



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



Efeitos tóxicos do cobre e atrazina, isolados e combinados, sobre dois modelos biológicos: microalga e hepatócitos de *zebrafish* (ZF-L)

Nicole Soares Guidony Pereira

Orientador: Prof^a Dr^a Marta Marques de Souza

Rio Grande
2016



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



Efeitos tóxicos do cobre e atrazina, isolados e combinados, sobre dois modelos biológicos: microalga e hepatócitos de zebrafish (ZF-L)

Aluno: Nicole Soares Guidony Pereira

Orientador: Prof^a Dr^a Marta Marques de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Marta por me orientar de verdade, pelos puxões de orelha merecidos e pelos ensinamentos recebidos ao longo do mestrado.

Agradeço minha família por todo apoio, compreensão e carinho, meus pais Aluizio e Saionara e avós Mathilde e Nemo por todo suporte e amor que recebi/recebo.

Agradeço ao meu namorado Julian por toda paciência nos momentos tensos, apoio, carinho e pela tradução do resumo.

Agradeço aos amigos (os antigos e os que fiz ao longo do mestrado), e peço desculpas pela ausência nesse período de tempo.

Agradeço a Fernanda pela ajuda no microscópio de fluorescência.

Agradeço ao Pablo, técnico do Laboratório de Cultivos de Microalgas, pela paciência em me ensinar a cuidar das microalgas.

Agradeço as agências de fomento (CNPq INCT-TA) pelo apoio financeiro para que esse estudo pudesse ser realizado.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudo.

RESUMO

Ambientes dulcícolas recebem influência de contaminantes provenientes das atividades antrópicas, como a agricultura e a indústria. Diferentes contaminantes podem se encontrar no ambiente aquático através de processos naturais, como a lixiviação. O objetivo desse estudo foi verificar a citotoxicidade da atrazina e do cobre, isolados e associados, em hepatócitos de *zebrafish* (ZF-L) e na microalga *Desmodesmus communis*. Para verificar a citotoxicidade dos contaminantes em ZF-L foram avaliados a integridade lisossomal e a funcionalidade mitocondrial (esta apenas na mistura). Na microalga foram avaliadas a integridade da membrana e a funcionalidade mitocondrial, além da atividade das proteínas ABC (ABCB e ABCC) na extrusão dos contaminantes. Foi observada citotoxicidade da atrazina e do cobre em ZF-L de 4 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. E para microalga, apenas atrazina 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e cobre 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foram citotóxicas. Nos hepatócitos a mistura de atrazina 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e cobre 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi citotóxica, sendo a integridade lisossomal mais sensível em apontar a citotoxicidade. Quanto à mistura para microalgas de atrazina 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ cobre foram citotóxicas. Nas microalgas, a integridade da membrana foi mais sensível em cobre, enquanto a funcionalidade mitocondrial em atrazina e na mistura. Assim, relacionando a sensibilidade do alvo, natureza do contaminante e o tipo celular. As proteínas ABC nas microalgas expostas aos contaminantes, separados e em mistura, mostraram-se ativas (exceto atrazina 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Os resultados indicam uma relação negativa entre defesa celular e citotoxicidade, e a P-gp é uma via de extrusão importante. Concluindo, para ZF-L e microalgas, ambos contaminantes foram citotóxicos. Para as microalgas, a citotoxicidade dos contaminantes está relacionada com a falta de capacidade de defesa das microalgas. Concentrações dos contaminantes que não apresentem citotoxicidade, já evidenciam atividade das proteínas de extrusão de xenobióticos, apontando o mecanismo como biomarcador de defesa celular.

Palavras-chave: *Desmodesmus communis*, citotoxicidade, proteína ABC, herbicida, metal, defesa celular.

ABSTRACT

Freshwater environments are influenced by contaminants from human activities, such as agriculture and industry. Different contaminants can be found in the aquatic environment through natural processes, like lixiviation. The goal of this study was to verify the cytotoxicity of atrazine and copper, both isolated and associated, in *zebrafish* (ZF-L) hepatocytes and in the *Desmodesmus communis* microalgae. Lysosomal integrity and mitochondrial function (the latter only in the mixture) were assessed to verify the cytotoxicity of the ZF-L contaminants. In the microalgae, both membrane integrity and mitochondrial function were assessed; besides the ABC proteins activity (ABCB and ABCC) in the extrusion of contaminants. Cytotoxicity of atrazine and copper was observed in ZF-L of 4 and 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectively. With the microalgae, on the other hand, only atrazine 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and copper 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ were shown to be cytotoxic. In the hepatocytes, the 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ atrazine and 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ copper mixture was cytotoxic; with the lysosomal integrity being more sensitive in pointing cytotoxicity. The microalgae mixture of atrazine 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ copper was shown to be cytotoxic. In the microalgae, the membrane integrity was more sensitive in copper, whilst mitochondrial activity was sensitive in atrazine and in the mixture, thus relating the sensibility of the target with, both the nature of the contaminant, and the cell type. The ABC proteins in the microalgae exposed to the contaminants, separated and in the mixture, were shown to be active (except 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ atrazine). The results indicated a negative relation between cell defense and cytotoxicity, with the P-gp being an important extrusion means. In a nutshell, to the ZF-L and microalgae, both contaminants were shown to be cytotoxic. To the microalgae, the cytotoxicity of contaminants is related to the lack of defense capacity of microalgae. Contaminant concentrations that do not show cytotoxicity, already show activity in the proteins of xenobiotics extrusion, indicating the mechanism as a biomarker of cell defense.

Key-words: *Desmodesmus communis*, cytotoxicity, ABC protein, herbicide, metal, cell defense.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	5
INTRODUÇÃO GERAL	6
Origem de contaminação em ambientes aquáticos.....	6
1- Atrazina	7
2- Cobre.....	8
3- Mistura.....	9
4- Modelos experimentais	10
5- Ensaio de citotoxicidade	12
6- Defesa celular.....	13
8- Objetivos	14
CAPÍTULO 1-	21
1.1-Resumo	22
1.2-Introdução	22
1.3- Metodologia.....	24
1.3.1- Manutenção da Cultura Celular.....	24
1.3.2- Condições experimentais.....	24
1.3.3- Análise de Citotoxicidade	25
1.3.4- Análise estatística	26
1.4- Resultados.....	26
1.4.1- Integridade lisossomal.....	26
1.5- Discussão	31
1.7- Referências bibliográficas	33
CAPÍTULO 2-	37
2.1- Resumo.....	38
2.2- Introdução	39
2.3- Metodologia.....	40
2.3.1- Cultivo de microalga	40
2.3.3- Análise de Citotoxicidade	41
2.3.4- Resistência a multixenobióticos (MXR)- Atividade das proteínas de defesa.....	43
2.3.4- Análise estatística	44
2.4- Resultados.....	44
2.4.1- Citotoxicidade	44
2.4.1.1- Atrazina.....	44
2.4.1.2- Cobre.....	45

2.4.1.3- Mistura (Atrazina + Cobre).....	46
2.5- Discussão	50
2.6- Conclusão.....	54
2.7- Referências bibliográficas.....	55
DISCUSSÃO GERAL	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	7
FIGURA 2	11
FIGURA 3	11
FIGURA 4	12
FIGURA 5	14
FIGURA 6	27
FIGURA 7	28
FIGURA 8	29
FIGURA 9	30
FIGURA 10	31
FIGURA 11	45
FIGURA 12 (A) E (B)	46
FIGURA 13 (A) E (B)	47
FIGURA 14	50
FIGURA 15. ..	51
FIGURA 16 (A)E (B) ...	52

INTRODUÇÃO GERAL

1-Origem de contaminação em ambientes aquáticos

A economia do estado do Rio Grande do Sul (RS) baseia-se em grande parte na agropecuária, indústria e serviços (FEE 2012). Em relação a produção agrícola, os cultivos que geram mais riqueza para o Estado, são os de soja, arroz, fumo e milho (FEE 2015). A prática do cultivo de milho é importante para a economia do Estado, o qual ocupa o segundo lugar, em relação aos estados brasileiros, sendo progressivo o crescimento na produção no Estado. Em 2000, a área ocupada atingiu mais de 1,4 milhões de hectares, com produção de 3,9 milhões de toneladas, já no ano de 2013 cerca de 1,05 milhões de hectares de área cultivada, com uma produção de 5,4 milhões de toneladas (Embrapa 2014).

A falta de fiscalização pela legislação e o excesso dessas atividades podem ter interações negativas nos ambientes naturais. Altos índices de produção agrícola demandam um maior uso de agrotóxicos para controlar possíveis pragas que possam afetar as culturas, sendo que o Brasil possui o maior mercado consumidor de agrotóxicos dentre os países em desenvolvimento (Peres et al. 2007). Um dossiê realizado pela ABRASCO (Associação Brasileira de Saúde Coletiva) no ano de 2012 (Carneiro et al. 2015) constatou que o Estado do Rio Grande do Sul está entre os maiores consumidores de agrotóxicos.

Existem diversos tipos de agrotóxicos que são recomendados para plantação de milho, como por exemplo, fungicidas, inseticidas e herbicidas. Dentre os compostos, os princípios ativos mais utilizados são glifosato, carbofurano e atrazina. A função dos compostos é impedir o crescimento de ervas daninhas, a presença de insetos e outras pragas que possam causar dano à plantação (Rodrigues 2009).

Fatores climáticos, como pluviosidade e ventos, e estrutura do terreno, como por exemplos solos argilosos que possuem maior capacidade em reter agrotóxicos (Chelinho et al. 2012), são fatores que influenciam na contaminação da água (Spongberg e Martin-Hayden 1997).

No estado do Rio Grande do Sul, a Lagoa dos Patos acaba sofrendo contaminação pelos agrotóxicos utilizados nas plantações que ficam no entorno do estuário (Schwochow e Zamboni 2007). Além de agrotóxicos, outro problema é a contaminação por compostos inorgânicos pela indústria, no estado do Rio Grande do Sul, houve exploração mineral nas Minas do Camaquã. Esta foi uma atividade econômica que ocorreu por mais de um século, gerando uma alta contaminação por cobre na área. Esse metal acabou sendo lançado diretamente no Arroio João Dias, desaguando na Lagoa Dos Patos (Laybauer e Bidone 1998).

Na cidade de Rio Grande há uma forte presença da atividade industrial. Além de possuir o segundo maior porto do país, há uma concentração de indústrias de fertilizantes, refinaria, entre outras pequenas indústrias próximas ao estuário da Lagoa dos Patos. Niencheski e colaboradores (1994) estudaram a distribuição de metais traço particulados na Lagoa dos Patos e observaram que havia uma concentração significativa de cobre e chumbo na água, o que os autores concluíram que devia ser proveniente da atividade industrial na cidade do Rio Grande. Mirlean e colaboradores (2003a,b) pesquisaram fontes de poluição de metais no sedimento da Lagoa dos Patos e constataram uma alta contaminação por compostos inorgânicos e que tem origem industrial e doméstica. Tendo em vista que há a presença de diversos contaminantes no mesmo ambiente, estes podem se encontrar facilmente interagindo e tendo diferentes respostas.

2-Atrazina

A atrazina é um composto orgânico com a função de herbicida comumente utilizado no mundo inteiro (Silvestre et al. 2002), é usada no Rio Grande do Sul principalmente na cultura de milho e de cana-de-açúcar (Kleinschmitt et al. 2006) (Figura 1).

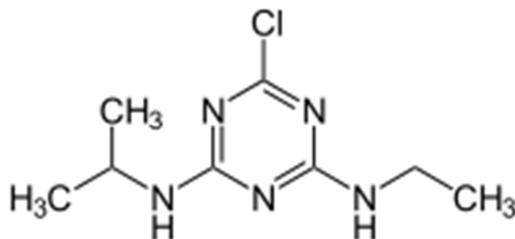


Figura 1 Biomolécula da atrazina
(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/6e/Atrazin.svg/200px-Atrazin.svg.png>)

Segundo IBGE (2013), dentre os agrotóxicos mais comprados no Brasil, a atrazina

está em terceiro lugar, sendo o glifosato em primeiro lugar e o 2,4-D em segundo. A atrazina age inibindo a cadeia de elétrons no fotossistema II, resultando no impedimento da fotossíntese, controlando o crescimento de ervas daninhas (Trebst et al. 1993). É um agrotóxico de classe III (ANVISA 2003), sendo considerado mediamente tóxico.

A presença da atrazina no ambiente pode gerar a bioacumulação nos tecidos gordurosos, devido à natureza lipofílica do contaminante (Eisler 1989). A ação da atrazina em exposição crônica foi estudado em um crustáceo de água doce, *Pseudosida ramosa*, e foi visto uma diminuição na fecundidade e produção de ovos (Freitas e Rocha 2012). O efeito tóxico da atrazina foi estudado em vários modelos animais, e parece ter como alvo principal o controle endócrino da reprodução. Em ratos expostos a atrazina, no trabalho de Stoker e colaboradores (2000), foi observado atraso da puberdade com a diminuição do hormônio luteinizante (LH). Entretanto, outros alvos têm sido reportados além do sistema reprodutor. Em caranguejos eurialinos foi observado que a exposição ao contaminante ocasionou um efeito danoso no epitélio das brânquias dos animais, causando um distúrbio na regulação iônica, baixando a concentração de íons (Silvestre et al. 2002). Além da atuação da atrazina quanto a danos fisiológicos, histológicos e bioquímicos, também há trabalhos que apontam dano de DNA (Santos e Martinez 2012). Zhu e colaboradores (2011) observaram genotoxicidade em machos e fêmeas de *zebrafish* com o aumento da concentração de atrazina.

Efeitos citotóxicos da atrazina foram analisados em células da epiderme da carpa do limo, que é um peixe de água doce, o agrotóxico induz as células da linhagem ZC7901 a entrarem em apoptose, além de ter sido observado o aumento de espécies reativas de oxigênio (Liu et al. 2006). Em outro estudo foi observado estresse oxidativo em *zebrafish*, (peixe de água doce), Dong e colaboradores (2009) analisaram a ação do herbicida em relação às enzimas do complexo citocromo p450, as quais tiveram sua atividade significativamente estimulada. Blahová e colaboradores (2013) também observaram aumento de enzimas antioxidantes após uma exposição subcrônica de juvenis de *zebrafish* à atrazina.

3- Cobre

Cobre é um composto químico inorgânico, este metal é importante para diversas vias metabólicas dos organismos, porém em altas concentrações a presença do cobre pode ser tóxica. Diversos estudos apontam os efeitos que concentrações altas de cobre podem ter sobre uma variedade de organismos. Gomes e colaboradores (2011) observaram estresse oxidativo nas brânquias de moluscos devido à quebra do sistema de defesa antioxidante e

inibição da acetilcolinesterase. Em anfípoda o cobre teve o efeito de diminuir a taxa de sobrevivência, crescimento e reprodução (Prato et al. 2013). No estudo de linhagens de hepatócitos da truta arco-íris, foi observado efeito do metal causando dano na integridade das membranas, o que resultou na apoptose das células (Krumschnabel et al. 2010).

Em *zebrafish* foi feito um estudo sobre a ação de cobre no desenvolvimento embrionário, no entanto o cobre teve o efeito de alterar a linha lateral, comprometendo a sobrevivência do peixe (Johnson et al. 2007). No mesmo modelo utilizado neste estudo, Sandrini e colaboradores (2009) analisaram os efeitos do cobre em hepatócitos de *zebrafish* (ZF-L) através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a expressão de genes de reparo de DNA. O resultado obtido no trabalho foi de que o cobre em altas concentrações aumenta a presença de ROS intracelular, mostrando que houve stress oxidativo, porém no teste de expressão de genes reparadores de DNA não houve a indução através do cobre.

Apesar do cobre ser um micronutriente importante para o crescimento e metabolismo de algas, em concentrações altas pode inibir o crescimento dos organismos (Erickson 1972). Cid e colaboradores (1995) expuseram cobre (0.5 e 1 mg.l^{-1}) em microalgas marinhas e observaram que houve uma diminuição na taxa de fotossíntese e de crescimento dos organismos. Vendo que diferentes organismos sofrem efeitos frente a presença de altas concentrações de cobre, é interessante que haja o estudo da exposição do contaminante a modelos experimentais diferentes.

4- Mistura

A associação de contaminantes podem ter diferentes respostas, como por exemplo, por estarem no mesmo ambiente um herbicida pode ter efeitos variados na presença de um metal. Em um estudo que teve o objetivo de verificar o efeito tóxico do cobre, glifosato e dos dois compostos associados em minhocas, os autores observaram que quanto aos contaminantes isolados, no caso da exposição ao cobre a mortalidade era alta enquanto que o glifosato não causava mortalidade. No entanto, quando o herbicida era combinado com o cobre a mortalidade diminuía em relação à exposição isolada de cobre, o que os autores atribuíram à formação de complexos glifosato-cobre assim diminuindo os níveis de cobre livre, que se mostrou ser a forma tóxica às minhocas no estudo (Zhou et al., 2012).

