (por exemplo, fêmeas ou alimento) e estabelecendo dominância (Kalueff et al., 2013). Tarefas avaliando agressividade incluem a agressão direta a outro animal (oponente) ou ao seu reflexo (tarefa do espelho) (Gerlai et al., 2000; Gerlai, 2003).

O peixe-zebra adulto é um animal social e vive em cardumes. O comportamento social é influenciado pela presença ou ações de outros coespecíficos e pode ser testado pela preferência do animal por estar ou não próximo a outros iguais. Uma possível forma de avaliação envolve a utilização de um aparato que consiste de três aquários. O aquário central é aquele no qual o animal a ser testado será colocado, de um dos lados deste, é colocado um aquário vazio e do outro um com coespecíficos. Durante a tarefa, observa-se a preferência por um destes lados (Gerlai et al., 2000; Gerlai, 2003).

O aprendizado e a memória podem ser testados por exploração de novos locais e por evitar estímulos. Nestas tarefas, os animais são submetidos a uma situação inicial e, posteriormente, há um tempo determinado os animais devem lembrar/reconhecer o que já foram expostos anteriormente. Normalmente, as tarefas incluem a associação a um estímulo que pode ser bom ou ruim (Blank et al., 2009; Cognato et al., 2012).

Diversos agentes podem alterar o repertório comportamental de larvas e adultos de peixe-zebra, o que pode ser avaliado em estudos toxicológicos. Nestes casos, os animais são expostos a poluentes, fármacos, entre outros compostos e, posteriormente, é observado se o agente escolhido foi capaz de alterar algum parâmetro. Além disso, alterações no comportamento desempenham um grande problema na sobrevivência da espécie, por isso a importância de seu estudo (Scott e Sloman, 2004). Ainda, a resposta do comportamento dos peixes a essas exposições tem sido sugerida para estudar a toxicidade de muitos poluentes (Zhou et al., 2008).

1.3.3. Peixe-zebra e níquel

Os peixes acumulam substâncias químicas por exposição direta a produtos presentes na água, e de forma indireta através da cadeia alimentar no ecossistema (Powers, 1989). Nesse sentido, alguns estudos têm utilizado o peixe-zebra como modelo experimental para analisar os efeitos causados pela exposição ao níquel.

Estudos utilizando NiCl_2 para induzir toxicidade nos animais observaram diminuição na atividade locomotora (exposição aguda e subcrônica), além de alterações na taxa de eclosão dos ovos, que passou a ocorrer mais tarde quando comparado a animais do grupo controle, bem como, um aumento da taxa de mortalidade dos animais (exposição subcrônica). As alterações foram observadas nas concentrações de 7,5, 10, 12,5 e 15 mg/L NiCl_2 (Kienle et al., 2008, 2009). O atraso na eclosão dos ovos e aumento da mortalidade, também foi observado em outros estudos nas concentrações de 45 $\mu\text{g/L}$ e 90 $\mu\text{g/L}$ NiSO_4 (Dave e Xiu, 1991) e 5, 10, e 15 mg/L NiCl_2 (Scheil et al., 2010).

Anormalidades na pele (aparência distorcida) dos peixes foram reportadas em outro estudo (Hussainzada et al., 2014). Além disso, os animais expostos ao níquel (nas concentrações de 45, 54 e 62 mg/L NiCl_2) apresentaram aumento da expressão de genes envolvidos nos processos de regulação do ciclo celular e apoptose e na síntese de proteínas. Também foi observado, no mesmo estudo, que o níquel induziu alterações em fatores de transcrição, aumentando a regulação de alguns genes (*hif1 α* e *xbp1*), os quais são reguladores celulares que detectam o nível de oxigênio e desencadeiam cascatas de adaptação, equilibrando os níveis de oxigênio (Hussainzada et al., 2014).

Considerando que no ambiente, os metais estão em constante interação com diferentes poluentes, o que altera sua conformação e ação, torna-se válido estudar a sinergia envolvida nessa combinação. Um estudo avaliando a interação de NiCl_2 , pesticidas e diferentes temperaturas, revelou que a combinação de altas temperaturas e exposição ao níquel (efeitos observáveis nas concentrações de 5, 10, e 15 mg/L NiCl_2) apresenta um efeito sinérgico para ambos os estressores, causando aumento da mortalidade e diminuição na taxa de eclosão dos ovos de peixe-zebra (Scheil e Köhler, 2009). Outra forma de sinergismo foi demonstrada

em um estudo, o qual avaliou a interação de NiSO_4 (5, 10, 20, 40, 80, e 100 mg/L NiSO_4) com um agroquímico (buprofezina). No estudo, foi observado que essa interação leva ao aumento da absorção de níquel, causando uma elevação da taxa de mortalidade de embriões de peixe-zebra. A exposição combinada de níquel e buprofezina, em baixas concentrações, produziu um efeito tóxico, que não teria resultado observável destes produtos químicos individualmente, sugerindo que a exposição combinada de metais e outros poluentes é um risco para a saúde e, também, ecológico (Ku et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

O níquel é um metal pesado, presente naturalmente no meio ambiente. Entretanto, devido à atividade humana, suas concentrações estão aumentadas e a exposição excessiva apresenta riscos para a saúde humana. Além disso, evidências têm demonstrado um número crescente de casos de intoxicação por metais, a qual induz um aumento da suscetibilidade para desenvolver diversas alterações fisiológicas e comportamentais em organismos vivos. Tais alterações podem afetar significativamente a sobrevivência de diversas espécies, incluindo organismos aquáticos, além de representar riscos para outros vertebrados, uma vez que o níquel pode ser bioacumulado e amplificado na cadeia alimentar. Portanto, torna-se relevante avaliar, em diferentes organismos, os efeitos causados pela exposição a este metal. Além disso, a análise de parâmetros morfológicos, fisiológicos e comportamentais, após exposição ao níquel, pode contribuir para o entendimento dos efeitos tóxicos causados por este metal, especificamente em peixe-zebra, o qual tem sido considerado um importante modelo para estudos de análises toxicológicas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição aguda e subcrônica ao cloreto de níquel sobre parâmetros morfológicos, fisiológicos e comportamentais em peixe-zebra, nos estágios larval e adulto.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a taxa de eclosão dos ovos na exposição subcrônica ao níquel.
- Avaliar a taxa de sobrevivência/mortalidade de larvas e adultos de peixe-zebra expostos ao níquel de forma aguda e subcrônica.
- Avaliar alterações morfológicas em larvas expostas ao níquel de forma aguda e subcrônica.
- Avaliar parâmetros hematológicos em peixe-zebra adultos expostos ao níquel de forma aguda e subcrônica.
- Avaliar parâmetros de atividade locomotora em larvas e adultos expostos ao níquel de forma aguda e subcrônica.
- Avaliar comportamento aversivo em larvas expostas ao níquel de forma aguda e subcrônica.
- Avaliar parâmetros comportamentais de memória, interação social e agressividade em adultos exposto ao níquel de forma aguda e subcrônica.
- Analisar os níveis de níquel em encéfalos de larvas e adultos de peixe-zebra expostos ao níquel de forma aguda e subcrônica.
- Avaliar a morte celular através da técnica de laranja de acridina em larvas de peixe-zebra expostas ao níquel de forma aguda e subcrônica.
- Avaliar a morte neuronal através de marcadores, tais como caspase 8, p53 e bax- α , em encéfalos de larvas e adultos de peixe-zebra expostos ao níquel de forma aguda e subcrônica.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

NABINGER DD, ALTENHOFEN S, BITENCOURT PER, NERY LR, LEITE CE, VIANNA, MR, BONAN CD. Nickel exposure alters behavioral parameters in larval and adult stages of zebrafish

Artigo submetido em 21 de janeiro de 2017 ao periódico Aquatic Toxicology

CAPÍTULO 3

RESULTADOS PRELIMINARES

Além dos resultados apresentados no capítulo 2, a análise hematológica também foi realizada. O mecanismo de absorção de níquel não é conhecido. No entanto, os peixes expostos a concentrações relativamente elevadas deste metal na água tendem a acumular este metal no seu plasma, o que sugere que o níquel pode atravessar o epitélio branquial e entrar na corrente sanguínea (Pane et al., 2006; Chowdhury et al., 2008).

Portanto, para este experimento foram realizados os mesmos tratamentos descritos no capítulo 2. Seis animais adultos de cada grupo foram utilizados para identificar os parâmetros hematológicos. Os animais foram eutanasiados por resfriamento rápido, e a amostra de sangue foi coletada da aorta dorsal (Zang et al., 2013). Após este processo, o esfregaço foi corado utilizando coloração de *May-Grunewald-Giemsa* (Costa et al., 2014). As células foram imersas em metanol PA durante 2 minutos, lavadas três vezes com água destilada, incubadas durante 20 minutos em *Giemsa* e lavadas outras três vezes com água destilada. As contagens de linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células imaturas foram estimadas por contagem de 100 células sob objetiva de $\times 40$ (OLYMPUS CX31).

Os resultados encontrados mostraram um aumento significativo de monócitos em animais adultos expostos de forma aguda ($p < 0,05$) e subcrônica ($p < 0,05$) na concentração de 2,0 mg/L comparado com os controles (figura 1).

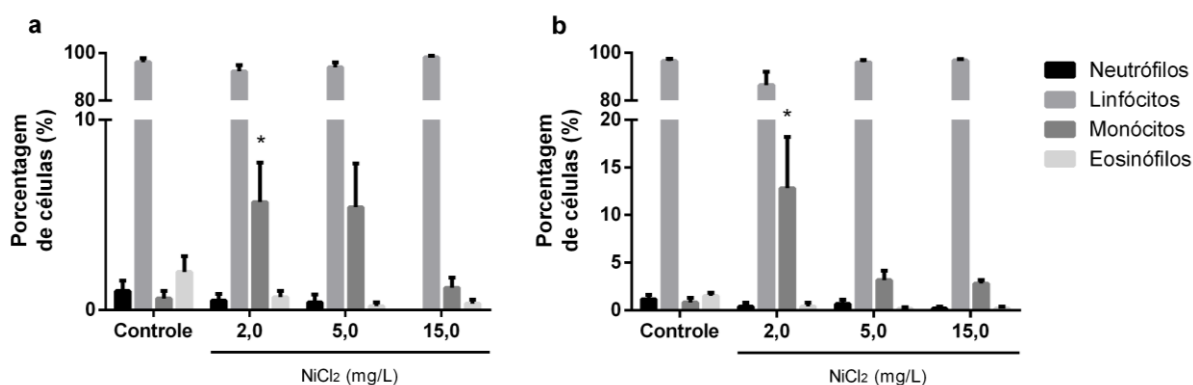


Figura 1. Porcentagem de células observadas em animais adultos após tratamento agudo (a) e subcrônico (b) com NiCl₂. As barras expressam a média \pm erro padrão (n = 6). (*) indica diferença significativa de $p \leq 0,05$ em comparação ao grupo controle (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Kruskal-Wallis).

A fim de avaliar se as alterações observadas em animais tratados ocorreram devido a danos causados por indução de morte celular, foram realizadas análises de morte apoptótica em larvas e de marcadores específicos de morte neuronal em larvas e adultos.

Primeiramente, foi realizada a técnica de laranja de acridina. Esta técnica permite observar ilhas apoptóticas ao longo do corpo dos animais, por marcar com fluorescência ácido nucleico degradado. Para tanto, 15 larvas por tratamento foram tratadas com propiltiouracil (PTU) desde a fertilização para inibir a pigmentação natural dos animais e facilitar a visualização da marcação fluorescente. Larvas do tratamento agudo foram testadas aos 5 dpf, e animais do tratamento subcrônico aos 5, 8 e 11 dpf (condições de tratamento descritas no capítulo 2). Nos dias estipulados, os animais ficaram imersos em solução de laranja de acridina (2 µg/mL) durante 30 min, seguido de três lavagens com água mineral por 10 min (Tucker e Lardelli, 2007). Para a visualização, as larvas foram fixadas em metilcelulose (3%) e observadas sob estereomicroscópio com luz UV. Após o registro fotográfico, os animais foram crio-eunatasiados. A quantificação densitométrica de cada imagem foi realizada utilizando o software Carestream (Carestream Health), através da razão de pixels positivos e negativos.

Os resultados demonstraram um aumento significativo de morte em animais tratados de forma aguda na concentração de 15,0 mg/L ($p \leq 0,0001$). Já no tratamento subcrônico aos 5 dpf houve um aumento na morte celular na concentração de 5,0 mg/L ($p \leq 0,001$), em 8 dpf nas concentrações de 5,0 ($p < 0,05$) e 15,0 mg/L ($p < 0,05$) e em 11 dpf nas concentrações de 2,0 ($p < 0,05$) e 5,0 mg/L ($p < 0,05$) (figura 2 e 3).

Os marcadores de morte neuronal, analisados em larvas e adultos, foram medidos para determinar se o NiCl_2 poderia causar alterações nos níveis proteicos relativos dos marcadores de morte celular através da técnica de *western blot* (Anichtchik et al., 2004; Nery et al., 2014). Os animais foram analisados após o término dos períodos de exposição (condições de tratamento descritas no capítulo 2) e as amostras processadas após a eutanásia dos animais, submetidas à eletroforese SDS-PAGE, seguida de transferência para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpos específicos para Caspase 8 (Anaspec, 55375), p53 (Anaspec, 55342) e Bax-alfa (Anaspec, 55469), visualizadas por quimioluminescência quando associados aos anticorpos

secundários e reveladas utilizando o Kit Western Lighting Western Blot Chemiluminescence (Perkin Elmer). A densitometria das bandas foi realizada utilizando o software Carestream.

Os resultados preliminares sugerem que as concentrações de NiCl_2 testadas em larvas e adultos não alteraram os níveis de proteína dos marcadores de morte celular (figura 4).