Wen e colaboradores (2011) verificaram os efeitos de um agrotóxico organoclorado, de cobre e de ambos combinados em uma microalga. Realizaram testes para avaliar se havia diferença na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), na taxa de concentração de clorofila e de crescimento da alga. O resultado foi que quando os complexos metais-

herbicidas eram formados havia um aumento significativo de ROS, o que causava diminuição da concentração de clorofila e da taxa de crescimento. Os contaminantes isolados também causavam o mesmo dano, porém a associação do complexo favorecia uma forma mais danosa do herbicida.

A atrazina possui a capacidade de formar complexos junto com metais. Decock e colaboradores (1985) analisaram a formação de complexos estáveis entre s-triazinas e cobre, e mostraram a união do composto orgânico com o inorgânico, onde o anel de nitrogênio da triazina (Figura 3) é o principal sítio de ligação com cobre. Martin e colaboradores (1998) investigaram a interação entre a atrazina e metais. O resultado do trabalho mostra que a atrazina tem uma formação de complexos estáveis com cobre, zinco e cádmio, essa relação ocorre devido à substituição de uma molécula de água da esfera de solvatação. Em comunidades de microalga expostas aos contaminantes isolados e a mistura, os autores observaram que a atrazina não alterou a composição dos organismos enquanto o cobre reduziu o número de microalgas. No entanto, a mistura não teve efeito na comunidade de microalgas (Gustavsod e Wängberg 1995).

Alsop e Wood (2013) procuraram estabelecer relação tóxica entre fármacos e metais, analisando a mortalidade de larvas de *zebrafish*. No que concerne à toxicidade dos fármacos, apenas a fluoxetina em uma concentração alta (1,0 μ M) mostrou 100% de mortalidade, em contraponto com as concentrações menores (0,65 μ M; 0,5 μ M; 0,1 μ M; 0,05 μ M) que não levaram à mortalidade das larvas. O cobre e os outros metais testados separadamente tiveram apenas a diminuição de íons na larva (Na⁺ e K⁺). Entretanto, quando foi realizada a mistura com o cobre houve um aumento na mortalidade em todas as concentrações de fluoxetina, exceto na concentração de 0,05 μ M. No tratamento em que misturaram diversos fármacos não houve efeito, porém no grupo que houve a mistura dos compostos com o cobre, e havia 0,1 μ M de cada fármaco (no estudo foi observado outros fármacos além da fluoxetina), houve um aumento significativo na mortalidade.

5- Modelos experimentais

Sabendo que os contaminantes afetam todos os organismos presentes no ambiente aquático, é interessante que haja uma exploração de modelos experimentais para que se tenha uma ideia mais ampla dos efeitos que os contaminantes podem ter sobre diferentes grupos. No caso desse estudo, foi escolhido uma linhagem de células (ZF-L) e um organismo (microalga). Para esse estudo foram utilizados dois modelos celulares distintos, um foi a cultura estabelecida de hepatócitos de *zebrafish* (ZF-L). (Figura 2).

ATCC Number: **CRL-2643**
Designation: **ZFL**

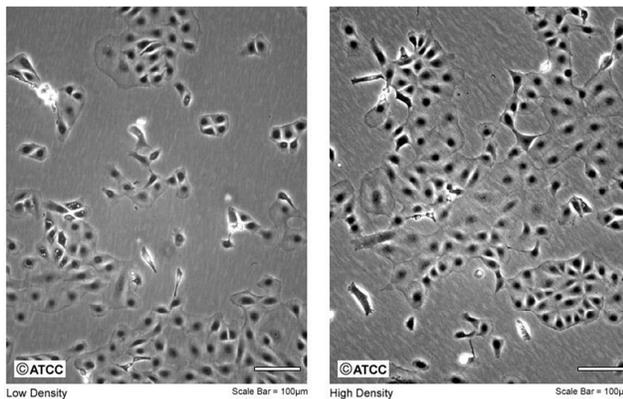


Figura 2 Cultura estabelecida de hepatócitos de zebrafish (foto retirada do site da ATCC)

A linhagem foi estabelecida a partir do peixe de água doce *zebrafish* (*Danio rerio*) da família Cyprinidae, possui um tamanho pequeno (3-5 cm) (Figura 3). O peixe *zebrafish*, teve seu genoma codificado e é visto como um modelo para estudos fisiológicos pois o animal possui um desenvolvimento rápido (Bopp et al. 2006).



Figura 3 Paulistinha (zebrafish) retirado de: aquariopeixes.com.br, acessado em: 02/04/2016

A cultura estabelecida de hepatócitos de *zebrafish* é amplamente utilizada em estudos toxicológicos. Em um estudo que procurou comparar a cultura primária de hepatócitos em relação à cultura estabelecida, (Eide et al. 2014) viram diferenças na expressão de várias proteínas entre os dois modelos, entretanto a linhagem mostrou-se válida para estudos toxicológicos. Outro modelo utilizado neste estudo foi a microalga *Desmodesmus communis* (Classe: Chlorophyceae; Ordem: Chlorococcales), que aparenta ser um agrupado de 2- 4 células (Figura 4).



Figura 4 Microalga *Desmodesmus communis*, foto própria retirada através do microscópio, aumento de 40x

Microalgas podem servir como um bioindicador da qualidade de ambientes aquáticos. Yang e colaboradores (2014) verificaram que *Chlorella vulgaris* pode ser utilizada para monitoração de zinco em ambientes aquáticos, devido aos resultados que mostraram a habilidade da alga em se associar ao zinco e pela ativação de proteínas que detoxificam os metais.

Estudos demonstram a capacidade de biorremediação que algumas espécies podem realizar frente a um tipo de contaminante, como por exemplo, (González- Barreiro et al. 2006) verificou que uma microalga e cianobactéria conseguiram reduzir a contaminação de herbicidas triazínicos em água doce. Além disso, esses organismos possuem um crescimento rápido e fácil manutenção (An et al. 1999) facilitando a realização de trabalhos sobre toxicologia, e por serem microscópicas geram menos resíduos do que *in vivo*.

6- Ensaio de citotoxicidade

A utilização de testes *in vitro* possuem vantagens em relação aos realizados com animais, tanto pelo custo, a velocidade em que os resultados são obtidos. A legislação recomenda a utilização de ensaios *in vitro* por serem métodos alternativos que evitam a utilização de animais, e em caso de estudos toxicológicos reduz a produção de resíduos dos contaminantes (Rogerio et al. 2003). Os testes de citotoxicidade permitem que o pesquisador avalie os efeitos dos contaminantes a nível celular auxiliando a identificação do mecanismo de ação. Além disso, os estudos *in vitro* podem identificar variações de parâmetros da célula diante da exposição a poluentes que podem servir como biomarcadores celulares da contaminação (Van der Oost et al. 2003). Através dos

biomarcadores pode ser identificado se o contaminante está sendo citotóxico antes que haja outros sinais de estresse.

Existem na literatura ensaios para análise de diferentes parâmetros como, por exemplo, a membrana plasmática com o ensaio de exclusão do azul de trypan (Freshney 2005). Alguns têm como alvo a atividade de alguma enzima relacionada à viabilidade como o LDH que avalia a produção da enzima Lactato Desidrogenase, que é um indicador de dano na membrana celular (Fotakis e Timbrell 2006). Outros testes visam verificar a viabilidade de algumas organelas como a estabilidade do lisossomo (através do ensaio do vermelho neutro) (verifica) e a funcionalidade mitocondrial (através do MTT - (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide).

7- Defesa celular

Perante essa grande quantidade de agentes tóxicos que são despejados em ambientes aquáticos, os animais que vivem nesse meio podem ativar um potencial sistema de defesa celular chamado de MXR (*multixenobiotic resistance*) que faz o efluxo de substâncias prejudiciais à célula. Esse mecanismo foi descrito inicialmente em células tumorais de mamíferos, como sistema MDR (*multidrug resistance*). Este foi descoberto devido a tratamentos quimioterápicos que não obtiveram sucesso, uma vez que as células tumorais se tornavam resistentes às drogas, transportando-as para fora (Bard, 2000).

O sistema MXR atua utilizando energia (ATP) para transportar substratos contra o gradiente de concentração. Nesse sistema de defesa há duas proteínas, da super-família ABC (*ATP binding cassette*) que se destacam na importância desse mecanismo de defesa à contaminantes, uma é a proteína transmembrana a P-gp (P-glicoproteína) ou proteína ABCB, que faz a extrusão de substâncias estranhas sem modificá-las. E a outra é a MRP, ou ABCC, que necessita da biotransformação da substância para facilitar a extrusão (Gottesman e Pastan 1993, Bard, 2000).

Quando a P-gp não consegue eliminar todos compostos uma segunda linha de defesa é ativada, e enzimas do sistema de biotransformação iniciam a metabolização, que ocorre através da conjugação do xenobiótico com a glutatona. Essa conjugação ocorre em duas fases, a fase I onde ocorre a hidroxilação via a enzima citocromo P450 e o composto ainda é eliminado através da P-gp, e a fase II onde há a conjugação do xenobiótico com a glutatona. Quando ocorre a fase II o composto biotransformado é eliminado pela proteína abcc (Bard, 2000). (Figura 5)

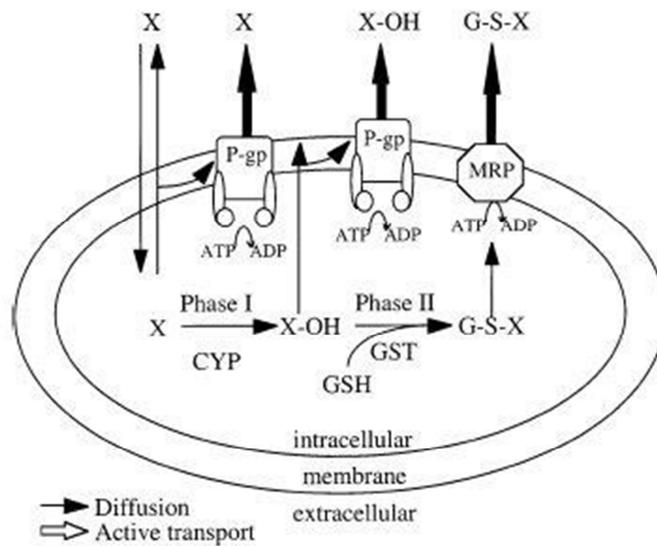


Figura 5 Esquema do funcionamento dos mecanismos de defesa das proteínas, quando um xenobiótico entra na célula. (Bard 2000).

O sistema MXR não é apenas encontrado em animais, diversos estudos conseguiram verificar a expressão dessas proteínas em células vegetais. Esse conjunto de proteínas começou a ficar em evidência após o sequenciamento genético da *Arabidopsis* (que tornou-se organismo modelo para pesquisas com plantas) onde foram observados genes ABC (AGI 2000). Sabe-se que há outras funções além da detoxificação vacuolar (Wanke e Ünner Kolukisaoglu 2010) com envolvimento das ABCs, como função transporte de íons, no crescimento e desenvolvimento da planta (Martinoia et al. 2002).

Existem poucos trabalhos sobre essas proteínas em células vegetais, logo é interessante haver mais estudos sobre seus mecanismos, ainda mais os relacionando a contaminantes que podem estar presente no ambiente. Na literatura, sabe-se que os compostos que não são metabolizados pela célula geralmente são transportados para fora via proteína ABCB e os que sofrem biotransformação seriam expulsos das células via ABCC. Estudar os métodos de defesa das células auxilia no entendimento do mecanismo de ação dos contaminantes e como essa defesa é eficiente contra as pressões impostas pelas atividades antrópicas.

8- Objetivos

O presente estudo foi dividido em dois capítulos, sendo o primeiro referente à citotoxicidade dos contaminantes atrazina e cobre (isolados e mistura) em hepatócitos de

zebrafish (ZF-L). No segundo capítulo também foi estudada a citotoxicidade dos dois contaminantes, porém o organismo utilizado foi a microalga *Desmodesmus communis*, e sua relação com a atividade das proteínas ABC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGI (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815. doi: 10.1038/35048692
- Alsop D, Wood CM (2013) Metal and pharmaceutical mixtures: Is ion loss the mechanism underlying acute toxicity and widespread additive toxicity in *zebrafish*? *Aquat Toxicol* 140-141:257–267. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.05.021
- An SS, Friedl T, Hegewald E (1999) Phylogenetic Relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like Coccoid Green Algae as Inferred from ITS-2 rDNA Sequence Comparisons. *Plant Biol* 1:418–428. doi: 10.1111/j.1438-8677.1999.tb00724.x
- ANVISA (2003) Agência Nacional de Vigilância Sanitária Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B4882-2-0%5D.PDF>
Acessado em: 3 abr 2016
- Bard S (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 48:357–389. doi: 10.1016/S0166-445X(00)00088-6
- Baxter L, Brain R, Prosser R, et al (2013) Sensitivity of a green alga to atrazine is not enhanced by previous acute exposure. *Environ Pollut* 181:325–328. doi: 10.1016/j.envpol.2013.06.019
- Bicudo CE de M, Menezes M (2006) Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. Rima, Sao Carlos. 508p
- Blahová J, Plhalová L, Hostovský M, et al (2013) Oxidative stress responses in *zebrafish* *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. *Food Chem Toxicol* 61:82–85. doi: 10.1016/j.fct.2013.02.041
- Bols NC, Dayeh VR, Lee LEJ, Schirmer K (2005) Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology*. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier, pp 43–84
- Bopp, S. K., Minuzzo, M., Lettieri, T. (2006). The *zebrafish* (*Danio rerio*): an emerging model organism in the environmental field. Institute for Environment and Sustainability, Joint Research Center, European Commission, European Communities, Luxembourg.

- Boudou A, Delarche A, Ribeyre F, Marty R (1979) Bioaccumulation and bioamplification of mercury compounds in a second level consumer, *Gambusia affinis*-temperature effects. Bull Environ Contam Toxicol 22:813–818. doi: 10.1007/BF02027030
- Campanella L, Cubadda F, Sammartino M., Saoncella A (2001) An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. Water Res 35:69–76. doi: 10.1016/S0043-1354(00)00223-2
- Carneiro, F. F., Rigotto, R. M., Augusto, L. G. D. S., Friedrich, K., Burigo, A. C. (2015). Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.
- Chelinho S, Moreira-Santos M, Silva C, et al (2012) Semifield testing of a bioremediation tool for atrazine-contaminated soils: Evaluating the efficacy on soil and aquatic compartments. Environ Toxicol Chem 31:1564–1572. doi: 10.1002/etc.1840
- Da Luz DS, Da Silva DG, Souza MM, et al (2016) Efficiency of Neutral Red, Evans Blue and MTT to assess viability of the freshwater microalgae *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum*: Methods to assess microalgae viability. Phycol Res 64:56–60. doi: 10.1111/pre.12114
- Decock P, Dubois B, Lerivrey J, et al (1985) Cu(II) binding by substituted 1, 3, 5-triazine herbicides. Inorganica Chim Acta 107:63–66. doi: 10.1016/S0020-1693(00)80691-X
- Dong X, Zhu L, Wang J, et al (2009) Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere 77:404–412. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.06.052
- EMBRAPA (2014) Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária Disponível em: <https://www.embrapa.br/> Acessado em: 3 abr 2016
- Eide M, Rusten M, Male R, et al (2014) A characterization of the ZFL cell line and primary hepatocytes as in vitro liver cell models for the zebrafish (*Danio rerio*). Aquat Toxicol 147:7–17. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.11.023
- Eisler R (1989) Atrazine Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. Laurel, MD
- Erickson, S.J. (1972) Toxicity of copper to *Thalassiosira pseudonana* in unenriched inshore seawater. J. Phycol. 8, 318-323.
- FEE (2012) Fundação da economia e estatística. Disponível em: <http://www.fee.rs.gov.br/> Acesso em: 15 abr 2016
- Fent K (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. Toxicol In Vitro 15:477–488. doi:

10.1016/S0887-2333(01)00053-4

- Fischer-Scherl T, Veerer A, Hoffmann RW, et al (1991) Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch Environ Contam Toxicol 20:454–461. doi: 10.1007/BF01065833
- Foradori CD, Hinds LR, Quihuis AM, et al (2011) The Differential Effect of Atrazine on Luteinizing Hormone Release in Adrenalectomized Adult Female Wistar Rats. Biol Reprod 85:684–689. doi: 10.1095/biolreprod.111.092452
- Fotakis G, Timbrell JA (2006) In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicol Lett 160:171–177. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.07.001
- Freitas EC, Rocha O (2012) Acute and chronic effects of atrazine and sodium dodecyl sulfate on the tropical freshwater cladoceran *Pseudosida ramosa*. Ecotoxicology 21:1347–1357. doi: 10.1007/s10646-012-0888-1
- Freshney RI (2005) General Textbooks and Relevant Journals. In: Culture of Animal Cells. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA,
- Gomes T, Pinheiro JP, Cancio I, et al (2011) Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. Environ Sci Technol 45:9356–9362. doi: 10.1021/es200955s
- González-Barreiro O, Rioboo C, Herrero C, Cid A (2006) Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. Environ Pollut 144:266–271. doi: 10.1016/j.envpol.2005.12.014
- Gottesman MM, Pastan I (1993) Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. Annu Rev Biochem 62:385–427. doi: 10.1146/annurev.bi.62.070193.002125
- Gustavson, K., & Wängberg, S. Å. (1995). Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. Aquatic Toxicology, 32(4), 283-302.
- IBAMA (2012) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3> Acessado em: 3 abr 2016
- IBGE- Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Indicadores de desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 3 abr. 2016.
- IBGE- Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Indicadores de desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em:

<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=774&z=p&o=8&i=P>
Acesso em : 3 abr. 2016.

- Johnson A, Carew E, Sloman K (2007) The effects of copper on the morphological and functional development of *zebrafish* embryos. *Aquat Toxicol* 84:431–438. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.07.003
- Kleinschmitt ARB, Dick DP, Selbach PA, Santos M dos (2006) Dessorção do herbicida atrazina e atividade microbiana em duas classes de solos do Estado do Rio Grande do Sul. *Ciênc Rural* 36:1794–1798. doi: 10.1590/S0103-84782006000600019
- Krumschnabel G, Ebner HL, Hess MW, Villunger A (2010) Apoptosis and necroptosis are induced in rainbow trout cell lines exposed to cadmium. *Aquat Toxicol* 99:73–85. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.04.005
- Laybauer, Luciano. (1998) Incremento de metais pesados na drenagem receptora de efluentes de mineração–Minas do Camaquã, Sul do Brasil. *RBRH*, v. 3, n. 3, p. 29-36.
- Liu X-M, Shao J-Z, Xiang L-X, Chen X-Y (2006) Cytotoxic effects and apoptosis induction of atrazine in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line. *Environ Toxicol* 21:80–89. doi: 10.1002/tox.20159
- Martin M, Hagege A, Brunette, J-P, Leroy M (1998) Use of synergistic extraction for the study of atrazine/metal interactions. *Anal Chim Acta* 373:161–165.
- Martinoia E, Klein M, Geisler M, et al (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters – more than just detoxifiers. *Planta* 214:345–355. doi: 10.1007/s004250100661
- Mathews T, Fisher NS (2008) Evaluating the trophic transfer of cadmium, polonium, and methylmercury in an estuarine food chain. *Environ Toxicol Chem* 27:1093. doi: 10.1897/07-318.1
- Mirlean, N., Andrus, V. E., Baisch, P. (2003a). Mercury pollution sources in sediments of Patos lagoon estuary, Southern Brazil. *Marine pollution bulletin*, 46(3), 331-334.
- Mirlean, N., Andrus, V. E., Baisch, P., Griep, G., Casartelli, M. R. (2003b). Arsenic pollution in Patos Lagoon estuarine sediments, Brazil. *Marine pollution bulletin*, 46(11), 1480-1484.
- Niencheski, L. F., Windom, H. L., Smith, R. (1994). Distribution of particulate trace metal in Patos Lagoon Estuary (Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, 28(2), 96- 102.
- Peres, F., & Moreira, J. C. (2007). Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Health, environment, and pesticide use in a farming area in Rio de Janeiro State, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 23(Sup 4), S612-S621.

- Prato E, Parlapiano I, Biandolino F (2013) Sublethal effects of copper on some biological traits of the amphipod *Gammarus aequicauda* reared under laboratory conditions. *Chemosphere* 93:1015–1022. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.071
- Rodrigues, L. R.; Guadagnin, J. P.; Porto, M. P.(2009) Indicações técnicas para o cultivo de milho e de sorgo no Rio Grande do Sul–Safras 2009/2010 e 2010/2011. Veranópolis: FEPAGRO-Serra.
- Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz ÁS (2003) Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mater Res* 6:317–320. doi: 10.1590/S1516-14392003000300003
- Sandrini JZ, Bianchini A, Trindade GS, et al (2009) Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquat Toxicol* 95:285–291. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.02.016
- Santos TG, Martinez CBR (2012) Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere* 89:1118–1125. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.05.096
- Schwochow, Rosane Quaresma; Zanboni, A. J. (2007) O Estuário da Lagoa dos Patos: um exemplo para o ensino de ecologia no nível médio. *Cadernos de Ecologia Aquática*, v. 2, n. 2, p. 13-27, 2007.
- Silvestre F, Trausch G, Spanò L, Devos P (2002) Effects of atrazine on osmoregulation in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 132:385–390. doi: 10.1016/S1532-0456(02)00090-X
- Spongberg AL, Martin-Hayden JM (1997) Pesticide Stratification in an Engineered Wetland Delta. *Environ Sci Technol* 31:3161–3165. doi: 10.1021/es970144m
- Stoker TE (2000) The Effect of Atrazine on Puberty in Male Wistar Rats: An Evaluation in the Protocol for the Assessment of Pubertal Development and Thyroid Function. *Toxicol Sci* 58:50–59. doi: 10.1093/toxsci/58.1.50
- Trebst A, Hilp U, Draber W (1993) Response in the inhibitor efficiency of substituted phenols on ps II activity in six mutants of the D1 protein subunit in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 33:969–977. doi: 10.1016/0031-9422(93)85006-D
- Van Der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v.13, p. 57-149. 2003

- Veiga, M. M., Silva, D. M., Veiga, L. B. E. de Castro Faria, M. V. (2006). Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil Pesticide pollution in water systems in a small rural community in Southeast Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 22(11), 2391-2399.
- Wanke D, Üner Kolukisaoglu H (2010) An update on the ABCC transporter family in plants: many genes, many proteins, but how many functions?: An update on the ABCC transporter family in plants. *Plant Biol* 12:15–25. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00380.x
- Wen Y, Chen H, Shen C, et al (2011) Enantioselectivity Tuning of Chiral Herbicide Dichlorprop by Copper: Roles of Reactive Oxygen Species. *Environ Sci Technol* 45:4778–4784. doi: 10.1021/es2003793
- Yang H, Huang Z-Y, Li J, Hu Y (2014) MT-like proteins: Potential bio-indicators of *Chlorella vulgaris* for zinc contamination in water environment. *Ecol Indic* 45:103–109. doi: 10.1016/j.ecolind.2014.03.017
- Zetsche E-M, Meysman FJR (2012) Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton. *J Plankton Res* 34:493–509. doi: 10.1093/plankt/fbs018
- Zhou C-F, Wang Y-J, Yu Y-C, et al (2012) Does glyphosate impact on Cu uptake by, and toxicity to, the earthworm *Eisenia fetida*? *Ecotoxicology* 21:2297–2305. doi: 10.1007/s10646-012-0986-0
- Zhu L, Dong X, Xie H, et al (2011) DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol* 26:480–488. doi: 10.1002/tox.2057

CAPÍTULO 1-

Citotoxicidade da atrazina e cobre (isolados e associados) em hepatócitos de *zebrafish*

(Manuscrito a ser submetido, para a revista *Canadian Journal of Zoology*)

Guidony, N.S^a, Souza, M.M^{a,b}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais,
Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande / RS, Brasil

^bInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande
/ RS, Brasil

1.1-Resumo

Atividades econômicas no entorno de corpos d'água podem gerar alto nível de contaminação na água. No Brasil, as principais atividades são agricultura e indústria, isso faz com que contaminantes diferentes possam estar presente no mesmo ambiente. Um herbicida mundialmente utilizado na agricultura é a atrazina. Quanto a resíduos industriais, estudos apontam a conseqüente presença de cobre no ambiente aquático. O objetivo desse estudo foi verificar a toxicidade da atrazina e do cobre (isolados e associados) em hepatócitos de *zebrafish*, através de dois parâmetros celulares a integridade lisossomal e funcionalidade mitocondrial, utilizando o modelo *in vitro* como ferramenta para análise da qualidade ambiental. Resultados indicam que os contaminantes nas concentrações estabelecidas pela legislação brasileira não causaram dano no lisossomo, apenas as maiores concentrações foram citotóxica para esse parâmetro (atrazina: 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e cobre 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$). O ensaio da integridade lisossomal foi mais sensível do que a funcionalidade mitocondrial para a mistura dos contaminantes, evidenciando que a mistura da atrazina 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ com o cobre 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi citotóxica. As maiores concentrações testadas para atrazina (20 $\mu\text{g.L}^{-1}$), cobre (90 $\mu\text{g.L}^{-1}$) isolados, foram citotóxicas. Em relação à mistura o teste mais sensível em identificar citotoxicidade foi a integridade lisossomal.

1.2-Introdução

Ambientes aquáticos costumam ser influenciados pela atividade humana, com a utilização de agrotóxicos para proteção da colheita contra possíveis pragas. A agricultura é uma atividade que contribui para a contaminação das águas. A atrazina é um herbicida mundialmente utilizado, sendo usado em plantações de milho e cana-de-açúcar, é considerado mediamente tóxico (ANVISA, 2003). O alvo do herbicida em relação as ervas-daninhas é a inibição da cadeia de elétrons no fotossistema II, resultando no impedimento da fotossíntese (Trebst et al., 1993). No entanto, a atrazina não atinge apenas as ervas-daninhas, classicamente, em organismos não alvos estudos correlacionam o herbicida com danos no sistema endócrino relacionado à reprodução de vertebrados, produção e eclosão de ovos (Kmetič et al., 2008; Tillitt et al., 2010; Foradori et al., 2011; Shenoy, 2012; Pogrmic-Majkic et al., 2014). No entanto outros efeitos tem sido descritos, como estresse oxidativo (Jin et al. 2010; Blahová et al. 2013) e ativação das enzimas do citocromo P450 (Dong et al. 2010; Fu et al. 2013).

Além da agricultura, a indústria é uma atividade que causa um impacto no ambiente,

através de seus resíduos, efluentes e vazamentos de substâncias tóxicas. Alguns trabalhos correlacionam a contaminação de metais nos ambientes com a atividade industrial. O cobre que é um metal essencial para os organismos, no entanto, em excesso pode ter um efeito tóxico para os animais (Olivares e Uauy, 1996). Em peixes (*in vivo* e *in vitro*) foram vistos efeitos relacionados a estresse oxidativo (Craig et al. 2007; Sandrini et al. 2009), entre outros. Esses efeitos podem levar à consequente diminuição de sobrevivência de embriões de peixes, como *zebrafish* (Johnson et al., 2007).

Com o fato de que diversas fontes de contaminação poder liberar resíduos no ambiente e de que fatores ambientais podem facilitar o “transporte” dos contaminantes através de processos como a lixiviação, pluviosidade, ventos ou até sendo retido no solo, os contaminantes podem alcançar o ambiente aquático (Spongberg e Martin-Hayden, 1997; Chelinho et al., 2012). Contaminantes de diferentes características químicas podem interagir no ambiente, sendo assim importante a realização de estudos sobre a associação destes compostos, pois sua mistura pode ter efeitos variados. O efeito de misturas já foi observado em alguns estudos toxicológicos comparando metais com herbicidas (Wen et al., 2011; Wang et al., 2015). Outro fator relevante é a formação de complexos entre contaminantes, a atrazina possui a capacidade de formar complexos junto com metais (Decock et al., 1985; Martin et al., 1998). Diante de diferentes interações que os contaminantes podem ter, é pertinente que haja estudos relacionados com o efeito da mistura nos organismos.

Estudos *in vitro* apresentam vantagens como: geração de pouco resíduo, a facilidade de reproduzir os experimentos (variáveis controladas em ambiente de laboratório), relativo baixo custo e resultado rápido (Bols et al., 2005). A legislação brasileira sugere o uso de experimentação *in vitro* para estudos toxicológicos como um método alternativo relacionado aos experimentos *in vivo*. Neste estudo, foi utilizada a linhagem estabelecida de hepatócitos de *zebrafish* (ZF-L) para estudar a citotoxicidade dos contaminantes.

Presumindo que contaminantes podem interagir no ambiente e podem afetar diferentes alvos no organismo, o objetivo do presente estudo foi verificar a citotoxicidade da atrazina e do cobre separados, e em mistura sobre hepatócitos de *zebrafish*, em cultura. Para verificar a citotoxicidade dos contaminantes isolados foi utilizado como parâmetro a integridade lisossomal, enquanto que no estudo da mistura foi investigado a viabilidade de dois alvos celulares através da integridade lisossomal e funcionalidade da mitocôndria. Espera-se que as concentrações ditas como seguras pela legislação brasileira não

apresentem citotoxicidade, enquanto que concentrações maiores sejam citotóxicas. Em relação à mistura, espera-se que haja uma interação entre os contaminantes alterando o observado nos ensaios de exposição aos contaminantes isolados.

1.3- Metodologia

1.3.1- Manutenção da Cultura Celular

Foram utilizadas culturas estabelecidas de hepatócitos de *zebrafish* (ZF-L), obtidas da Coleção Americana – *American Type culture collection* (ATCC) e depositadas no Banco de Células do Rio de Janeiro - UFRJ, as células foram mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (10%), antibiótico (penicilina e estreptomicina) e antimicótico (1%), a temperatura de 28°C.

As células foram repicadas 2 vezes por semana, sendo que antes da preparação da placa para experimento, era retirada uma alíquota de células da garrafa e verificada a viabilidade de acordo com a membrana celular, através da metodologia do azul de *trypan* (0,08%). Atingindo 95% de viabilidade, as células eram colocadas em uma placa de 96 poços, onde cada tratamento possuía 5 réplicas, e a concentração de células por poço era de $2,5 \times 10^5$ céls/ml. Após um período de 24-48h para os hepatócitos aderirem na placa, a exposição ao contaminante era realizada. Pelo menos 3 experimentos por ensaio/condição experimental foram realizados.

1.3.2- Condições experimentais

O tempo de exposição aos contaminantes utilizados, foi de 6h, tendo em vista que em experimentos realizados anteriormente em nosso laboratório foi observado que, em salina, as células hepáticas de *zebrafish* mantêm sua viabilidade inalterada nesse período. Com este pressuposto, a solução salina para vertebrados (Composição em mM: NaCl: 112,6; CaCl₂: 1,81; KCl: 1,85; NaHCO₃: 2,38; HEPES: 5) foi utilizada na exposição dos contaminantes em todos os experimentos realizados, para evitar a interação e formação de complexos entre os contaminantes e os compostos presentes no meio de cultura (como aminoácidos e proteínas), que pudessem alterar os resultados obtidos devido a alteração da biodisponibilidade do contaminante.

1.3.2.1- Atrazina

O composto orgânico utilizado foi a atrazina (Sigma-Aldrich), as concentrações foram selecionadas com base na concentração máxima estabelecida segura em ambientes aquáticos de água doce, pela legislação brasileira (resolução nº 357 de 2005), que é de 2 µg.L⁻¹. Sendo então, as concentrações nominais testadas 1; 2; 4 e 20 µg.L⁻¹.

Sabendo que a atrazina é insolúvel em água, o solvente utilizado aqui foi o metanol (Bringolf et al., 2004). Para analisar seu possível efeito tóxico sobre as células, foi realizada uma curva de viabilidade, com diferentes concentrações de metanol (0,1; 0,5; 1; 5 e 10% em salina). A concentração de metanol definida para ser o solvente foi considerada o segundo grupo controle (sendo o primeiro controle a salina pura) nos experimentos relacionados à atrazina.

1.3.2.2- Cobre

O composto inorgânico utilizado foi o cobre (Cu^{2+} , na forma de CuCl_2), sendo as condições experimentais baseadas no limite estabelecido pela legislação brasileira (na resolução nº 357 de 2005) que é de $9 \mu\text{g.L}^{-1}$. As concentrações nominais utilizadas foram 4,5; 9; 18; $90 \mu\text{g.L}^{-1}$.