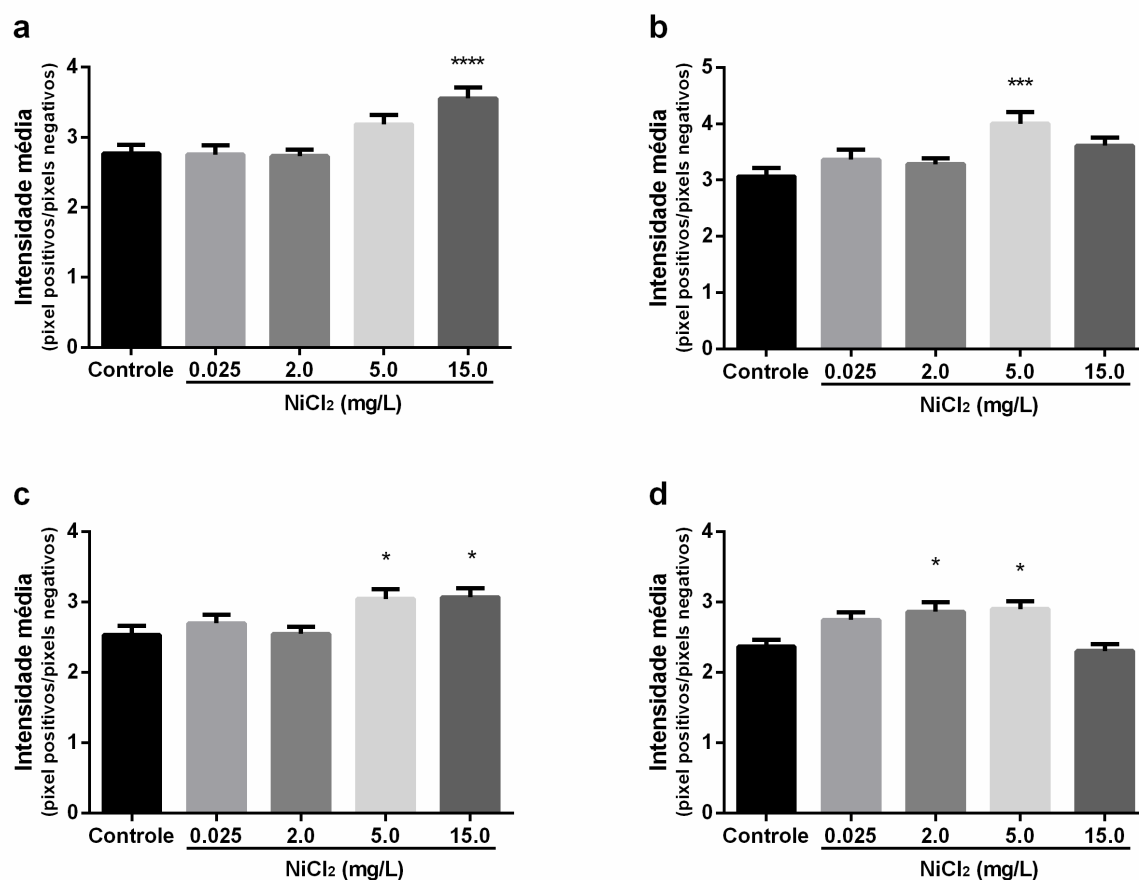


Figura 2. Análise de apoptose através da técnica de laranja de acridina em larvas submetidas ao tratamento agudo (a) e subcrônico (b, 5 dpf; c, 8 dpf; d, 11 dpf). As barras expressam a média \pm erro padrão ($n = 15$). * indicam diferença significativa de $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$ em comparação ao grupo controle (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

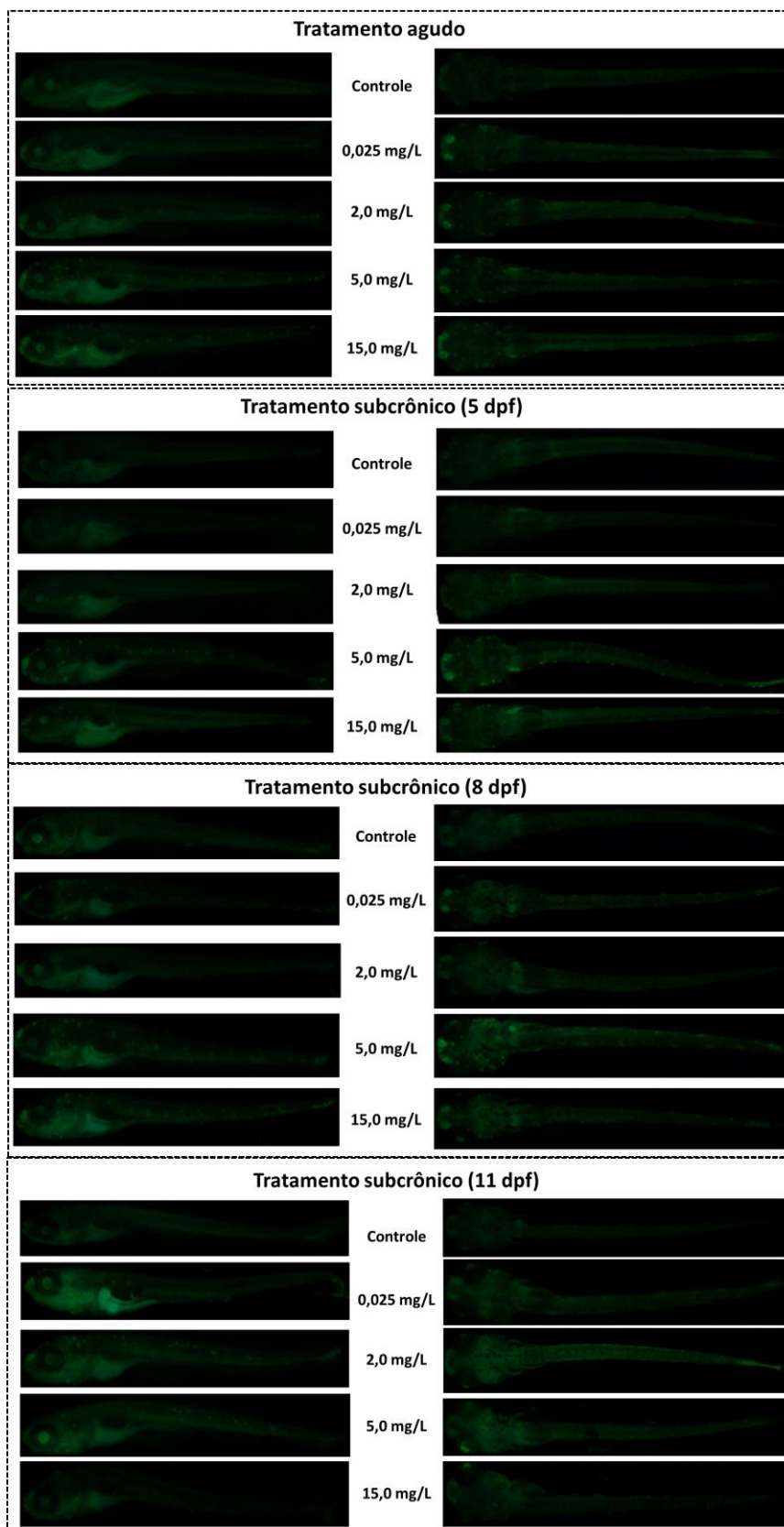


Figura 3. Imagens das larvas submetidas à técnica de laranja de acridina (a esquerda da imagem: vista lateral; a direita da imagem: vista superior).

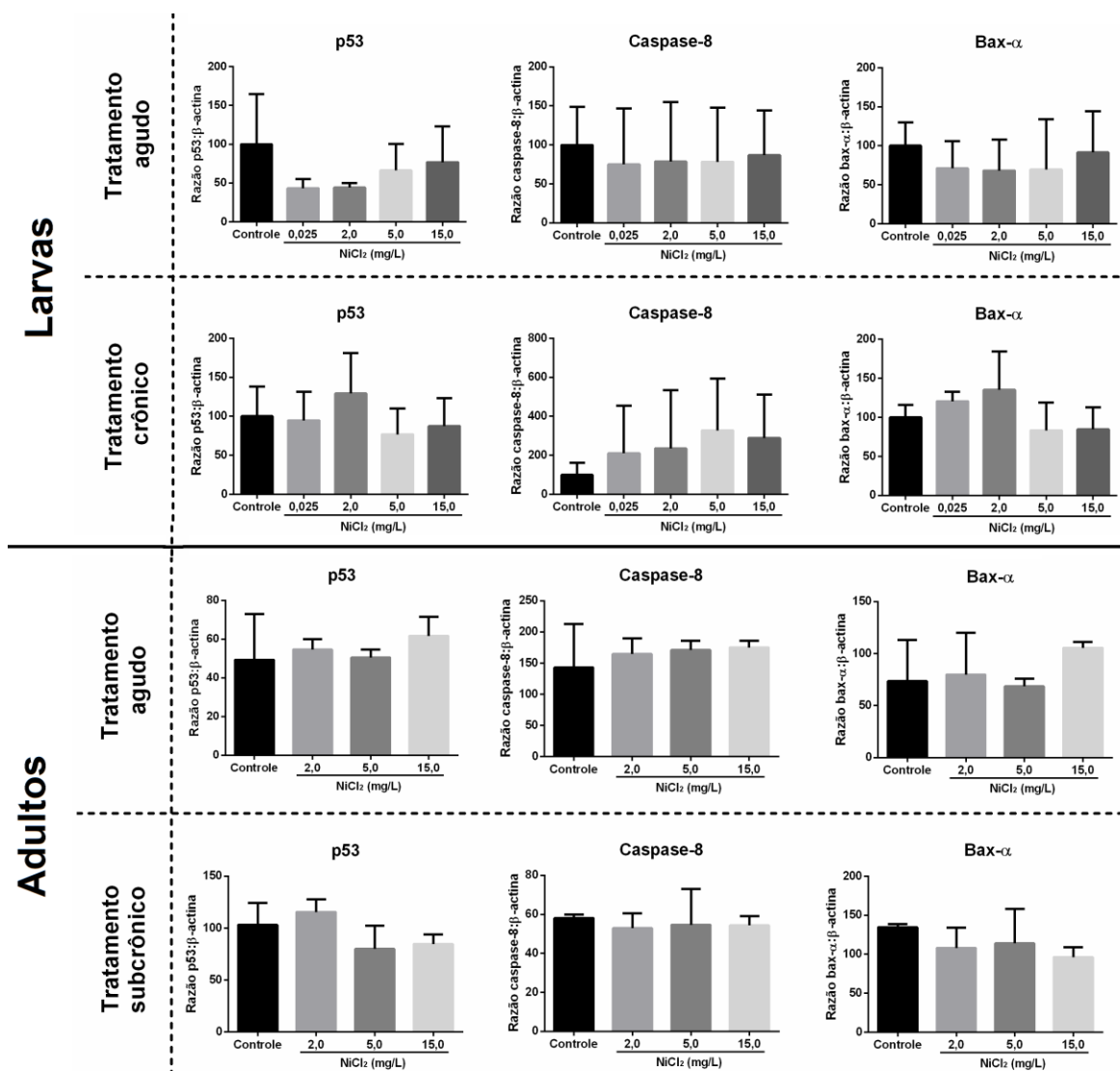


Figura 4. Influência da exposição ao NiCl_2 em alvos apoptóticos como p53, bax- α e caspase-8 em larvas e adultos de peixe-zebra por *Western blot*. As barras expressam a média \pm desvio padrão (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

Todos os protocolos realizados neste trabalho (apresentados nos capítulos 2 e 3) foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA-PUCRS, 15/00463) (carta em anexo).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, ouve-se muito sobre poluição. Essa palavra é usada para designar, essencialmente, qualquer tipo de alteração provocada ao ambiente por meio da intervenção humana, referindo-se especificamente ao ato de contaminar a água, o solo e o ar. Entre os poluentes mais comuns encontrados em ambientes urbanos estão os metais, que são usados com frequência em atividades industriais e descartados sem controle algum na rede coletora de águas pluviais ou de esgotos. Devido a isso, há algum tempo, associa-se a urbanização à poluição de corpos de água, devido a esgotos domésticos não tratados e aos dejetos industriais (Florea e Büsselberg, 2006; Tchounwou et al., 2012).

A biodisponibilidade e toxicidade nos ecossistemas aquáticos estão relacionadas com a composição física e química do metal na coluna d'água (Schaumlöffel, 2012). Os metais podem ser dissolvidos, sendo, portanto incorporados aos organismos que estão em contato direto ou indireto com os recursos hídricos (Zhao et al. 2009; Zhou et al., 2008). A descarga de metais em ambientes aquáticos resulta em respostas físicas, químicas e biológicas, ocasionando mudanças nos processos enzimáticos e acúmulo nos tecidos dos organismos aquáticos. Mudanças ocorrem também na densidade, estrutura da comunidade e composição das espécies e populações, interferindo diretamente na sua sobrevivência (Moore e Ramamoorthy, 1984).

A concentração de metal no organismo de peixes é função do balanço entre velocidade de absorção e excreção, tamanho do corpo, hábito alimentar, habitat, variação sazonal e afinidade individual para absorção do metal (Mance, 1990; Jallel et al., 1996). Alguns animais são capazes de excretar uma proporção de metal maior do que a absorvida do meio contaminado, mantendo a concentração do corpo a nível normal, evitando o efeito patológico que ocorre quando a velocidade de absorção excede a excreção (Rand e Petrocelli, 1985). Entretanto, visto que o número de relatos de ambientes aquáticos contaminados excedendo os valores estabelecidos por leis e diretrizes ambientais têm aumentado, torna-se cada vez mais frequente também o relato de alterações observadas em organismos aquáticos, principalmente peixes (Villanueva e Botello, 1998; Skerfving et al., 1999; Kienle et al., 2008, 2009; Scheil e Köhler,

2009; Defo et al., 2014; Hussainzada et al., 2014; Marcato et al., 2014; Zheng et al., 2014; Ku et al., 2015; Niu et al., 2015; Gissi et al., 2016; Li et al., 2016; Wang et al., 2016).

No capítulo 2 do presente trabalho, foram avaliados os efeitos toxicológicos da exposição aguda e subcrônica ao níquel em larvas e adultos de peixe-zebra (*Danio rerio*). Especificamente, foram analisados os efeitos deste metal sobre parâmetros do desenvolvimento, cognição e comportamento exploratório em larvas, bem como a atividade locomotora, comportamento social e agressivo e alterações na memória em animais adultos.

Os resultados demonstraram que a exposição ao níquel foi capaz de retardar a eclosão dos ovos, diminuir a taxa de batimentos cardíacos e alterar morfológicamente larvas e embriões submetidos ao tratamento subcrônico. Os animais apresentaram alterações no comportamento aversivo e exploratório, exibindo aos 5 dpf uma diminuição na atividade exploratória na concentração de 0,025 mg/L enquanto houve um aumento em altas concentrações (5,0 e 15,0 mg/L). Ao longo dos 11 dias de tratamento, o comportamento exploratório diminuiu significativamente na concentração de 15,0 mg/L. As larvas submetidas às altas concentrações analisadas também apresentaram comprometimento cognitivo. Alteração na taxa de sobrevivência, eclosão dos ovos e modificações morfológicas tem sido reportadas por outros estudos devido a diferentes alterações celulares e moleculares induzidas pela exposição ao níquel. Além disso, alterações comportamentais também têm sido observadas (Kienle et al., 2008, 2009; Scheil e Köhler, 2009; Defo et al., 2014; Hussainzada et al., 2014; Ku et al., 2015).

Além das alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais nos estágios iniciais do desenvolvimento de peixe-zebra, a exposição aguda e prolongada de animais adultos ao níquel também causa efeitos deletérios sobre diversos parâmetros, incluindo comportamento (Kienle et al., 2008, 2009; Hussainzada et al., 2014). No presente trabalho, os animais submetidos à concentração de 15,0 mg/L no tratamento subcrônico demonstraram efeito ansiogênico. Embora não tenha sido observada alteração na interação social, os animais tratados apresentaram diminuição do comportamento agressivo

(tratamento subcrônico) e comprometimento de memória (tratamento agudo e subcrônico) em todas as concentrações testadas quando comparados aos controles.

No capítulo 3, são apresentados resultados adicionais que não foram incluídos no artigo científico. Foram analisados parâmetros hematológicos em animais adultos e marcadores apoptóticos como p53, bax- α e capase-8 em larvas e adultos, além da análise de morte apoptótica por marcação fluorescente em larvas. Os resultados observados demonstraram um aumento da presença de monócitos em animais adultos tratados com a concentração de 2,0 mg/L NiCl₂ no tratamento agudo e subcrônico. Estes achados podem estar relacionados a algum efeito inflamatório causado pela exposição ao metal. Em peixes, sabe-se que a exposição a metais afeta a hematologia e a osmoregulação dos animais. Especificamente, peixes expostos a concentrações relativamente elevadas de níquel na água tendem acumular no seu plasma, indicando que este metal pode atravessar o epitélio branquial e entrar na corrente sanguínea (Pane et al., 2006; Chowdhury et al., 2008). No organismo, o níquel é capaz de alterar vias imunológicas, principalmente através de alterações em monócitos (Lewis et al., 2009; Freitas e Fernandes, 2011; Li et al., 2012). Essas alterações estão intimamente relacionadas com alterações em citocinas, envolvidas em processos inflamatórios e também na carcinogênese.

Além das alterações hematológicas, a indução a morte celular e diversas modificações celulares e moleculares, compreendendo alterações no SNC, têm sido descritas (Kang et al., 2006, 2007; Slotkin e Seidler, 2009; Xu et al., 2010; Nosal et al., 2013; Xu et al., 2015). Nesse sentido, analisamos se a exposição ao níquel poderia alterar níveis proteicos de marcadores apoptóticos. Diferente de outros achados, os resultados obtidos não confirmaram essa relação. Entretanto, a marcação com fluorescência em larvas demonstrou um aumento significativo de morte em animais tratados de forma aguda na concentração de 15,0 mg/L. No tratamento subcrônico, aos 5 dpf, houve um aumento na concentração de 5,0 mg/L, em 8 dpf nas concentrações de 5,0 e 15,0 mg/L e em 11 dpf nas concentrações de 2,0 e 5,0 mg/L.