1.3.2.3- Mistura dos compostos

As misturas dos contaminantes foram baseadas nas concentrações permitidas pela legislação brasileira (A2CU9, sendo A2= atrazina $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ e CU9= cobre $9 \mu\text{g.L}^{-1}$), o valor considerado seguro para atrazina associado com o dobro do valor do cobre (A2CU18, $2 \mu\text{g.L}^{-1} + 18 \mu\text{g.L}^{-1}$), dobro para ambos contaminantes (A4CU18, $4 \mu\text{g.L}^{-1} + 18 \mu\text{g.L}^{-1}$). Além dessas misturas, também foi analisado o dobro da concentração segura para atrazina associado com a única concentração de cobre que foi citotóxica para os hepatócitos na exposição do metal isolado (A4CU90, $4 \mu\text{g.L}^{-1} + 90 \mu\text{g.L}^{-1}$).

1.3.3- Análise de Citotoxicidade

1.3.3.1- Integridade lisossomal

O ensaio foi realizado através do corante vermelho neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina). Esse ensaio tem como objetivo avaliar a permeabilidade da integridade lisossomal. Após a exposição às condições experimentais, a placa de 96 poços com as amostras foi centrifugada (5 min, 680g) e os tratamentos foram retirados dos poços, os quais foram lavados com PBS (*phosphate buffer solution*, composição em g.L^{-1} : NaCl 8; NaH_2PO_4 0,2; KCl:0,2; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1,15). Foi adicionado 200 μL de vermelho neutro (na concentração de $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ em salina de vertebrado), e as células incubadas por 3h, a 28°C (temperatura de manutenção da linhagem ZF-L). Em seguida a placa foi centrifugada e foi retirado o corante, as células foram fixadas com formaldeído (0,5% de formaldeído – 1% CaCl_2).

A placa foi centrifugada por 5 min (680g), retirou-se a solução de formaldeído e foi adicionado 100 µL da solução de álcool-ácido (50% de álcool etílico – 1% de ácido acético) que tem como função extrair o corante da célula (Babich e Borenfreund, 1991). A maior intensidade de cor na amostra indica a maior retenção de corante pelo lisossomo. A leitura é realizada em espectrofotometria à 550nm, a célula com lisossomo sadio retém mais corante. Este ensaio foi utilizado para a análise de citotoxicidade do herbicida e do metal, isoladamente e quando associados.

1.3.3.2- Funcionalidade Mitocondrial

Para o estudo da funcionalidade mitocondrial foi utilizado o ensaio do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil brometo de tetrazolina). A funcionalidade da mitocôndria é avaliada através da atividade de enzimas relacionadas à respiração celular, células com mitocôndrias ativas convertem o MTT, de coloração amarela, em cristais de formazan (roxo).

Depois da exposição às condições experimentais, por 6h, a placa com as células foi centrifugada (5 min – 680g), e lavada com 200 µL de PBS duas vezes, para remoção dos tratamentos. Após foi adicionado o MTT (0,5 mg/mL, concentração final) e a placa foi incubada por 3h a 28°C.

Terminado o tempo de incubação, a placa foi centrifugada novamente, o sobrenadante removido, e foi adicionado 200 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido), com a função de solubilizar os cristais de formazan formados. Os resultados foram obtidos a partir da análise por espectrofotometria (550 nm) (Riss et al., 2004). Este ensaio de citotoxicidade foi utilizado apenas nas células expostas às misturas.

1.3.4- Análise estatística

Para todos os resultados foram calculadas as médias e o erro padrão (SE) da média. Os resultados foram submetidos à ANOVA (análise de variância de um fator). Quando o valor do resultado foi significativo, era realizado o teste de comparação múltipla de Tuckey. Foram utilizados como valores significativos os com $p \leq 0,05$.

1.4- Resultados

1.4.1- Integridade lisossomal

1.4.1.1- Metanol - Atrazina

Através do ensaio que verifica a integridade lisossomal dos hepatócitos, pode ser observado que as células expostas ao metanol, somente nas concentrações de 5 e 10%, apresentaram queda na viabilidade, sendo de aproximadamente 40% ($P = 0,012$, $n = 3-5$). A partir desses resultados, foi selecionada a concentração de 0,1%, pois foi a menor concentração testada em que não houve citotoxicidade, e que foi solúvel para a atrazina (Fig 6).

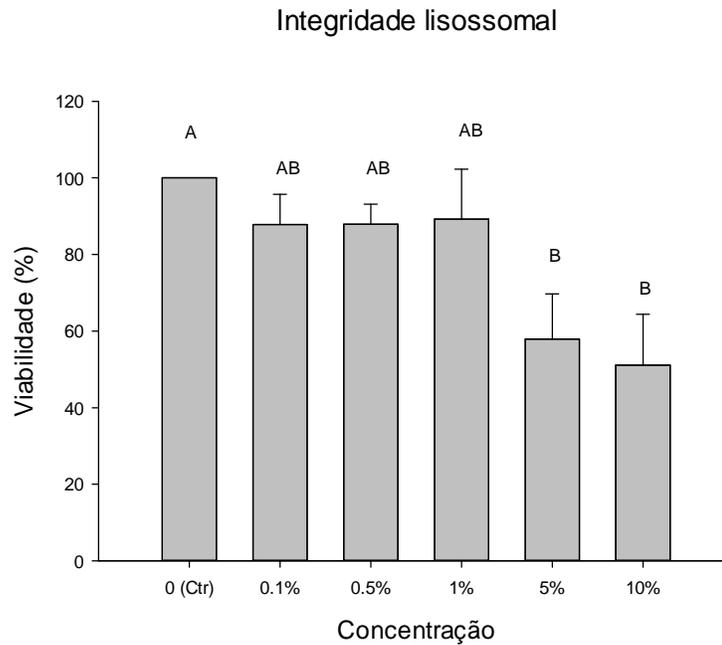


Figura 6 Integridade lisossomal em hepatócitos de zebrafish - o gráfico representa a relação entre a viabilidade (%) dos hepatócitos e os tratamentos com diferentes concentrações (%) de metanol (solvente). Sendo Ctr o grupo controle. Os valores médios (\pm SE) estão representados pelas barras. Letras diferentes significam médias que possuem diferença estatística

Em relação à atrazina, entre os tratamentos testados para a análise da integridade lisossomal, a concentração estabelecida como segura pela legislação brasileira ($2 \mu\text{g.L}^{-1}$) não foi citotóxica. Enquanto a concentração de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ teve uma queda na viabilidade de cerca de 20%, sendo citotóxica ($P = 0,003$, $n= 3-9$)(Fig 7).

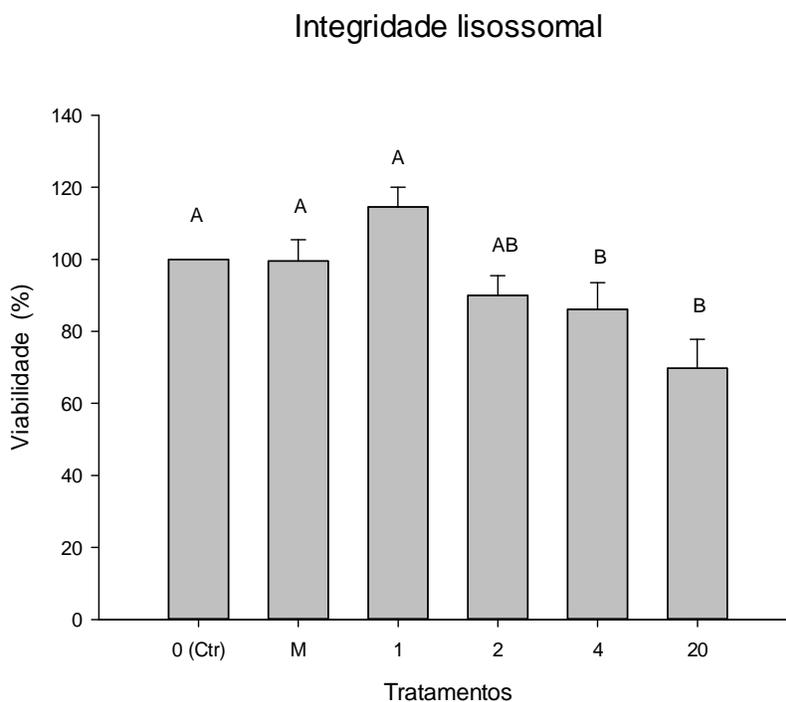


Figura 7 Integridade lisossomal em hepatócitos de zebrafish - o gráfico representa a relação entre a viabilidade (%) dos hepatócitos e os tratamentos com diferentes concentrações de atrazina ($\mu\text{g.L}^{-1}$), sendo Ctr o controle e M o segundo controle (metanol). Os valores médios ($\pm\text{SE}$) estão representados pelas barras. Letras diferentes significam médias que possuem diferença estatística.

1.4.1.2- Cobre

Na análise da integridade lisossomal dos hepatócitos expostos ao cobre, a maior concentração testada ($90 \mu\text{g.L}^{-1}$) mostrou-se citotóxica em relação aos tratamentos $4,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ (concentração permitida pela legislação). ($P = 0,013$, $n= 4-12$)(Fig 8).

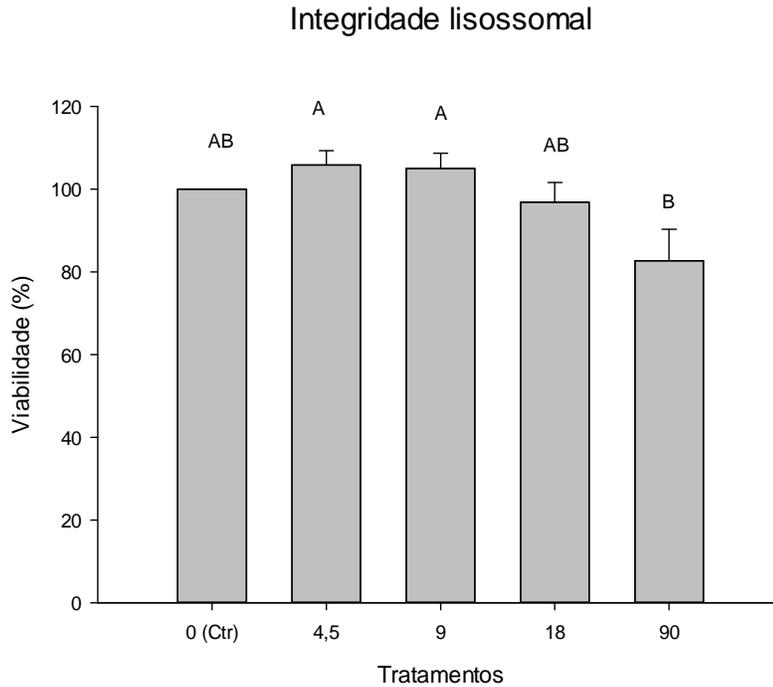


Figura 8 Integridade lisossomal em hepatócitos de zebrafish, o gráfico representa a relação entre a viabilidade (%) dos hepatócitos e os tratamentos com diferentes concentrações de cobre ($\mu\text{g.L}^{-1}$), sendo Ctr o controle. Os valores médios ($\pm\text{SE}$) estão representados pelas barras. Letras diferentes significam médias que possuem diferença estatística.

1.4.1.3- Mistura (Atrazina + Cobre)

Nos resultados referentes à integridade lisossomal (Fig 9), a mistura que tinha concentrações referentes ao dobro do valor permitido para a atrazina e dez vezes o limite aceito pela legislação para o cobre mostrou-se citotóxica em relação às demais condições, ($P = 0.029$, $n = 5-6$).

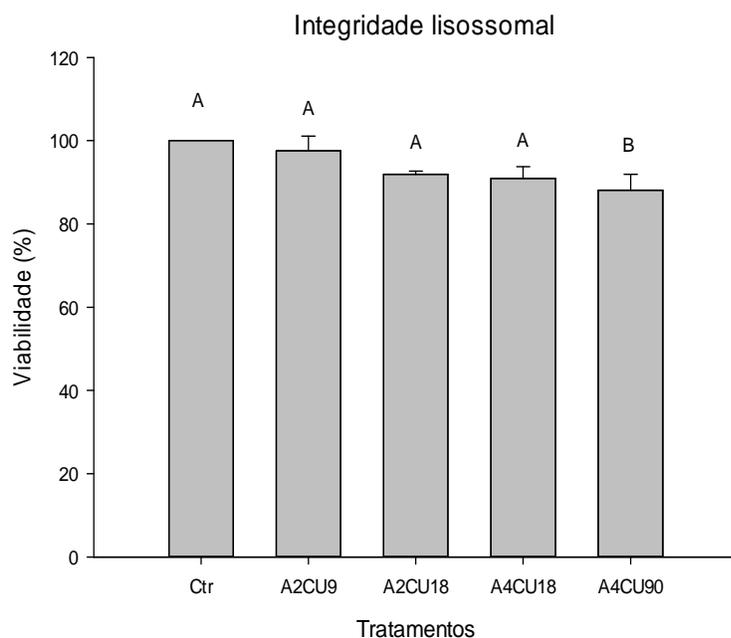


Figura 9 Integridade lisossomal em hepatócitos de zebrafish - o gráfico representa a relação entre a viabilidade (%) dos hepatócitos e os tratamentos com diferentes concentrações de atrazina e cobre ($\mu\text{g.L}^{-1}$), sendo Ctr o controle e A2CU9 = A (atrazina) 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, associado com CU (cobre) 9 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os valores médios ($\pm\text{SE}$) estão representados pelas barras. Letras diferentes significam médias que possuem diferença estatística.

1.4.2- Atividade Mitocondrial

1.4.2.1- Mistura (Atrazina + Cobre)

No parâmetro da funcionalidade mitocondrial, as misturas da atrazina com o cobre expostas aos hepatócitos não causaram citotoxicidade em nenhum dos tratamentos ($P > 0,05$), $n= 4-5$ (Fig 10).

Funcionalidade mitocondrial

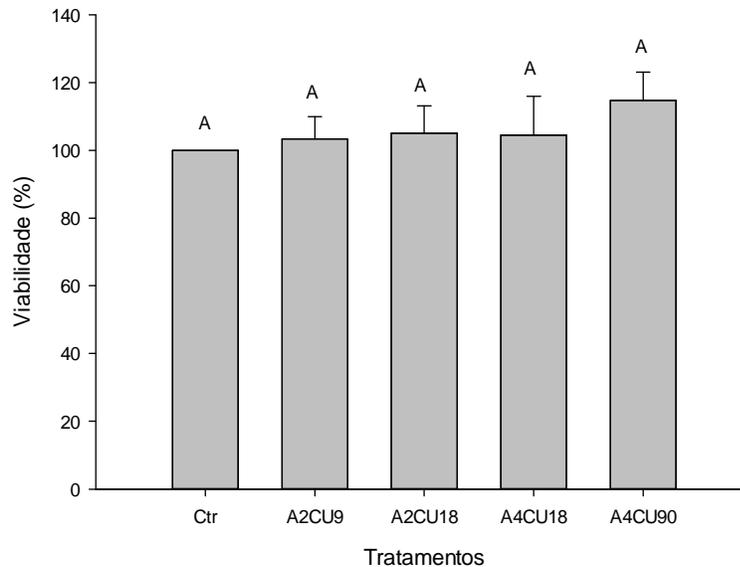


Figura 10 Funcionalidade mitocondrial em hepatócitos de zebrafish,- o gráfico representa a relação entre a viabilidade (%) dos hepatócitos e os tratamentos com diferentes concentrações de atrazina e cobre ($\mu\text{g.L}^{-1}$), sendo Ctr o controle e A2CU9 = A (atrazina) $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, associado com CU (cobre) $9 \mu\text{g.L}^{-1}$. Os valores médios ($\pm\text{SE}$) estão representados pelas barras. Letras diferentes significam médias que possuem diferença estatística.

1.5- Discussão

Os hepatócitos de *zebrafish* quando expostos a concentrações consideradas seguras pela legislação brasileira, para a atrazina e cobre isolados, não mostraram efeitos citotóxicos. As maiores concentrações de ambos contaminantes isolados causaram citotoxicidade, segundo a integridade lisossomal dos hepatócitos. No entanto, quanto à exposição dos contaminantes associados (atrazina + cobre) foram realizados dois ensaios, sendo o lisossomo um alvo sensível em evidenciar a citotoxicidade dos contaminantes do que a mitocôndria.