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que a exposição ao NiCl_2 induz alterações morfológicas e fisiológicas em embriões e larvas e mudanças comportamentais em diferentes estágios do desenvolvimento do peixe-zebra, o que pode ser explicado devido a efeitos neurotóxicos induzidos por este metal, uma vez que o níquel foi capaz de se acumular no SNC. Além disso, essas alterações podem afetar significativamente a sobrevivência do peixe-zebra em habitats naturais e representam riscos para outros organismos aquáticos e também para outros vertebrados, uma vez que o níquel pode ser bioacumulado e amplificado na cadeia alimentar.

5. PERSPECTIVAS

O SNC tem sido reportado como principal alvo da toxicidade de níquel, e evidências indicam que a exposição resulta em uma variedade de sintomas neurológicos em humanos (Das et al., 2008). Além disso, os metais são capazes de causar lesões no cérebro, especialmente se a exposição acontecer durante o início do período de desenvolvimento (Coddou et al., 2005; Grandjean e Landrigan, 2006). Se os processos de desenvolvimento do sistema nervoso imaturo são prejudicados, os efeitos podem ser duradouros e permanentes, levando a déficits na capacidade mental e desordens comportamentais (Andersen et al., 2000; Grandjean e Landrigan, 2006; Hu et al., 2006; Huizink e Mulder, 2006; Slotkin e Seidler, 2009). Portanto, como perspectivas, pretendemos estudar as alterações sobre parâmetros neuroquímicos relacionados aos sistemas de sinalização, como o sistema purinérgico.

O sistema purinérgico desempenha um importante papel na neurotransmissão e na neuromodulação, e é caracterizado pela ação de adenosina 5'-trifosfato (ATP) e adenosina (ADO) nos purinoreceptores P2 e P1, respectivamente (Burnstock, 1976). Os níveis dessas moléculas são regulados pela ação das ectonucleotidases, especialmente as nucleosídeo trifosfato difosfoidrolases (NTPDases) e a ecto-5'-nucleotidase, que catalisam a hidrólise do ATP a adenosina (Goding e Howard, 1998; Bonan et al., 2000; Robson et al., 2006). A adenosina pode ser desaminada a inosina pela ação da adenosina desaminase (ADA). Alguns trabalhos têm demonstrado que o sistema purinérgico pode ser alterado pela exposição a metais, o que torna relevante a avaliação dos possíveis efeitos causados pelo níquel (Coddou et al., 2005; Senger et al., 2006 a, b; Cruz et al., 2013; Gonçalves et al., 2013; Leite et al., 2013). Além disso, o níquel é capaz de causar alterações na liberação de ATP e atua sobre metaloenzimas (Xu et al., 2015; Zambelli et al., 2016). A ADA é uma metaloenzima que necessita de um cátion divalente (zinco ou cobalto) para sua atividade (Cristalli et al., 2001; Yegutkin et al., 2008). Embora, essa enzima não dependa de níquel, sabe-se que interações entre metais ocorrem e, nesse sentido o níquel possa ter uma atuação sobre esse sistema.

Portanto, entre as perspectivas deste estudo, destacamos:

- Avaliar o efeito da exposição aguda e subcrônica ao níquel sobre a atividade enzimática e expressão gênica das NTPDases, ecto-5-nucleotidase e adenosina desaminase em membranas encefálicas de peixe-zebra.
- Investigar o efeito da exposição aguda e subcrônica ao níquel sobre o metabolismo de ATP até inosina em encéfalo de peixe-zebra.

6. REFERÊNCIAS

- Agetsuma M, Aizawa H, Aoki T, Nakayama R, Takahoko M, Goto M, Sassa T, Amo R, Shiraki T, Kawakami K, Hosoya T, Higashijima S, Okamoto H. The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nat Neurosci.* 2010; 13: 1354-1356.
- Alsop D, Wood CM. Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: common mechanisms across multiple metals. *Aquat Toxicol.* 2011, 105: 385-393.
- Andersen HR, Nielsen JB, Grandjean P. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicology.* 2000; 144: 121-127.
- Anichtchik OV, Kaslin J, Peitsaro N, Scheinin M, Panula P. Neurochemical and behavioral changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem.* 2004; 88: 443–453.
- Aoki T, Kinoshita M, Aoki R, Agetsuma M, Aizawa H, Yamazaki M, Takahoko M, Amo R, Arata A, Higashijima S, Tsuboi T, Okamoto H. Imaging of neural ensemble for the retrieval of a learned behavioral program. *Neuron.* 2013; 78: 881-894.
- Apostoli P. Elements in environmental and occupational medicine. *J Chromatogr B.* 2002; 778: 63–97.
- Arellano JM, Storch V, Sarasquete C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol Environ Safety.* 1999; 44:62–72.
- Ariyomo TO, Carter M, Watt PJ. Heritability of boldness and aggressiveness in the zebrafish. *Behav Genet.* 2013; 43: 161-167.
- Arunachalam M, Raja M, Vijayakumar C, Malaiammal P, Mayden RL. Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish.* 2013; 10: 1-14.
- Asato N, Soestbergen Mv, Sunderman FW Jr. Binding of ⁶³Ni (II) to ultrafiltrable constituents of rabbit serum in vivo and in vitro. *Clin Chem.* 1975; 21: 521-527.
- Bailey SE, Olin TJ, Bricka RM, Adrian DD. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Research.* 1999; 33: 2469–2479.
- Barbazuc, W.B., Korf I., Kadavi C., Heyen J., Tate S., Wun E., Bedell J.A., McPherson J.D., Johnson S.L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 2000; 10: 1351–1358.
- Barceloux DG. Nickel. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1999; 37: 239-258.

- Bhandiwad AA, Zeddies DG, Raible DW, Rubel EW, Sisneros JA. Auditory sensitivity of larval zebrafish (*Danio rerio*) measured using a behavioral prepulse inhibition assay. *J Exp Biol.* 2013; 216: 3504-3513.
- Blader P, Strähle U. Zebrafish developmental genetics and central nervous system development. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 945–951.
- Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2009; 92: 529–34.
- Bonan CD, Amaral OB, Rockenbach IC, Walz R, Battastini AM, Izquierdo I, Sarkis JJ. Altered ATP hydrolysis induced by pentylentetrazol kindling in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res.* 2000; 25: 775-779.
- Brix KV, Keithly J, Deforest DK, Laughlin J. Acute and chronic toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem.* 2004; 23: 2221–2228.
- Brown PH, Welch RM and Cary EE. Nickel: A Micronutrient Essential for Higher Plants. *Plant Physiol.* 1987; 85: 801–803.
- Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol.* 1976; 62: 491–503.
- Buske C, Gerlai R. Shoaling develops with age in Zebrafish (*Danio rerio*). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011; 35: 1409-1415.
- Can M, Armstrong FA, Ragsdale SW. Structure, function, and mechanism of the nickel metalloenzymes, CO dehydrogenase, and acetyl-CoA synthase. *Chem Rev.* 2014; 23: 4149-4174.
- Cazan AM, Klerks PL. Effects from a short-term exposure to copper or cadmium in gravid females of the livebearer fish (*Gambusia affinis*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015; 118: 199-203.
- Cheng RK, Jesuthasan SJ, Penney TB. Zebrafish forebrain and temporal conditioning. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014; 20: 20120462.
- Chivers PT. Nickel recognition by bacterial importer proteins. *Metallomics.* 2015; 7: 590-595.
- Chowdhury MJ, Bucking C, Wood CM. Pre-exposure to waterborne nickel downregulates gastrointestinal nickel uptake in rainbow trout: indirect evidence for nickel essentiality. *Environ Sci Technol.* 2008; 42: 1359-1364.
- Clemente D, Porteros A, Weruaga E, Alonso JR, Arenzana FJ, Aijón J, Arévalo R. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: Histochemical and immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol.* 2004; 474: 75–107.

- Coddou C, Lorca RA, Acuña-Castillo C, Grauso M, Rassendren F, Huidobro-Toro JP. Heavy metals modulate the activity of the purinergic P2X4 receptor. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 15: 121-131.
- Cognato Gde P, Bortolotto JW, Blazina AR, Christoff RR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD: Y-maze memory task in zebrafish (*Danio rerio*): the role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. *Neurobiol Learn Mem*. 2012, 98:321-328.
- Colwill RM, Creton R. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behav Processes*. 2011; 86: 222-229.
- CONAMA resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf> Acesso em: 15 de janeiro de 2017.
- CONAMA resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11/propresol_lanceflue_30e31mar11.pdf> Acesso em: 15 de janeiro de 2017.
- Costa KM, Maciel IS, Kist LW, Campos MM, Bogo MR. Pharmacological Inhibition of CXCR2 Chemokine Receptors Modulates Paraquat-Induced Intoxication in Rats. *PlosOne*. 2014; 9 :1-12.
- Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R, Camaioni E. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev*. 2001; 21: 105-128.
- Cruz FF, Leite CE, Pereira TC, Bogo MR, Bonan CD, Battastini AM, Campos MM, Morrone FB. Assessment of mercury chloride-induced toxicity and the relevance of P2X7 receptor activation in zebrafish larvae. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2013; 158: 159-164.
- Das KK, Das SN, Dhundasi SA. Nickel, its adverse health effects e oxidative stress. *Indian J Med Res*. 2008; 128:412-425.
- Dave G, Xiu RQ. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *BrachyDanio rerio*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1991; 21: 126-134.
- de Esch C, Slieker R, Wolterbeek A, Woutersen R, de Groot D. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review. *Neurotoxicol Teratol*. 2012; 34: 545-553.
- Defo MA, Bernatchez L, Campbell PG, Couture P. Waterborne cadmium and nickel impact oxidative stress responses and retinoid metabolism in yellow perch. *Aquat Toxicol*. 2014; 154: 207-220.
- Denkhaus E, Salnikow K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002; 42: 35-56.

- Dixon NE, Gazzola TC, Blakeley RL, Zerner B. Letter: Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *J Am Chem Soc.* 1975; 9: 4131-4133.
- Dooley K., Zon L.I. Zebrafish: a model system for the study of human disease, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000; 10: 252–256.
- Eliceiri BP, Gonzalez AM, Baird A. Zebrafish model of the blood-brain barrier: morphological and permeability studies. *Methods Mol Biol.* 2011; 686: 371-378.
- Eskew DL, Welch RM, Cary EE. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. *Science.* 1983, 11: 621-623.
- Eskew DL, Welch RM, Norvell WA. Nickel in higher plants: further evidence for an essential role. *Plant Physiol.* 1984; 76: 691-693.
- Florea AM, Büsselberg D. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *BioMetals.* 2006; 19: 419–427.
- Formella I, Scott EK, Burne TH, Harms LR, Liu PY, Turner KM, Cui X, Eyles DW: Transient knockdown of tyrosine hydroxylase during development has persistent effects on behaviour in adult zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One.* 2012; 7: e42482.
- Freitas M, Fernandes E. Zinc, cadmium and nickel increase the activation of NF- κ B and the release of cytokines from THP-1 monocytic cells. *Metallomics.* 2011; 3: 1238-1243.
- Frisk P, Lindvall A, Hudecek R, Lindh U. Decrease of trace elements in erythrocytes and plasma after removal of dental amalgam and other metal alloys. *Biol Trace Elem Res.* 2006; 113: 247-259.
- Fullerton A, Andersen JR, Hoelgaard A, Menne T. Permeation of nickel salts through human-skin in vitro. *Contact Dermatitis.* 1986; 15: 173–177.
- Fulwiler C, Gilbert W. Zebrafish embryology and neural development. *Current Opinion in Cell Biology.* 1991; 3: 988-991.
- Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000; 67: 773-782.
- Gerlai R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behav Genet.* 2003; 33: 461-468.
- Gerlai R, Fernandes Y, Pereira T. Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: towards the development of an automated aversive task. *Behav Brain Res.* 2009; 201: 318-324.

- Gissi F, Stauber JL, Binet MT, Golding LA, Adams MS, Schlekot CE, Garman ER, Jolley DF. A review of nickel toxicity to marine and estuarine tropical biota with particular reference to the South East Asian and Melanesian region. *Environ Pollut.* 2016; 218: 1308-1323
- Goding JW, Howard MC. Ecto-enzymes of lymphoid cells. *Immunol Rev.* 1998; 161: 5-10.
- Gonçalves JF, Spanevello RM, Fiorenza AM, Mazzanti CM, Bagatini MD, da Rosa CS, Becker LV, da Costa P, Abdalla FH, Morsch VM, Schetinger MR. NTPDase and 5'-nucleotidase activities from synaptosomes and platelets of rats exposed to cadmium and treated with N-acetylcysteine. *Int J Dev Neurosci.* 2013; 31: 69-74.
- Gooneratne SR, Buckley WT, Christensen DA. A review of copper deficiency and metabolism in ruminants. *Canadian J. Animal Science.* 1989; 69: 819-845.
- Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol.* 2004; 4: 504-512.
- Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet.* 2006; 368: 2167-2178.
- Grunwald, DJ, Eisen, JS. Headwaters of the zebrafish-emergence of a new model vertebrate, *Nat. Rev., Genet.* 2002; 3: 717–724.
- Guo H, Deng H, Cui H, Peng X, Fang J, Zuo Z, Deng J, Wang X, Wu B, Chen K. Nickel chloride (NiCl₂)-caused inflammatory responses via activation of NF-κB pathway and reduction of anti-inflammatory mediator expression in the kidney. *Oncotarget.* 2015; 6: 28607-28620.
- He MD, Xu SC, Zhang X, Wang Y, Xiong JC, Zhang X, Lu YH, Zhang L, Yu ZP, Zhou Z. Disturbance of aerobic metabolism accompanies neurobehavioral changes induced by nickel in mice. *Neurotoxicology.* 2013; 38: 9-16.
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 2005; 86: 6-19.
- Hjorth J, Key B. Development of axon pathways in the zebrafish central nervous system. *Int. J. Dev. Biol.* 2002; 46: 609-619.
- Hocking JC, Distel M, Köster RW. Studying cellular and subcellular dynamics in the developing zebrafish nervous system. *Exp Neurol.* 2013; 242; 1–10.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013; 496: 498–503.
- Hu H, Téllez-Rojo MM, Bellinger D, Smith D, Ettinger AS, Lamadrid-Figueroa H, Schwartz J, Schnaas L, Mercado-García A, Hernández-Avila M. Fetal lead