As células de *zebrafish* parecem apresentar maior sensibilidade quando comparadas com outros tipos celulares (células de rato, fibroblastos) que sofreram exposição crônica e em concentrações maiores de atrazina. No caso da cultura primária de células do sistema reprodutivo de ratos (células de Leydig), os autores evidenciaram citotoxicidade nas concentrações de 25 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 48h de exposição (Abarikwu et al., 2011), nos

hepatócitos (ZF-L) em exposição aguda a uma concentração mil vezes menor ($20 \mu\text{g.L}^{-1}$) foi demonstrado citotoxicidade. Em fibroblastos, que são conhecidos por serem um tipo celular resistente, também em exposição crônica à atrazina, foi observado uma redução da viabilidade na concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Manske et al., 2004), concentração próxima à que mostrou citotoxicidade para os hepatócitos (ZF-L, $20 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Apesar da concentração de atrazina considerada segura pela legislação brasileira ($2 \mu\text{g.L}^{-1}$) não ter sido citotóxica para os hepatócitos quanto à de integridade lisossomal, isso não significa que outros parâmetros celulares estejam ileso dos efeitos do herbicida. Em um estudo realizado com o peixe *Rhamdia quelen*, os autores observaram que a concentração de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ causava alterações histológicas no tecido hepático e ativação de enzimas antioxidantes (catalase, glutatona redutase, glutatona S-transferase e glutatona peroxidase) (Mela et al., 2013). A ativação de proteínas antioxidantes pode estar relacionada com a defesa do organismo contra a exposição à atrazina (Jin et al., 2009; Blahová et al., 2013). O que pode ter sido efetivo nas ZF-L para a falta de citotoxicidade em exposições a concentrações baixas de atrazina. Outros estudos apontam que frente à exposição à atrazina há a ativação das enzimas do citocromo P450, que são responsáveis pela biotransformação de xenobióticos realizando a defesa celular (Dong et al., 2009; Fu et al., 2013), que também poderia minimizar/evitar os efeitos da atrazina sobre outros parâmetros.

Neste estudo a única concentração de cobre citotóxica foi $90 \mu\text{g.L}^{-1}$, em exposição aguda (6h) ao contaminante, outros estudos sugerem que concentrações próximas a essa, em exposição crônica, causam efeitos danosos para outros organismos. Em larvas de *zebrafish*, a exposição crônica de cobre, nas concentrações de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, aumentaram a mortalidade dos indivíduos. No entanto, em uma faixa de concentração superior (de $93 \mu\text{g.L}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$) foi observado redução do crescimento e aumento dos batimentos cardíacos em larvas de *zebrafish* (Johnson et al., 2007). Svendsen e Weeks (1995), estudando outro modelo celular, hemócitos de um molusco (*Viviparus contectus*), durante exposição crônica ao cobre, evidenciaram citotoxicidade através da integridade lisossomal em todas as concentrações testadas ($31,6$; $56,2$; 100 ; 316 ; $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$). Quando comparamos o efeito citotóxico em outros estudos utilizado, a mesma faixa de concentração de cobre em ZF-L ($90 \mu\text{g.L}^{-1}$) em exposição aguda apresentou citotoxicidade, enquanto outros trabalhos essa toxicidade era vista através de exposição crônica, logo, podemos sugerir uma maior sensibilidade das células ZF-L.

Por outro lado, hepatócitos expostos aqui às concentrações mais baixas de cobre não

apresentaram citotoxicidade. Este fato pode estar relacionado com a defesa celular através de proteínas antioxidantes, estudos apontam a relação da exposição ao cobre com o estresse oxidativo e o aumento da expressão das proteínas de extrusão de xenobióticos (Hansen et al., 2006; Craig et al., 2007; Zaja et al 2007).

Para a mistura da atrazina com o cobre foram realizados dois ensaios de citotoxicidade, um avaliando a integridade lisossomal (vermelho neutro) e outro a funcionalidade mitocondrial (MTT). Sendo a integridade lisossomal o ensaio que se mostrou mais sensível em demonstrar citotoxicidade, a maior concentração de mistura testada (A4CU90: A= 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e CU: 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$) foi a única citotóxica. Ressaltando que nos ensaios realizados com os contaminantes isolados, a concentração de 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ não havia sido citotóxica, a mistura com 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre, a princípio parece ter tornado-a citotóxica. De acordo com as diferenças químicas dos contaminantes, composto orgânico - inorgânico, pode haver alteração da citotoxicidade da mistura. Nessa interação pode haver complexação da atrazina e do cobre causando uma inibição/redução no efeito tóxico do contaminante isolado (Decock et al., 1985; Martin et al., 1998). Entretanto, não foi o resultado observado para as células de *zebrafish*, assim como a presença do cobre na maior concentração testada alterou a citotoxicidade da atrazina 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$, no caso a concentração de 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ já era uma concentração citotóxica isolada a mistura com a atrazina não alterou a citotoxicidade.

Concluindo, os contaminantes testados isoladamente (atrazina e cobre) nas concentrações consideradas seguras pela legislação brasileira não causam dano para o lisossomo, apenas a maior combinação dos contaminantes foi citotóxica para esse parâmetro (atrazina: 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e cobre 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Quanto à mistura dos contaminantes o vermelho neutro foi um ensaio mais sensível do que o MTT, a maior concentração da mistura causou citotoxicidade sobre a integridade lisossomal, enquanto que no MTT não foi identificado esse efeito, confirmando a importância de se analisar mais de um possível alvo de ação.

1.7- Referências bibliográficas

- Abarikwu, S.O., Farombi, E.O., Kashyap, M.P., Pant, A.B. 2011. Atrazine induces transcriptional changes in marker genes associated with steroidogenesis in primary cultures of rat Leydig cells. *Toxicol. In Vitro* 25, 1588–1595.
doi:10.1016/j.tiv.2011.06.002

ANVISA. 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B4882-2-0%5D.PDF> Acessado em: 3 abr 2016

Babich, H., Borenfreund, E. 1991. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: A review. *Toxicol. In Vitro* 5, 91–100. doi:10.1016/0887-2333(91)90052-F

Barbosa, F. G., Wallner-Kersanach, M., Baumgarten, M. D. G. Z. 2012. Metais traço nas águas portuárias do estuário da Lagoa dos Patos, RS.

Bard, S. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389. doi:10.1016/S0166-445X(00)00088-6

Bols, N.C., Dayeh, V.R., Lee, L.E.J., Schirmer, K. 2005. Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology*, in: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier, pp. 43–84.

Bringolf, R.B., Belden, J.B., Summerfelt, R.C. 2004. Effects of atrazine on fathead minnow in a short-term reproduction assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1019. doi:10.1897/03-180

Chelinho, S., Moreira-Santos, M., Silva, C., Costa, C., Viana, P., Viegas, C.A., Fialho, A.M., Ribeiro, R., Sousa, J.P. 2012. Semifield testing of a bioremediation tool for atrazine-contaminated soils: Evaluating the efficacy on soil and aquatic compartments. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1564–1572. doi:10.1002/etc.1840

Costa, L. D. F., e Wallner-Kersanach, M. 2013. Assessment of the labile fractions of copper and zinc in marinas and port areas in Southern Brazil. *Environmental monitoring and assessment*, 185(8), 6767-6781.

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

Decock, P., Dubois, B., Lerivrey, J., Gessa, C., Urbańska, J., Kozłowski, H. 1985. Cu(II) binding by substituted 1, 3, 5-triazine herbicides. *Inorganica Chim. Acta* 107, 63–66. doi:10.1016/S0020-1693(00)80691-X

Dong, X., Zhu, L., Wang, J., Wang, J., Xie, H., Hou, X., Jia, W. 2009. Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of *zebrafish (Danio rerio)*. *Chemosphere* 77, 404–412. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.06.052

Foradori, C.D., Hinds, L.R., Quihuis, A.M., Lacagnina, A.F., Breckenridge, C.B., Handa, R.J. 2011. The Differential Effect of Atrazine on Luteinizing Hormone Release in Adrenalectomized Adult Female Wistar Rats. *Biol.*

- IBAMA (2012) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3> Acessado em: 3 abr 2016
- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., ... & Fu, Z. (2010). Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78(7), 846-852.
- Johnson, A., Carew, E., Sloman, K. 2007. The effects of copper on the morphological and functional development of *zebrafish* embryos. *Aquat. Toxicol.* 84, 431–438. doi:10.1016/j.aquatox.2007.07.003
- Kmetič, I., Gaurina Srček, V., Slivac, I., Šimić, B., Kniewald, Z., Kniewald, J. 2008. Atrazine Exposure Decreases Cell Proliferation in Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) Cell Line. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 205–209. doi:10.1007/s00128-008-9425-6
- Maioli, E., Torricelli, C., Fortino, V., Carlucci, F., Tommassini, V., Pacini, A. 2009. Critical Appraisal of the MTT Assay in the Presence of Rottlerin and Uncouplers. *Biol. Proced. Online* 11, 227–240. doi:10.1007/s12575-009-9020-1
- Manske, M.K., Beltz, L.A., Dhanwada, K.R. 2004. Low-Level Atrazine Exposure Decreases Cell Proliferation in Human Fibroblasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46. doi:10.1007/s00244-003-3087-5
- Martin, M., Hagege, A., Brunette, J.-P., Leroy, M. 1998. Use of synergistic extraction for the study of atrazine/metal interactions. *Anal. Chim. Acta* 373, 161–165.
- Mela, M., Guiloski, I.C., Doria, H.B., Randi, M.A.F., de Oliveira Ribeiro, C.A., Pereira, L., Maraschi, A.C., Prodócimo, V., Freire, C.A., Silva de Assis, H.C. 2013. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 13–21. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.026
- Olivares, M., Uauy, R. 1996. Limits of metabolic tolerance to copper and biological basis for present recommendations and regulations. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 846S–852S.
- Pogrmic-Majkic, K., Samardzija, D., Fa, S., Hrubik, J., Glisic, B., Kaisarevic, S., Andric, N. 2014. Atrazine Enhances Progesterone Production Through Activation of Multiple Signaling Pathways in FSH-Stimulated Rat Granulosa Cells: Evidence for Premature Luteinization. *Biol. Reprod.* 91, 124–124. doi:10.1095/biolreprod.114.122606

- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L. 2004. Cell Viability Assays, in: Sittampalam, G.S., Gal-Edd, N., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Lemmon, V., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Minor, L., Napper, A., Riss, T., Trask, O.J., Weidner, J. (Eds.), Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
- Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F.F. 2009. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in *zebrafish* (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquat. Toxicol.* 95, 285–291. doi:10.1016/j.aquatox.2009.02.016
- Shenoy, K. 2012. Environmentally Realistic Exposure to the Herbicide Atrazine Alters Some Sexually Selected Traits in Male Guppies. *PLoS ONE* 7, e30611. doi:10.1371/journal.pone.0030611
- Spitsbergen, J., Kent, M. 2003. The State of the Art of the *Zebrafish* Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research - Advantages and Current Limitations. *Toxicol. Pathol.* 31, 62–87. doi:10.1080/01926230390174959
- Spongberg, A.L., Martin-Hayden, J.M. 1997. Pesticide Stratification in an Engineered Wetland Delta. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3161–3165. doi:10.1021/es970144m
- Svendsen, C., Weeks, J.M. 1995. The use of a lysosome assay for the rapid assessment of cellular stress from copper to the freshwater snail *Viviparus contectus* (Millet). *Mar. Pollut. Bull.* 31, 139–142. doi:10.1016/0025-326X(94)00227-Z
- Tagliani, C. R. A. 2003. Técnica para avaliação da vulnerabilidade ambiental de ambientes costeiros utilizando um sistema geográfico de informações.
- Tillitt, D.E., Papoulias, D.M., Whyte, J.J., Richter, C.A. 2010. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 99, 149–159. doi:10.1016/j.aquatox.2010.04.011
- Wang, L., Chan, J.Y.W., Rêgo, J.V., Chong, C.-M., Ai, N., Falcão, C.B., Rádis-Baptista, G., Lee, S.M.Y. 2015. Rhodamine B-conjugated encrypted viperidicidin nonapeptide is a potent toxin to *zebrafish* and associated with in vitro cytotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1850, 1253–1260. doi:10.1016/j.bbagen.2015.02.013
- Wen, Y., Chen, H., Shen, C., Zhao, M., Liu, W. 2011. Enantioselectivity Tuning of Chiral Herbicide Dichlorprop by Copper: Roles of Reactive Oxygen Species. *Environ. Sci. Technol.* 45, 4778–4784. doi:10.1021/es2003793

Capítulo 2-

Atividade das proteínas ABC e citotoxicidade frente à atrazina e cobre (em associação) na microalga *Desmodesmus communis*

(Manuscrito a ser submetido para a revista *Ecotoxicology*)

Guidony, N. S.^a, Lopes, F.M.^b, Guimarães, P. S.^c, Souza, M.M.^{a,b,c}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande / RS, Brasil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande / RS, Brasil

^c Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande / RS, Brasil

2.1- Resumo

Contaminantes podem entrar no ambiente aquático facilmente devido às atividades antrópicas. A agricultura com o uso de agrotóxicos e a indústria liberando resíduos contribui para que as águas fiquem contaminadas. Um herbicida mundialmente utilizado é a atrazina, que possui como alvo a inibição da fotossíntese. Quanto aos metais decorrentes da atividade industrial, estudos indicam a presença de metais pesados na água sendo o cobre um destes. O objetivo deste estudo foi verificar a citotoxicidade da atrazina e do cobre (isolados e associados) na microalga *Desmodesmus communis* através de dois parâmetros celulares: integridade da membrana e funcionalidade mitocondrial. Outro objetivo foi analisar a atividade das proteínas ABC que fazem efluxo de xenobióticos, verificando as vias utilizadas na extrusão dos contaminantes (se P-gp e/ou MRP). Os resultados apontam que a sensibilidade dos testes de citotoxicidade podem estar relacionada com o alvo de ação do contaminante. Microalgas expostas à atrazina, apresentaram citotoxicidade na concentração de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$. A concentração de cobre permitida pela legislação brasileira $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ já foi considerada citotóxica. Em relação à mistura dos contaminantes, a funcionalidade mitocondrial foi sensível, mas apenas à mistura das maiores concentrações dos contaminantes (10 vezes o permitido pela legislação). O bloqueador de P-gp, verapamil, causou a inibição das proteínas de extrusão em todas as concentrações testadas de atrazina e cobre. Entretanto o bloqueador MK-571 não inibiu as vias de extrusão. Houve uma relação inversa na atividade das proteínas ABC e a citotoxicidade, as condições não citotóxicas promoveram aumento da atividade das proteínas de defesa da microalga.

Palavras-chave: microalga, metal, herbicida, integridade membrana, funcionalidade mitocondrial, proteínas de defesa

2.2- Introdução

Ambientes de água doce podem ser afetados com atividades antrópicas, dentre elas uma atividade econômica que gera contaminação é a agricultura, onde a utilização de agrotóxicos tem como função proteger a plantação de possíveis pragas. Um herbicida que é utilizado mundialmente é a atrazina, que em relação às ervas-daninhas, tem como alvo a cadeia de elétrons no fotossistema II, resultando na inibição da fotossíntese (Trebst et al. 1993). Porém, o herbicida não atinge apenas os organismos alvos, causando danos em organismos que estão no ambiente.

É importante ressaltar que o ambiente aquático não sofre apenas influência da agricultura (agrotóxicos), outras atividades econômicas como a indústria e o porto cujos efluentes geram contaminação por metais pesados. Um dos compostos relacionados com a indústria é o cobre, apesar de ser um metal essencial, em grandes concentrações pode tornar-se tóxico para os organismos presente no ambiente. Bhargava e colaboradores (2008) verificaram que concentrações altas de cobre reduz a capacidade de realizar fotossíntese em cianobactérias. Cabe ressaltar que diferentes tipos de contaminantes podem facilmente se encontrar no ambiente, processos naturais como pluviosidade e ventos (Chelinho et al., 2012), são fatores que influenciam na contaminação da água (Sponberg & Martin-Hayden, 1997).

Microalgas, como *Desmodesmus communis*, podem ser afetadas por contaminantes nos ambientes aquáticos. A utilização de microalgas em estudos toxicológicos possuem vantagens, como o crescimento rápido e a fácil manutenção (An et al. 1999), e por serem microscópicas as análises toxicológicas geram muito pouco resíduos. Recentemente, *Desmodesmus communis* foi utilizada em um estudo de citotoxicidade, onde a integridade da membrana celular se mostrou mais sensível do que a funcionalidade da mitocôndria, frente ao glifosato, (da Luz et al., 2016).