- exposure at each stage of pregnancy as a predictor of infant mental development. *Environ Health Perspect.* 2006; 114: 1730-1735.
- Huizink AC, Mulder EJ. Maternal smoking, drinking or cannabis use during pregnancy and neurobehavioral and cognitive functioning in human offspring. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006; 30: 24-41.
- Hussainzada N, Lewis JA, Baer CE, Ippolito DL, Jackson DA, Stallings JD. Whole adult organism transcriptional profiling of acute metal exposures in male Zebrafish. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2014; 15:15.
- Issa Y, Brunton P, Waters CM, Watts DC. Cytotoxicity of metal ions to human oligodendroglial cells and human gingival fibroblasts assessed by mitochondrial dehydrogenase activity. *Dent Mater.* 2008; 24: 281-287.
- Iyengar GV, Nair PP. Global outlook on nutrition and the environment: meeting the challenges of the next millennium. *Sci Total Environ.* 2000; 17: 331-346.
- Jaleel Tariq M, Ashraf M, Jaffar M, Afzal M. Pollution status of the Indus River, Pakistan, through heavy metal and macronutrient contents of fish, sediment and water. *Environ Monit Assess.* 1996; 6: 1337-1344.
- Jaun B, Thauer RK. Methyl-coenzyme M reductase and its nickel Cofactor F430. *Met. Ions Life Sci.* 2007; 2: 323–356.
- Jeong JY, Kwon HB, Ahn JC, Kang D, Kwon SH, Park JA, Kim KW. Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. *Brain Res Bull.* 2008; 28: 619-628.
- Jia J, Fernandes Y, Gerlai R: Short-term memory in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2014; 270:29-36.
- Kalueff AV, Gebhardt M, Stewart AM, Cachat JM, Brimmer M, Chawla JS, Craddock C, Kyzar EJ, Roth A, Landsman S, Gaikwad S, Robinson K, Baatrup E, Tierney K, Shamchuk A, Norton W, Miller N, Nicolson T, Braubach O, Gilman CP, Pittman J, Rosemberg DB, Gerlai R, Echevarria D, Lamb E, Neuhauss SC, Weng W, Bally-Cuif L, Schneider H; Zebrafish Neuroscience Research Consortium. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish.* 2013; 10: 70-86.
- Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2014; 35: 63–75
- Kang HW, Park JY, Jeong SW, Kim JA, Moon HJ, Perez-Reyes E, Lee JH. A molecular determinant of nickel inhibition in Cav3.2 T-type calcium channels. *J Biol Chem.* 2006; 281: 4823–4830.
- Kang HW, Moon HJ, Joo SH, Lee JH. Histidine residues in the IS3-IS4 loop are critical for nickel-sensitive inhibition of the Cav2.3 calcium channel. *FEBS Lett.* 2007; 581: 5774–5780.

- Karlovich CA, John RM, Ramirez L, Stainier DY, Myers RM. Characterization of the Huntington's disease (HD) gene homologue in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene*. 1998; 217: 117-125.
- Kienle C, Köhler HR, Filser J, Gerhardt A. Effects of nickel chloride and oxygen depletion on behavior and vitality of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) (Pisces, *Cypriniformes*) embryos and larvae. *Environ Pollut*. 2008; 152: 612e620.
- Kienle C, Köhler HR, Gerhardt A. Behavioural and developmental toxicity of chlorpyrifos and nickel chloride to Zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2009; 72: 1740–1747.
- Ku T, Yan W, Jia W, Yun Y, Zhu N, Li G, Sang N. Characterization of synergistic embryotoxicity of nickel and buprofezin in zebrafish. *Environ Sci Technol*. 2015; 7: 4600-4608.
- Legradi J, el Abdellaoui N, van Pomeran M, Legler J. Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015; 22: 16277-16289.
- Leite CE, Maboni Lde O, Cruz FF, Rosemberg DB, Zimmermann FF, Pereira TC, Bogo MR, Bonan CD, Campos MM, Morrone FB, Battastini AM. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013; 1: 681-689.
- Lele, Z., Krone, P.H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnolgy Advances* 1996; 14, 57–72.
- Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav*. 2007; 90: 54-58.
- Lewis KE, Eisen JS. From cells to circuits: development of the zebrafish spinal cord. *Prog Neurobiol*. 2003; 69: 419–449.
- Lewis JB, Messer RL, Pitts L, Hsu SD, Hansen JM, Wataha JC. Ni(II) ions dysregulate cytokine secretion from human monocytes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 88: 358-365.
- Li L, Wataha JC, Cate C, Zhang H, DiJulio D, Chung WO. Ni(II) alters the NFκB signaling pathway in monocytic cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012; 100: 934-939.
- Li N, Tian Y, Zhang J, Zuo W, Zhan W, Zhang J. Heavy metal contamination status and source apportionment in sediments of Songhua River Harbin region, Northeast China. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016.
- Lillesaar C, Stigloher C, Tannhauser B, Wullmann MF, Bally-Cuif L. Axonal projections originating from raphe serotonergic neurons in the developing

and adult zebrafish, *Danio rerio*, using transgenics to visualize raphe-specific pet1 expression. *J Comp Neurol*. 2009; 512: 158–182.

Lubitz W, Ogata H, Rüdiger O, Reijerse E. Hydrogenases. *Chem Rev*. 2014; 23: 4081-148.

Mance, G. Pollution threat of heavy metals in aquatic environments. London Elsevier Applied Science. 1990; 372.

Marcato ACC, Yabuki AT, Fontanetti CS. Nickel exposure promotes osmoregulatory disturbances in *Oreochromis niloticus* gills: histopathological and energy dispersive spectrometry analysis. *Environ Sci Pollut Res*. 2014; 21: 13095–13102.

Marchetti C. Interaction of metal ions with neurotransmitter receptors and potential role in neurodiseases. *Biometals*. 2014; 27: 1097–1113.

Maroney MJ, Ciurli S. Nonredox nickel enzymes. *Chem Rev*. 2014; 23: 4206-4228.

Martinez CBR, Nagae MY, Zaia CTBV, Zaia DAM. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz J Biol*. 2004; 64: 797–807.

McDermott S, Salzberg DC, Anderson AP, Shaw T, Lead J. Systematic Review of Chromium and Nickel Exposure During Pregnancy and Impact on Child Outcomes. *J Toxicol Environ Health A*. 2015; 78: 1348-1368.

Moore JW, Ramamoorthy S. Heavy metals in natural Waters. Berlin: Springer-Verlag. 1984; 268.

Mouser J. New drugs for management of diabetes: insulin analogues, inhaled insulin, pramlintide, and novel peptides. *Nutr Clin Pract*. 2004; 19: 172-180.

Muñoz A, Costa M. Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: a review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2012; 260: 1–16.

Navarro Silvera SA, Rohan TE. Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer Causes Control*. 2007; 18: 7-27.

Nery LR, Eltz NS, Hackman C, Fonseca R, Altenhofen S, Guerra HN, Freitas VM, Bonan CD, Vianna MRMR. Brain intraventricular injection of amyloid-b in zebrafish embryo impairs cognition and increases Tau phosphorylation, effects reversed by lithium. *PLoS One*. 2014; 9: e105862.

Nielsen FH, Ollerich DA. Proceedings: Nickel: a new essential trace element. *Fed Proc*. 1974; 33: 1767-1772.

- Niu Y, Niu Y, Pang Y, Yu H. Assessment of Heavy Metal Pollution in Sediments of Inflow Rivers to Lake Taihu, China. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2015; 95: 618-623.
- Norton WHJ, Stumpfenhorst K, Faus-Kessler T, Folchert A, Rohner N, Harris MP, Callebert J, Bally-Cuif L: Modulation of Fgfr1a signaling in zebrafish reveals a genetic basis for the aggression-boldness syndrome. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2011; 31: 13796-13807.
- Nosal OV, Lyubanova OP, Naidenov VG, Shuba YM. Complex modulation of Ca(v)3.1 T-type calcium channel by nickel. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70: 1653-1661.
- Ogawa S, Nathan FM, Parhar IS: Habenular kisspeptin modulates fear in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111: 3841-3846.
- Padilla S, Corum D, Padnos B, Hunter DL, Beam A, Houck KA, Reif DM. Zebrafish developmental screening of the ToxCast™ Phase I chemical library. *Reprod Toxicol (Elmsford NY)*. 2012; 33: 174–187.
- Pane EF, McDonald MD, Curry HN, Blanchard J, Wood CM, Grosell M. Hydromineral balance in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) exposed to waterborne or infused nickel. *Aquat Toxicol*. 2006; 80: 70-81.
- Parker MO, Annan LV, Kanellopoulos AH, Brock AJ, Combe FJ, Baiamonte M, Teh MT, Brennan CH. The utility of zebrafish to study the mechanisms by which ethanol affects social behavior and anxiety during early brain development. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014; 3: 94-100.
- Pasanen K, Pukkala E, Turunen AW, Patama T, Jussila I, Makkonen S, Salonen RO, Verkasalo PK. Mortality among population with exposure to industrial air pollution containing nickel and other toxic metals. *J Occup Environ Med*. 2012; 54: 583-591.
- Pelkowski SD, Kapoor M, Richendrfer HA, Wang X, Colwill RM, Creton R. A novel high-throughput imaging system for automater analyses of avoidance behavior in zebrafish larvae. *Behav Brain Res*. 2011; 223: 135–144.
- Pereira VM, Bortolotto JW, Kist LW, Azevedo MB, Fritsch RS, Oliveira Rda L, Pereira TC, Bonan CD, Vianna MR, Bogo MR. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology*. 2012; 33: 469-475.
- Powers DA. Fish as model systems. *Science*. 1989; 246: 352–358.
- Rand GM, Petrocelli RS. *Fundamental of aquatic toxicology: methods and applications*. Washington: Hemisphere Publishing Corporation. 1985; 656.

- Randi AS, Monserrat JM, Rodriguez EM, Romano LA. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, *Atherinidae*). *J Fish Dis*. 1996; 19: 311–322.
- Reddy UA, Prabhakar PV, Rao GS, Rao PR, Sandeep K, Rahman MF, Kumari SI, Grover P, Khan HA, Mahboob M. Biomarkers of oxidative stress in rat for assessing toxicological effects of heavy metal pollution in river water. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015; 22: 13453-13463.
- Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol*. 2011; 33: 608-617.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2006; 2: 409-430.
- Saito M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Molecular Mechanisms of Nickel Allergy. *Int J Mol Sci*. 2016; 2: E202.
- Schaumlöffel D. Nickel species: analysis and toxic effects. *J Trace Elem Med Biol*. 2012; 26: 1-6.
- Scheil V, Köhler HR. Influence of nickel chloride, chlorpyrifos, and imidacloprid in combination with different temperatures on the embryogenesis of the zebrafish *Danio rerio*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2009; 56: 238-243.
- Scheil V, Zürn A, Köhler HR, Triebkorn R. Embryo development, stress protein (Hsp70) responses, and histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to nickel chloride, chlorpyrifos, and binary mixtures of them. *Environ Toxicol*. 2010; 25: 83-93.
- Schweitzer J, Lohr H, Filippi A, Driever W. Dopaminergic and noradrenergic circuit development in zebrafish. *Dev Neurobiol*. 2012; 72: 256-68.
- Scott GR, Sloman KA. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat Toxicol*. 2004; 68: 369-392.
- Seibt KJ, Oliveira RL, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Antipsychotic drugs inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23: 78-82.
- Senger MR, Rico EP, de Bem Arizi M, Frazzon AP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Exposure to Hg²⁺ and Pb²⁺ changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology*. 2006a; 226: 229-237.
- Senger MR, Rosemberg DB, Rico EP, de Bem Arizi M, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and

ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicol In Vitro*. 2006b; 20: 954-958.

Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M, Valentine JS. Superoxide dismutases and superoxide reductases, *Chem. Rev.* 2014; 114: 3854–3918.

Siebel AM, Piatto AL, Capiotti KM, Seibt KJ, Bogo MR, Bonan CD. PTZ-induced seizures inhibit adenosine deamination in adult zebrafish brain membranes. *Brain Res Bull.* 2011; 86: 385-389.

Skerfving S, Bencko V, Vahter M, Schütz A, Gerhardsson L. Environmental health in the Baltic region--toxic metals. *Scand J Work Environ Health.* 1999; 25: 40-64.

Slotkin TA, Seidler FJ. Protein kinase C is a target for diverse developmental neurotoxicants: transcriptional responses to chlorpyrifos, diazinon, dieldrin and divalent nickel in PC12 cells. *Brain Res.* 2009; 31: 23-32.

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

Srinivasan JT, Reddy VR. Impact of irrigation water quality on human health: a case study in India. *Ecol Econ.* 2009; 68: 2800–2807.

Stainier DY, Lee RK, Fishman MC. Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Development.* 1993 ;119: 31-40.

Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, Gerlai R, Kalueff AV. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci.* 2014; 37: 264–278.

Stewart AM, Ullmann JF, Norton WH, Parker MO, Brennan CH, Gerlai R, Kalueff AV. Molecular psychiatry of zebrafish. *Mol Psychiatry.* 2015; 20: 2-17.

Sunderman FW Jr. Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals. *Ann Clin Lab Sci.* 2001; 31: 3–24.

Taylor MR, Hurley JB, Van Epps HA, Brockerhoff SE. Zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 4584-4589.

Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity and the environment. *EXS.* 2012; 101: 133-164.

Tjalve H, Henriksson J. Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *Neurotoxicology* 1999; 20: 181–195.

- Ton C, Lin Y, Willett C. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol*. 2006; 76: 553–567.
- Trotter AJ, Parslow AC, Heath JK. Morphologic analysis of the zebrafish digestive system. *Methods Mol Biol*. 2009; 546: 289-315.
- Tucker B, Lardelli M. A rapid apoptosis assay measuring relative acridine orange fluorescence in zebrafish embryos. *Zebrafish*. 2007; 4: 113-116.
- Umans RA, Taylor MR. Zebrafish as a model to study drug transporters at the blood-brain barrier. *Clin Pharmacol Ther*. 2012; 92: 567-570.
- Valente A, Huang K-H, Portugues R, Engert F: Ontogeny of classical and operant learning behaviors in zebrafish. *Learn Mem Cold Spring Harb NY*. 2012, 19: 170-177.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD: Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005; 12: 1161–1208.
- Van Soestbergen M, Sunderman FW Jr. ⁶³Ni complexes in rabbit serum and urine after injection of ⁶³NiCl₂. *Clin Chem*. 1972; 18: 1478-1484.
- Villanueva SF, Botello AV. Metal pollution in coastal areas of Mexico. *Rev Environ Contam Toxicol*. 1998; 157: 53-94.
- Wang S, Shi X. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem*. 2001; 222: 3–9.
- Wang AJ, Kawser A, Xu YH, Ye X, Rani S, Chen KL. Heavy metal accumulation during the last 30 years in the Karnaphuli River estuary, Chittagong, Bangladesh. *Springerplus*. 2016; 6: 2079.
- Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. Eugene: university of Oregon Press. <http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html> Accessado em: 08 de janeiro de 2017.
- Wu B, Guo H, Cui H, Peng X, Fang J, Zuo Z, Deng J, Wang X, Huang J. Pathway underlying small intestine apoptosis by dietary nickel chloride in broiler chickens. *Chem Biol Interact*. 2016; 5: 91-106.
- Xu SC, He MD, Zhong M, Zhang YW, Wang Y, Yang L, Yang J, Yu ZP, Zhou Z. Melatonin protects against Nickel-induced neurotoxicity in vitro by reducing oxidative stress and maintaining mitochondrial function. *J Pineal Res*. 2010; 49: 86-94.
- Xu S, He M, Zhong M, Li L, Lu Y, Zhang Y, Zhang L, Yu Z, Zhou Z. The neuroprotective effects of taurine against nickel by reducing oxidative stress and maintaining mitochondrial function in cortical neurons. *Neurosci Lett*. 2015; 17: 52-57.

- Yegutkin G, Bodin P, Burnstock G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 2000; 129: 921-926.
- Zambelli B, Uversky VN, Ciurli S. Nickel impact on human health: An intrinsic disorder perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1864: 1714-1731.
- Zang L, Shimada Y, Nishimura Y, Tanaka T, Nishimura N. A novel, reliable method for repeated blood collection from aquarium fish. *Zebrafish*. 2013; 10: 425-432.
- Zhao J, Shi X, Castranova V, Ding M. Occupational toxicology of nickel and nickel compounds. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2009; 28: 177-208.
- Zheng GH, Liu CM, Sun JM, Feng ZJ, Cheng C. Nickel-induced oxidative stress and apoptosis in *Carassius auratus* liver by JNK pathway. *Aquat Toxicol*. 2014; 147: 105-111.
- Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta*. 2008; 14: 135-150.

7. ANEXO



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 62/2015 - CEUA

Porto Alegre, 09 de setembro de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

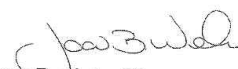
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00463, intitulado **“Exposição aguda e subcrônica ao níquel em zebrafish (Danio rerio): avaliação de parâmetros neuroquímicos e comportamentais”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
3.686	Danio rerio	09/2015 – 09/2017

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Carla Denise Bonan

FABIO

Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512

CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: ceua@pucrs.br