Ambientes contaminados podem ter sua toxicidade sobre organismos amenizada devido ao sistema de defesa celular chamado de MXR (*multixenobiotic resistance*), este fenótipo dado pelo funcionamento de proteínas ABC (*ATP binding cassette*) que fazem extrusão de substâncias estranhas à célula (Gottesman and Pastan 1993; Bard 2000). Membros da superfamília de proteínas ABC, inicialmente descritos como defesa de células tumorais e outros modelos de células, não são exclusivos de células animais, existem estudos sobre a presença desse sistema em células vegetais. Em plantas, algumas proteínas

ABC podem ter outras funções, como a detoxificação vacuolar (Wanke e Üner Kolukisaoglu, 2010), também participam de transporte de íons, estão envolvidas com o crescimento e desenvolvimento da planta (Martinoia et al. 2002). Grande parte dos trabalhos realizados sobre esse sistema em células vegetais abordam a expressão dessas proteínas (Hanikenne et al., 2005; Schulz e Kolukisaoglu, 2006), contudo a literatura não mostra relatos sobre a atividade das proteínas ABC em plantas. Neste estudo, além da atividade, com o intuito de investigar as vias de defesa da célula foram utilizados dois bloqueadores de proteínas de defesa, o verapamil e o MK-571, para P-gp (ABCB) e MRP (ABCC) respectivamente. As MRP (ABCCs) fazem extrusão de substratos que em grande parte, passaram pelo processo de biotransformação (Zaja et al. 2007). Estudos atribuem a esta proteína a detoxificação de metais tanto em modelo animal quanto em células vegetais (Broeks et al., 1996; Klein et al., 2006; Long et al. 2011). A expressão de genes ligados a proteína MRP foi identificada na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Hanikenne et al., 2005).

Visando um maior entendimento sobre o comportamento da microalga frente à contaminação, os objetivos do estudo foram estudar a citotoxicidade dos contaminantes atrazina e cobre (separados e combinados). Avaliando ainda, a atividade das proteínas responsáveis pela defesa celular, e relacionando-a com a citotoxicidade causada pelos contaminantes.

2.3- Metodologia

2.3.1- Cultivo de microalga

O organismo selecionado para o estudo foi a microalga *Desmodesmus communis* (Classe: Chlorophyceae; Ordem: Chlorococcales). A microalga foi coletada para estudos anteriores em lagos presentes na Universidade Federal do Rio Grande – FURG, sendo a cepa isolada e mantida em laboratório (Instituto de Ciências Biológicas - ICB FURG).

O cultivo da cepa foi realizado em *erlenmeyers* de 250 ml com meio WC/2 (composição em g.L⁻¹: CaCl₂: 36,8; MgSO₄: 37; NaHCO₃: 12,6; K₂HPO₄: 8,7; Na₂NO₃: 85; Na₂SiO₃: 28,4; Na₂EDTA: 4,36; FeCl₃: 3,15; CuSO₄:0,010; ZnSO₄: 0,022; CoCl₂: 0,010; MnCl₂: 0,018; Na₂MoO₄: 0,0006; H₃BO₃: 0,1; Tiamina: 0,1; Biotina: 0,0005; B12: 0,0005; Guillard and Lorenzen 1972). As condições das culturas no laboratório eram controladas: Irradiância: ± 100 μmol m⁻² s⁻¹, Temperatura: ± 24°C, Fotoperíodo: 12:12h

claro/escuro. Os experimentos foram realizados na fase exponencial da microalga, a qual foi observada através da análise da densidade celular em espectrofotômetro (680nm), de acordo com o que foi estabelecido em estudos realizados anteriormente no laboratório (da Luz et al 2016). Para cada experimento foi retirado do inoculo 30 ml, que foi centrifugado por 20 min, 3000g. O *pellet* retirado foi ressuspensão em 1 ml de meio WC/2, o qual foi dividido em 5 poços, de uma placa de 96 poços, com 200 µL (de acordo com o número de tratamentos), a placa é centrifugada novamente e é retirada uma alíquota para os ensaios de citotoxicidade, descritos abaixo (vermelho neutro: 100 µL MTT:100 µL) (da Luz et al., 2016), sendo as amostras expostas por 6h aos contaminantes. O meio WC/2 foi utilizado para exposição das algas nos experimentos e no preparo dos contaminantes (Guillard & Lorenzen 1972).

2.3.2.- Condições experimentais

O herbicida utilizado foi a atrazina, 2 µg.L⁻¹, concentração máxima estabelecida como segura pela legislação brasileira para ambientes de água doce (CONAMA, resolução nº 357 de 2005), foi utilizada como referência para definição das demais situações. As outras concentrações testadas foram o dobro e 10 vezes o considerado seguro pela legislação (4 e 20 µg.L⁻¹).

Outro contaminante utilizado foi o cobre, segundo a legislação brasileira a concentração considerada segura é a de 9 µg.L⁻¹, e foi estabelecido o mesmo padrão utilizado para atrazina, logo as demais concentrações testadas foram de 18 e 90 µg.L⁻¹.

Para análise dos dois contaminantes associados, foram escolhidas as concentrações consideradas seguras pela legislação brasileira, e as concentrações que se mostraram citotóxicas nos parâmetros analisados (integridade da membrana e funcionalidade mitocondrial). As legendas das misturas foram: A2CU9 (sendo A: atrazina 2 µg.L⁻¹, CU: cobre 9 µg.L⁻¹); A2CU90 (sendo A: atrazina 2 µg.L⁻¹, CU: cobre 90 µg.L⁻¹.); A20CU9 (sendo A: atrazina 20 µg.L⁻¹, CU: cobre 9 µg.L⁻¹.); A20CU90 (sendo A: atrazina 20 µg.L⁻¹, CU: cobre 90 µg.L⁻¹).

2.3.3- Análise de Citotoxicidade

2.3.3.1- Integridade da membrana plasmática

Para verificar a integridade da membrana plasmática foi utilizado o ensaio do vermelho neutro (2-amino-3-metil- 7dimetil-amino-cloreto de fenazina). Esse ensaio tem como objetivo avaliar a permeabilidade da membrana da microalga, evidenciada pela

capacidade de retenção do corante pelos organismos.

Após a exposição de 6h aos contaminantes, a placa com as amostras foi centrifugada e os tratamentos retirados dos poços, sendo substituídos por 200 µL de vermelho neutro a 40 µg.mL⁻¹ (diluído em meio WC/2). As células foram incubadas por 3h (~20°C), a placa foi centrifugada (20 min, 3000g) e o corante foi substituído por formaldeído (0,5% v/v, em CaCl₂ 1%). Em seguida, a placa foi centrifugada (por 20 min, 3000g) retirou-se a solução de formaldeído e foi adicionado 100 µL da solução de álcool-ácido (50% de álcool etílico – 1% de ácido acético) que tem como função extrair o corante da célula (Babich e Borenfreund, 1991). A leitura da placa é realizada em espectrofotometria a 550nm, a maior intensidade de cor na amostra indica a maior retenção de corante pela microalga, a microalga com a membrana sadia retém mais corante.

No modelo animal, o vermelho neutro é uma ferramenta para verificar a integridade lisossomal, neste estudo o modelo utilizado é uma célula vegetal, trabalhos apontam que em células vegetais o vermelho neutro é acumulado no citoplasma, logo tem a função de avaliar a integridade da membrana celular (Crippen e Perrier 1974, da Luz et al 2016).

2.3.3.2- Funcionalidade Mitocondrial

Para o estudo da funcionalidade mitocondrial foi utilizado o ensaio do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difenil brometo de tetrazolina). A funcionalidade da mitocôndria é avaliada através da atividade de enzimas relacionadas à respiração celular, células com mitocôndrias ativas convertem o MTT, de coloração amarela, em cristais de formazan (roxo).

Depois que houve a exposição às condições experimentais, por 6h, a placa com as microalgas foi centrifugada (20 min, 3000g), e as amostras lavadas com 200 µL de meio WC/2 duas vezes, para remoção dos tratamentos. Após foi adicionado o MTT (0,5 mg/mL, concentração final) e a placa foi incubada por 3h em temperatura ambiente (Da Luz et al., 2016). Terminado o tempo de incubação, a placa foi centrifugada novamente, o sobrenadante removido, e foi adicionado 200 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), com a função de solubilizar os cristais de formazan formados (Riss et al., 2004). Para obter os resultados, a placa foi lida através da espectrofotometria (550 nm).

2.3.4- Resistência a multixenobióticos (MXR)- Atividade das proteínas de defesa

A atividade das proteínas responsáveis pelo mecanismo MXR foi avaliada a partir do ensaio acúmulo do fluorescente “Rodamina B” (substrato de proteínas de extrusão de xenobióticos). As condições testadas para esse ensaio foram primeiramente, a atrazina e o cobre separadamente, nas concentrações consideradas seguras pela legislação brasileira e 10 vezes essas concentrações para ambos contaminantes. Quanto à mistura foram baseadas nestas concentrações sendo elas A2CU9 (A: atrazina 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$; CU: cobre 9 $\mu\text{g.L}^{-1}$); A2CU90; A20CU9; A20CU90.

Após as 6h de exposição ao contaminante, a placa com as microalgas foi centrifugada (20 min, 3000g), o tratamento retirado e a rodamina B (10 μM) foi adicionada. As células foram incubadas por 1h, após foram realizadas de 2-3 centrifugações (20 min, 3000g) até ser visível que o corante havia sido completamente removido do meio.

Através de microscópio de fluorescência (Olympus IX81), com filtro (WG), as microalgas foram fotografadas em campo claro e a fluorescência, as quais eram analisadas com auxílio do programa *ImageJ*. A fluorescência foi transformada para preto e branco, e através do programa se obtinha um valor do número de pixels cinza, os quais eram divididos pelos valores obtidos da contagem de microalgas nas fotos de campo claro. A análise foi realizada através da relativização dos grupos tratamentos em função do grupo controle (100%). Quanto à interpretação dos resultados, o nível de fluorescência indica o quão ativado está o sistema de extrusão, quanto maior a fluorescência (mais substrato da proteína nas algas) menor a atividade das proteínas (menos substrato foi expulso das algas).

Na tentativa de se identificar as proteínas de extrusão utilizadas pelos contaminantes, foi avaliada a atividade das proteínas em cada condição experimental na presença e ausência dos bloqueadores das proteínas P-gp (ABCB) e MRP (ABCC), verapamil (V4629, Sigma) e MK-571 *sodium hydrate* (M7571, Sigma), respectivamente. A análise das vias de extrusão foi realizada nos tratamentos: atrazina 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, cobre 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e a mistura das duas concentrações, a escolha foi feita baseada nos resultados de acúmulo de rodamina. A concentração de verapamil utilizada foi 30 μM e para MK-571 foram testadas duas concentrações 25 e 50 μM (Scherer et al., 2008). A exposição aos bloqueadores foi realizada juntamente com a rodamina e após incubação houve a retirada somente do substrato, com o intuito de manter as proteínas inibidas.

2.3.4- Análise estatística

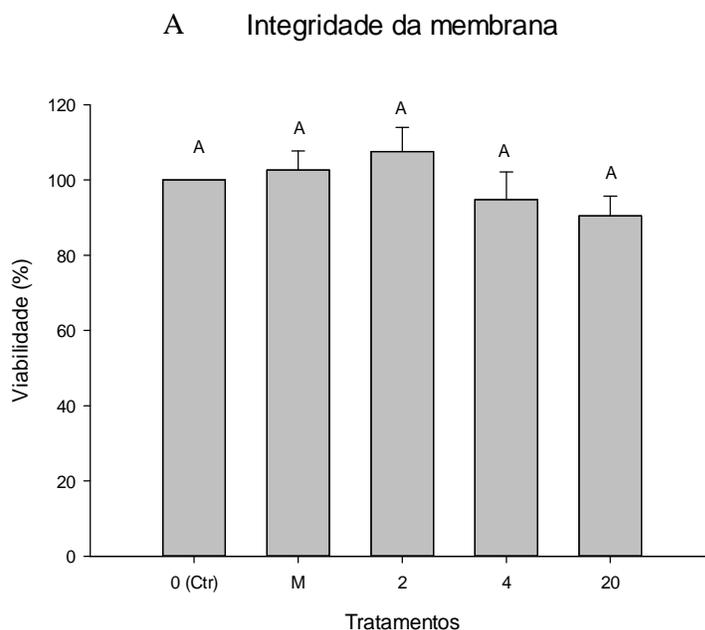
Para todos os resultados foram calculadas as médias e o erro padrão (SE) da média. Os resultados foram submetidos à ANOVA (análise de variância de um fator). Quando o valor do resultado foi significativo, era realizado o teste de comparação múltipla de Tuckey. Foram utilizados como valores significativos $p \leq 0,05$. Nos resultados referentes aos bloqueadores foi realizado teste T.

2.4- Resultados

2.4.1- Citotoxicidade

2.4.1.1- Atrazina

No ensaio do vermelho neutro nenhuma concentração foi citotóxica ($P = 0.232$; $n = 6$, Fig 11 A). Quanto à atividade mitocondrial da microalga, a concentração de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi a única citotóxica para o organismo ($P = 0,015$; $n = 6$, Fig 11 B).



B Funcionalidade mitocondrial

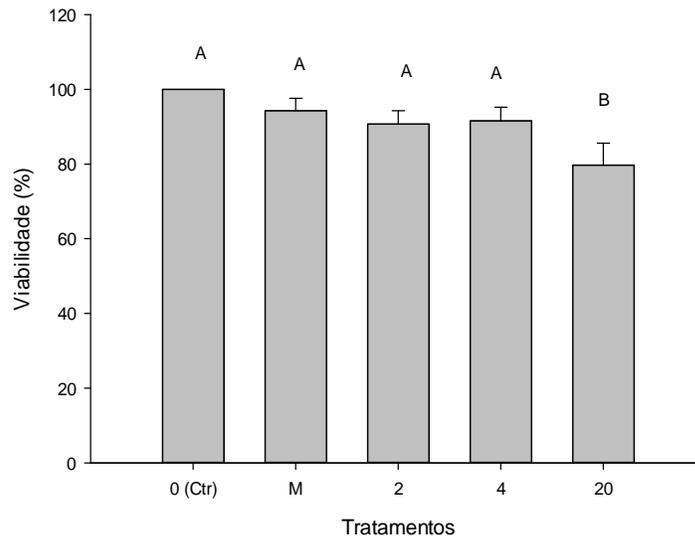
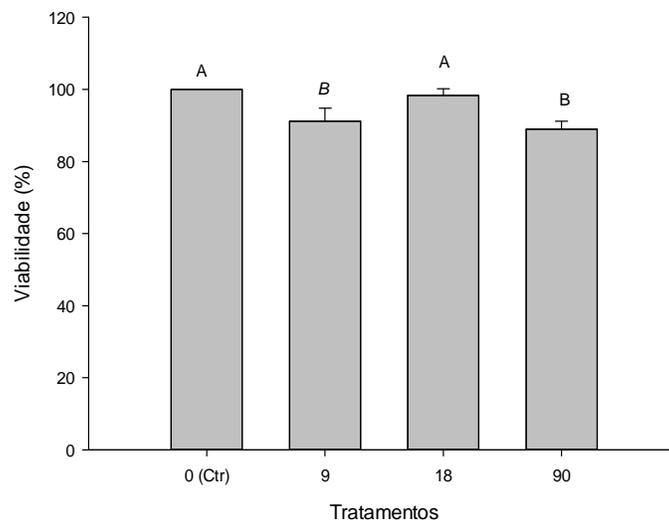


Figura 11 Integridade da membrana (A) e atividade mitocondrial (B) na microalga *Desmodesmus communis* em relação à exposição de diferentes concentrações de atrazina em $\mu\text{g.L}^{-1}$. As barras representam o valor médio e erro padrão da viabilidade (%). Sendo Ctr = controle, M = metanol. Letras diferentes significam diferença estatística.

2.4.1.2- Cobre

No ensaio com vermelho neutro, (Fig 12 A) foi observado que as concentrações de 9 e 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ são citotóxicas ($P < 0,001$; $n = 6-13$), enquanto que em relação a atividade mitocondrial, nenhuma concentração foi citotóxica ($P > 0,05$; $n = 6-7$, Fig 12 B).

A Integridade da membrana



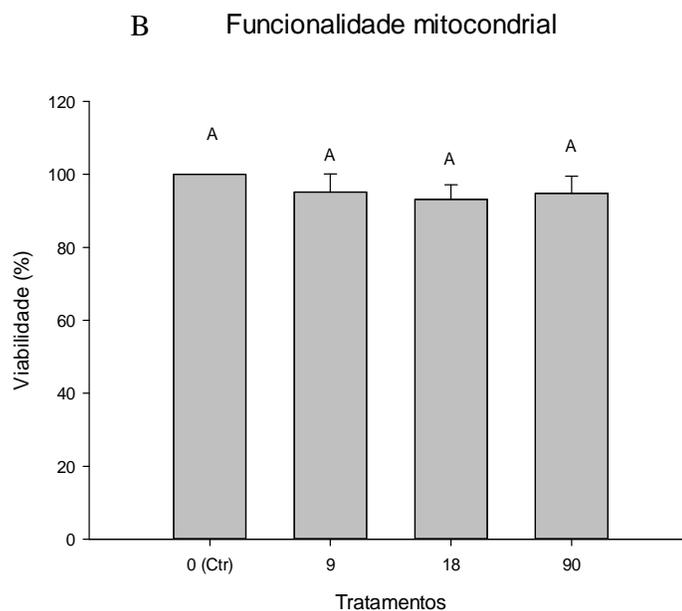


Figura 12 Integridade da membrana (A) e atividade mitocondrial (B) na microalga *Desmodesmus communis* em relação à exposição de diferentes concentrações de cobre em $\mu\text{g.L}^{-1}$. As barras representam o valor médio e erro padrão da viabilidade (%). Sendo Ctr = controle. Letras diferentes significam diferença estatística.

2.4.1.3- Mistura (Atrazina + Cobre)

Nos resultados referentes à integridade da membrana, não foram observadas misturas citotóxicas ($P > 0,05$; $n = 9-13$, Fig 13 A). Quanto à funcionalidade mitocondrial, a mistura das concentrações que eram dez vezes maiores que o permitido pela legislação (tanto da atrazina quanto do cobre) mostrou-se citotóxica ($P < 0,001$; $n = 7$) (Fig 13 B).

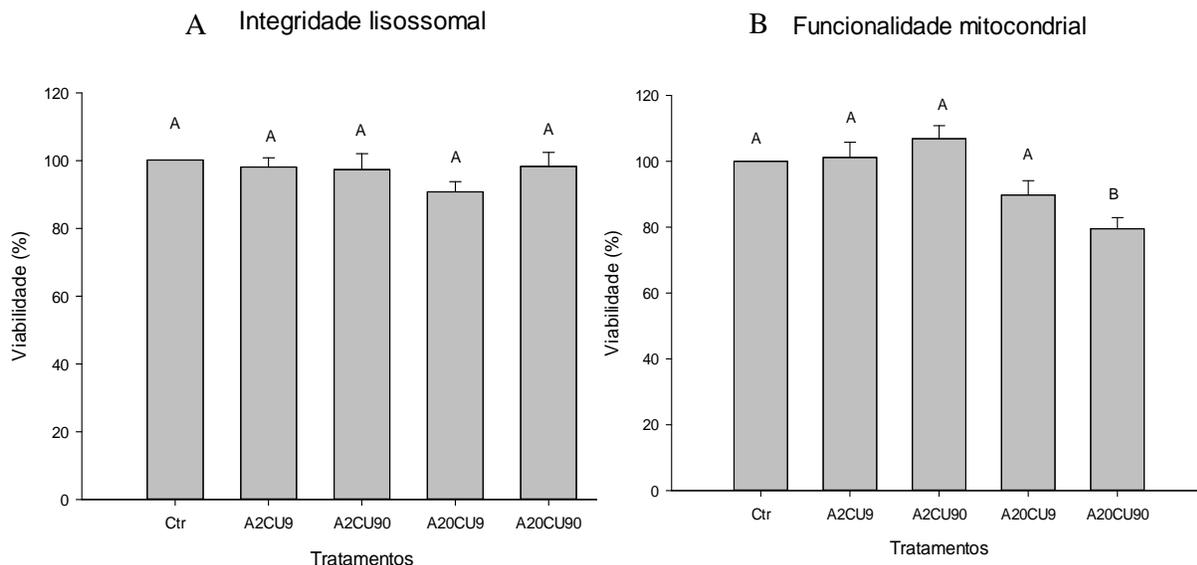


Figura 13 Integridade da membrana (A) e atividade mitocondrial (B) na microalga *Desmodesmus communis* em relação à mistura da atrazina com o cobre. As barras representam o valor médio e erro padrão da viabilidade (%). Sendo Ctr = controle, A2CU9 = atrazina $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ cobre $9 \mu\text{g.L}^{-1}$. Letras diferentes significam diferença estatística.

2.4.2- Atividade das proteínas ABC em microalga

Quanto ao estudo da resistência a multixenobióticos, a atividade das proteínas ABC foi estudada em relação aos contaminantes separadamente e depois em mistura. As concentrações de atrazina e cobre testados separadamente, tiveram como resultado uma queda de 40% na retenção do substrato. Nas algas expostas à concentração estabelecida como segura para a atrazina pela legislação ($2 \mu\text{g.L}^{-1}$) houve maior ativação das proteínas ABC em relação ao controle. Com o aumento da concentração da atrazina em $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ a atividade das proteínas diminuiu, se igualando à das algas controle e à das algas submetidas a de $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ do cobre. Com o cobre $90 \mu\text{g.L}^{-1}$ houve um aumento na atividade da proteína diminuindo a retenção de rodamina em cerca de 60% em relação ao controle. ($P < 0,001$; $n = 5-7$, Fig 14 A e B).

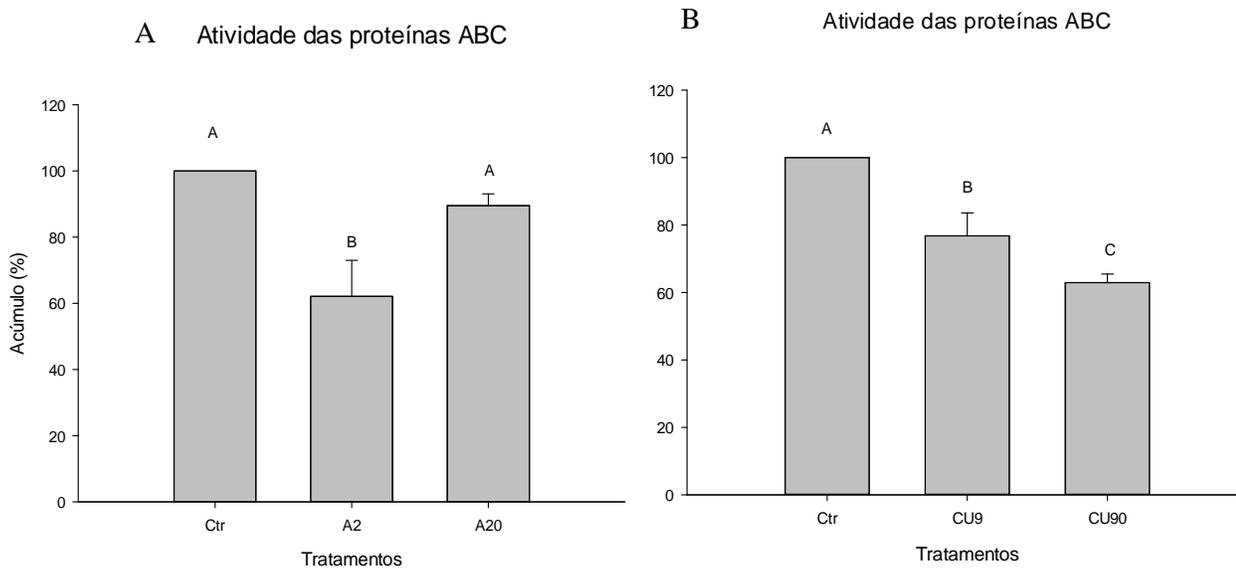


Figura 14 A atividade das proteínas ABC na microalga *Desmodesmus communis*, sendo as barras representadas pelas médias (\pm SE) do acúmulo da rodamina (%) em relação as diferentes concentrações testadas Sendo Ctrl = controle. Gráfico (A) referente a atividade nas microalgas expostas a atrazina, sendo A2 = atrazina 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Gráfico (B) referente a atividade nas microalgas expostas ao cobre CU9= cobre 9 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Letras diferentes significam diferença estatística.

Em todas as misturas de atrazina com cobre, observou-se maior atividade das proteínas do que as das proteínas das algas controle, expulsando da célula cerca de 40% da rodamina. Entretanto, na mistura A20CU9 a presença de cobre associado à atrazina gerou uma atividade maior do que quando o cobre isolado e passou a ter atividade na atrazina 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ que não havia quando isolada. Na mistura de maior concentração testada (atrazina 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e cobre 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$) teve uma ativação ainda maior do que quando separados, expulsando cerca de 60% da rodamina exposta ($P > 0,001$; $n = 5-7$) (Fig 15).

Atividade das proteínas ABC

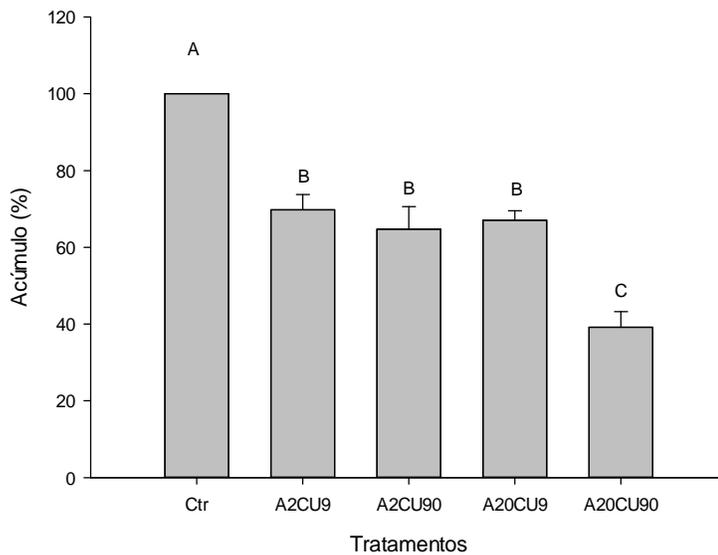


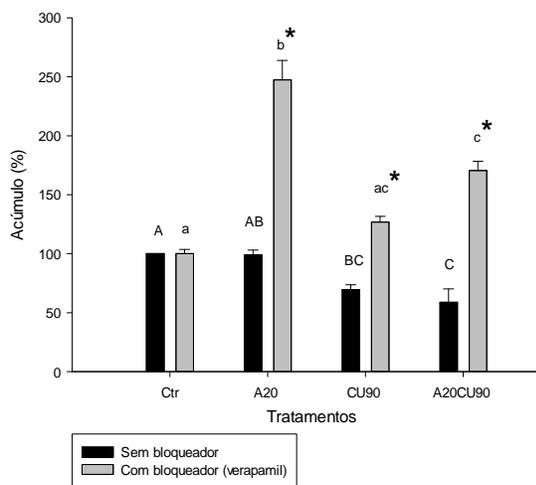
Figura 15 A atividade das proteínas ABC na microalga *Desmodesmus communis*, sendo as barras representadas pelas médias (\pm SE) do acúmulo da rodamina (%) em relação as diferentes concentrações testadas. Sendo Ctr = controle, A2 = atrazina 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ CU9= cobre 9 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Letras diferentes significam diferença estatística.

2.4.2.2- Atividade das proteínas em relação aos bloqueadores

Quando comparado o acúmulo de rodamina em algas submetidas à atrazina 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ com e sem bloqueador para Pgp (verapamil), pode ser observado que na presença de verapamil o acúmulo de rodamina dobrou em relação ao tratamento sem bloqueador. Nas algas expostas ao cobre 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ houve também um aumento do acúmulo de rodamina em relação ao cobre sem o bloqueador. A mistura testada (atrazina 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e cobre 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$) com o verapamil bloqueando a P-gp, obteve um aumento no acúmulo do corante (cerca de 50%) em relação ao tratamento que não possuía bloqueador ($P < 0,001$; $n = 3 - 17$) (Fig 16 A).

Quando o bloqueador de proteínas MRP, MK-571, foi avaliado que não houve variação significativa entre os tratamentos ($P < 0,001$; $n = 3 - 17$, Fig 16 B).

A Atividade proteínas ABC - Verapamil



B Atividade das proteínas ABC - MK-571

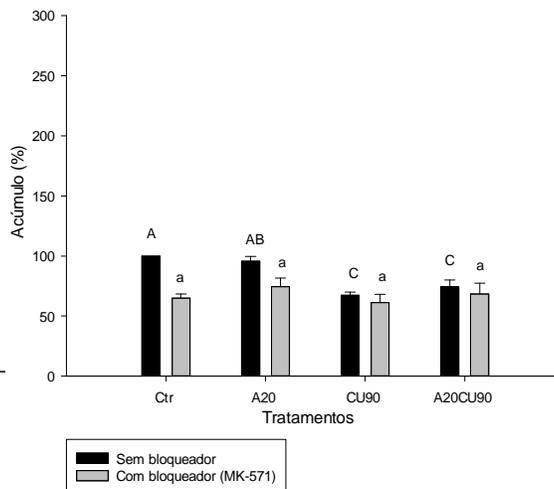


Figura 16 Atividade das proteínas do complexo MXR em relação aos bloqueadores específicos, as barras são representadas pelas médias (\pm SE) da retenção de rodamina em relação às diferentes concentrações dos dois contaminantes, barras pretas são as concentrações em atividade normal enquanto que as cinzas possuem bloqueador. Sendo Ctr = controle, A20= atrazina 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, CU90= cobre 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e A20CU90= atrazina 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ misturado com cobre 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$. (A) Bloqueador Verapamil, (B) Bloqueador MK-751).

2.5- Discussão

Este estudo teve o objetivo de avaliar a citotoxicidade (através de dois alvos) dos contaminantes atrazina e cobre, isolados e associados, na microalga *Desmodesmus communis*, diante de sua capacidade de defesa. Em relação à exposição à atrazina, a concentração considerada segura pela legislação brasileira não foi citotóxica, sendo apenas a maior concentração danosa para a microalga. Todavia, para o cobre, a concentração considerada segura foi citotóxica para os organismos. Quanto à mistura dos contaminantes apenas a maior concentração causou efeito citotóxico.

Neste estudo, microalgas expostas à atrazina, em todas as concentrações testadas, não apresentaram alteração na integridade de sua membrana, enquanto que a funcionalidade mitocondrial reduziu nas microalgas expostas à maior concentração testada (20 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Na microalga, *Chlamydomonas reinhardtii*, exposta por 24h à concentração subletal da atrazina (0,25 μM equivalente a 54 $\mu\text{g.L}^{-1}$) foi observado que a integridade da membrana não se alterou (Esperanza et al. 2015). Os autores observaram maior expressão de genes relacionados a formação de energia, houve um aumento na atividade do metabolismo para

compensar o estresse causado pela atrazina, e concluíram que houve uma proteção da membrana por mais tempo do que outras funções celulares (Esperanza et al. 2015). No entanto, para *Desmodesmus communis* a funcionalidade mitocondrial (envolvida com a atividade de produção de energia), foi alvo da citotoxicidade nas microalgas expostas à maior concentração testada de atrazina ($20 \mu\text{g.L}^{-1}$). Enquanto a integridade da membrana não indicou citotoxicidade em nenhuma situação, corroborando o proposto por Esperanza e colaboradores (2015).

A funcionalidade mitocondrial pode ter sido um alvo mais sensível em apontar a citotoxicidade nos organismos expostas à atrazina devido à natureza do contaminante. Como dito anteriormente, a ação da atrazina sobre as ervas-daninhas tem efeito inibidor da fotossíntese, as microalgas por serem organismos fotossintéticos são afetadas pelo herbicida (Mattoo et al. 1984; Berard e Pelte 1999).

Quando as microalgas foram expostas ao cobre, a integridade da membrana evidenciou citotoxicidade da concentração considerada segura pela legislação brasileira ($9 \mu\text{g.L}^{-1}$) e assim como também de $90 \mu\text{g.L}^{-1}$, a funcionalidade mitocondrial não se mostrou sensível. Thomás e Colaboradores (1977) observaram em fitoplâncton, expostos, cronicamente, a concentrações de cobre (10 , 23 e $50 \mu\text{g.L}^{-1}$), que nos primeiros dias havia inibição da fotossíntese nas maiores concentrações (23 e $50 \mu\text{g.L}^{-1}$), porém ao longo do tempo o fitoplâncton se recupera do estresse. Apesar das concentrações utilizadas serem próximas às testadas para *Desmodesmus communis*, não foi evidenciado alteração na funcionalidade mitocondrial. O fato da fotossíntese poder sofrer alteração não necessariamente reflete na alteração da funcionalidade mitocondrial.

Na espécie de diatomácea, *Phaeodactylum tricorutum*, quando exposta (4–96h) em diferentes concentrações de cobre ($0,05 - 1 \text{mg.L}^{-1}$) a viabilidade reduziu durante a exposição por 48h nas concentrações testadas, os autores acreditam que a integridade da membrana pode ter sido afetada pelo estresse oxidativo gerado pelo cobre (Cid et al. 1996). Apesar da metodologia e o tempo de exposição no estudo realizado por Cid e colaboradores (1996) serem diferentes do presente estudo, a exposição da *Desmodesmus communis* a concentração menor e aguda de cobre evidenciou citotoxicidade, logo, este resultado sustenta a sensibilidade do vermelho neutro em verificar a integridade da membrana.

A associação dos contaminantes (atrazina e cobre) não se mostrou citotóxica para as microalgas, segundo à integridade da membrana, entretanto quando foi avaliada a funcionalidade mitocondrial a maior combinação testada (A20CU90) apontou citotoxicidade. Quando Chia e Colaboradores (2015) estudaram o efeito da exposição por 4 dias à mistura da atrazina ($0,005 - 0,50 \text{ mg.L}^{-1}$) o cobre ($1 - 2 \text{ mg.L}^{-1}$) foi estudado em *Scenedesmus quadricauda*, os resultados encontrados apontaram inibição do crescimento da microalga e estimulação da produção de proteínas antioxidantes. Logo, os autores indicaram que os contaminantes geraram um efeito aditivo aumentando a citotoxicidade (Chia et al. 2015). Em *Desmodesmus communis*, a maior concentração da mistura dos contaminantes resultou na diminuição da funcionalidade mitocondrial, no entanto, não foi observado um efeito aditivo.

Como mencionado acima, apenas as maiores concentrações da atrazina e da mistura ($20 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ e A20CU90, respectivamente) foram citotóxicas, e quanto ao cobre foram as concentrações de 9 e $90 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$. Uma hipótese que explique porque as outras concentrações não geraram citotoxicidade é o fato de que as linhas de defesa da célula se apresentam ativas, atuando na extrusão e/ou biotransformação dos contaminantes através das proteínas ABC, envolvidas no fenótipo MXR.

Assim, complementando os ensaios de citotoxicidade, foi estudada a resistência a multixenobióticos. As microalgas expostas às concentrações de atrazina e cobre isolados, mostraram que as proteínas estavam ativas, sendo $20 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ da atrazina e $90 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre as concentrações com maior atividade que as demais condições. A expressão da P-gp em células de fígado de rato exposto à atrazina ($10 - 300 \text{ mg.kg}^{-1}$) por 5 dias, variou com o tempo de exposição. Ou seja, quanto maior o tempo em que as células foram expostas à atrazina maior era a expressão da P-gp, sendo 24h o primeiro tempo em que a proteína estava sendo expressa (Islam et al. 2002). Na microalga, estudada aqui, com 6h de exposição à atrazina, já foi possível evidenciar que a proteína estava ativa. Em uma espécie de alga marinha *Scytosiphon gracilis* foi verificada expressão de proteínas ABC na presença de $100 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre (Contreras et al. 2010), concentração próxima à maior testada para *Desmodesmus communis* ($90 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) na qual a proteína também estava ativa.

Comparando os resultados da citotoxicidade com a atividade das proteínas

ABC, observa-se que a concentração de atrazina permitida pela legislação brasileira ($2 \mu\text{g.L}^{-1}$) não foi citotóxica, entretanto houve um aumento na atividade da proteína de defesa. Logo essa concentração não está sendo citotóxica em função da maior atividade das proteínas que realizam a extrusão do contaminante. Por outro lado, em $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina onde foi observada citotoxicidade a proteína apresentou atividade das proteínas próxima ao controle, neste caso, o sistema de defesa deixa de responder nessa faixa de concentração e o efeito tóxico é observado. Em relação ao cobre, *Desmodesmus communis* já respondeu com defesa celular (ativação da proteína) na concentração considerada segura pela legislação brasileira ($9 \mu\text{g.L}^{-1}$), assim como na concentração mais alta ($90 \mu\text{g.L}^{-1}$). Em ambas situações as proteínas apresentaram aumento da atividade, e mesmo assim as duas concentrações foram citotóxicas para célula. O que significa que mesmo com a proteína realizando a defesa da célula para essa concentração ($90 \mu\text{g.L}^{-1}$) não foi o suficiente para manter a célula sadia, indicando alta citotoxicidade.

A combinação dos contaminantes para análise da defesa celular foi baseada nas concentrações testadas separadamente, todas as concentrações apresentaram um aumento na atividade das proteínas ABC na microalga. Sendo a mistura de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina com $90 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre a condição que evidenciou a maior ativação das proteínas ABC. Dentre as misturas, essa concentração (A20CU90) foi a única a ser tóxica para a célula nos ensaios de citotoxicidade. Cabe ressaltar que a literatura a respeito da resistência a multixenobióticos e algas é principalmente voltada à expressão gênica das diferentes proteínas da família ABC (Rea, 1999; Klein et al. 2006; Contreras, 2009). Sendo muito escassas as informações sobre a atividade das proteínas de defesa, tendo ainda alguns relatos sobre bloqueadores de vias de extrusão. Assim, diante desta situação é difícil a discussão sobre atividade das proteínas de defesa com dados prévios com outras espécies e contaminantes.

Para estudar as vias que a microalga poderia estar utilizando para expulsar o contaminante, foi avaliado o efeito de dois bloqueadores de proteínas ABC, o verapamil (bloqueador de P-gp, ABCBs) e o MK-571 (bloqueador de MRP, ABCCs) juntos aos diferentes tratamentos em que foi avaliada a atividade das proteínas ABC. Nas análises com verapamil foi observado que na exposição à atrazina ($20 \mu\text{g.L}^{-1}$) houve uma inibição (mais de 100%) da atividade da proteína, indicando que a P-gp é uma via de extrusão importante para o contaminante.

Quanto ao cobre $90 \mu\text{g.L}^{-1}$ houve também uma inibição (quase 100%) da proteína, nas microalgas, na presença de verapamil. As microalgas expostas à associação dos contaminantes (atrazina $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ e cobre $90 \mu\text{g.L}^{-1}$), na presença do bloqueador verapamil, também evidenciaram inibição da atividade da P-gp.

Para a microalga *D. communis*, os tratamentos que receberam o bloqueador MK-571 (inibidor da proteína MRP/ABCC) não mostraram diferença em relação aos grupos que não tiveram a proteína bloqueada, não evidenciando a inibição de atividade da MRP. Scherer e colaboradores (2007) estudaram a resistência a multixenobióticos, em uma espécie de diatomácea, e utilizaram inibidores das proteínas de extrusão celular, o verapamil e o MK-571. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que o verapamil, testado em diferentes concentrações ($50 - 160 \mu\text{M}$), não mostrou inibição dos mecanismos de defesa na diatomácea. Enquanto que o MK-571 inibiu as vias de defesa da célula quando expostas a concentrações maiores que $50 \mu\text{M}$. O resultado do estudo realizado com a diatomácea é diferente dos dados encontrados neste estudo, onde o verapamil apresentou efeito ao inibir as vias de extrusão dos xenobióticos testados (atrazina, cobre e mistura), enquanto que o MK-571 não mostrou diferença.

2.6- Conclusão

A sensibilidade dos testes de citotoxicidade pode estar relacionada com o tipo de contaminante e seu alvo de ação. A atrazina mostrou-se ter como alvo a mitocôndria, tendo a citotoxicidade evidenciada no ensaio da funcionalidade mitocondrial. Enquanto que para o cobre o teste mais sensível foi o relacionado à integridade da membrana plasmática, possivelmente como efeito do possível estresse oxidativo desencadeado pelo metal (Morcillo et al., 2015). Para a mistura dos contaminantes a funcionalidade mitocondrial foi mais sensível, mas apenas a mistura das maiores concentrações dos contaminantes foi citotóxica (A20Cu90), indicando maior efeito da atrazina.

Os resultados da resistência a multixenobióticos mostraram uma relação inversa com a citotoxicidade, a concentração de atrazina permitida pela legislação brasileira ($2 \mu\text{g.L}^{-1}$) não apresentou citotoxicidade, pelo fato das proteínas ABC estarem ativas. Quanto ao cobre, as concentrações testadas foram citotóxicas mesmo com a atividade das proteínas ABC. Por fim, todas as combinações de mistura mostravam proteínas ABC ativas, e ainda assim a maior delas apresentou

citotoxicidade. No sistema de defesa MXR, as P-gp parecem ser uma via importante para a defesa celular.

2.7- Referências bibliográficas

- An SS, Friedl T, Hegewald E (1999) Phylogenetic Relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like Coccoid Green Algae as Inferred from ITS-2 rDNA Sequence Comparisons. *Plant Biol* 1:418–428. doi: 10.1111/j.1438-8677.1999.tb00724.x
- Barbosa, F. G., Wallner-Kersanach, M., Baumgarten, M. D. G. Z. (2012) Metais traço nas águas portuárias do estuário da Lagoa dos Patos, RS.
- Bard S (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 48:357–389. doi: 10.1016/S0166-445X(00)00088-6
- Baxter L, Brain R, Prosser R, et al (2013) Sensitivity of a green alga to atrazine is not enhanced by previous acute exposure. *Environ Pollut* 181:325–328. doi: 10.1016/j.envpol.2013.06.019
- Berard A, Pelte T (1999) Les herbicides inhibiteurs du photosystème II, effets sur les communautés algales et leur dynamique. *Rev Sci Eau* 12:333. doi: 10.7202/705355ar
- Broeks, A., Gerrard, B., Allikmets, R., Dean, M., & Plasterk, R. H. (1996). Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal*, 15(22), 6132.
- Bicudo CE de M, Menezes M (2006) Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. Rima, Sao Carlos 508p
- Campanella L, Cubadda F, Sammartino M., Saoncella A (2001) An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Res* 35:69–76. doi: 10.1016/S0043-1354(00)00223-2
- Chia MA, Galadima SY, Japhet WS (2015) Combined effect of atrazine and copper on the growth, biomass production, morphology and antioxidant response of *Scenedesmus quadricauda*. *Phycologia* 54:109–117. doi: 10.2216/14-71.1
- Cid A, Fidalgo P, Herrero C, Abalde J (1996) Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry. *Cytometry* 25:32–36. doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(19960901)25:1<32::AID-CYTO4>3.0.CO;2-G
- Contreras L, Moenne A, Gaillard F, et al (2010) Proteomic analysis and identification of copper stress-regulated proteins in the marine alga

Scytosiphon gracilis (Phaeophyceae). *Aquat Toxicol* 96:85–89. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.10.007

Contreras M (2009) ABC of transfusion. Blackwell Pub., Malden, MA. 128p

Costa, L. D. F., e Wallner-Kersanach, M.(2013) Assessment of the labile fractions of copper and zinc in marinas and port areas in Southern Brazil. *Environmental monitoring and assessment*, 185(8), 6767-6781.

Crippen RW, Perrier JL (1974) The Use of Neutral Red and Evans Blue for Live-Dead Determinations of Marine Plankton (With Comments on the Use of Rotenone for Inhibition of Grazing). *Stain Technol* 49:97–104. doi: 10.3109/10520297409116949

Da Luz DS, Da Silva DG, Souza MM, et al (2016) Efficiency of Neutral Red, Evans Blue and MTT to assess viability of the freshwater microalgae *Desmodesmus communis* and *Pediastrum boryanum*: Methods to assess microalgae viability. *Phycol Res* 64:56–60. doi: 10.1111/pre.12114

- Esperanza M, Seoane M, Rioboo C, et al (2015) *Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress. *Aquat Toxicol* 165:64–72. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.05.012
- Gottesman MM, Pastan I (1993) Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. *Annu Rev Biochem* 62:385–427. doi: 10.1146/annurev.bi.62.070193.002125
- Guillard RRL, Lorenzen CJ (1972) Yellow-green algae with *chlorophyllide C*². *J Phycol* 8:10–14. doi: 10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x
- Hanikenne M (2005) A Comparative Inventory of Metal Transporters in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the Red Alga *Cyanidioschyzon merolae*. *PLANT Physiol* 137:428–446. doi: 10.1104/pp.104.054189
- IBAMA (2012) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3> Acessado em: 3 abr 2016
- IBGE (2010) Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Indicadores de desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro,. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 3 abr. 2016.
- Islam MO, Hara M, Miyake J (2002) Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazine. *Environ Toxicol Pharmacol* 12:1–6. doi: 10.1016/S1382-6689(01)00121-1
- Klein M, Burla B, Martinoia E (2006) The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Lett* 580:1112–1122. doi: 10.1016/j.febslet.2005.11.056
- Laviale M, Morin S, Créach A (2011) Short term recovery of periphyton photosynthesis after pulse exposition to the photosystem II inhibitors atrazine and isoproturon. *Chemosphere* 84:731–734. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.03.035
- Long Y, Li Q, Wang Y, Cui Z (2011) MRP proteins as potential mediators of heavy metal resistance in *zebrafish* cells. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 153:310–317. doi: 10.1016/j.cbpc.2010.12.001
- Martinoia E, Klein M, Geisler M, et al (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters – more than just detoxifiers. *Planta* 214:345–355. doi: 10.1007/s004250100661
- Mattoo AK, St. John JB, Wergin WP (1984) Adaptive reorganization of protein and lipid components in chloroplast membranes as associated with herbicide binding. *J Cell Biochem* 24:163–175. doi: 10.1002/jcb.240240207
- Mirlean, N., Andrus, V. E., Baisch, P. (2003a). Mercury pollution sources in

- sediments of Patos lagoon estuary, Southern Brazil. *Marine pollution bulletin*, 46(3), 331-334.
- Mirlean, N., Andrus, V. E., Baisch, P., Griep, G., Casartelli, M. R. (2003b). Arsenic pollution in Patos Lagoon estuarine sediments, Brazil. *Marine pollution bulletin*, 46(11), 1480-1484.
- Rea PA (1999) MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast. *J Exp Bot* 50:895–913. doi: 10.1093/jxb/50.Special_Issue.895
- Scherer C, Wiltshire K, Bickmeyer U (2008) Inhibition of multidrug resistance transporters in the diatom *Thalassiosira rotula* facilitates dye staining. *Plant Physiol Biochem* 46:100–103. doi: 10.1016/j.plaphy.2007.10.012
- Schulz B, Kolukisaoglu HÜ (2006) Genomics of plant ABC transporters: The alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? *FEBS Lett* 580:1010–1016. doi: 10.1016/j.febslet.2006.01.002
- Thomas, W. H., & Seibert, D. L. (1977). Effects of copper on the dominance and the diversity of algae: controlled ecosystem pollution experiment. *Bulletin of Marine Science*, 27(1), 23-33.
- Thomas, W. H., Holm-Hansen, O., Seibert, D. L. R., Azam, F., Hodson, R., & Takahashi, M. (1977). Effects of copper on phytoplankton standing crop and productivity: controlled ecosystem pollution experiment. *Bulletin of Marine Science*, 27(1), 34-43.
- Trebst A, Hilp U, Draber W (1993) Response in the inhibitor efficiency of substituted phenols on ps II activity in six mutants of the D1 protein subunit in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 33:969–977. doi: 10.1016/0031-9422(93)85006-D
- Wanke D, Üner Kolukisaoglu H (2010) An update on the ABCC transporter family in plants: many genes, many proteins, but how many functions?: An update on the ABCC transporter family in plants. *Plant Biol* 12:15–25. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00380.x
- Weiner JA, DeLorenzo ME, Fulton MH (2004) Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquat Toxicol* 68:121–128. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.03.004
- Yang H, Huang Z-Y, Li J, Hu Y (2014) MT-like proteins: Potential bio-indicators of *Chlorella vulgaris* for zinc contamination in water environment. *Ecol Indic* 45:103–109. doi: 10.1016/j.ecolind.2014.03.017
- Zaja R, Klobučar RS, Smital T (2007) Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux

Discussão geral

No ambiente natural inúmeros fatores podem afetar a presença de contaminantes e a interação com os diferentes tipos celulares. O objetivo deste estudo foi verificar como dois contaminantes de diferentes características químicas, como a atrazina (composto orgânico) e o cobre (composto inorgânico), podem interagir com dois modelos celulares distintos, animal e vegetal. Os modelos utilizados foram a microalga de água doce *Desmodesmus communis*, e os hepatócitos de *zebrafish* (ZF-L) que, ambos foram expostos a atrazina e cobre (isolados e associados).

Os ensaios de citotoxicidade tiveram dois parâmetros celulares como alvo: integridade lisossomal/integridade da membrana celular e a funcionalidade mitocondrial. Para a microalga foi realizado também a análise da resistência a multixenobióticos (MXR), neste estudo foi identificada a atividade das proteínas ABC, sem registros na literatura (que aborda essencialmente a expressão). Comparando os resultados encontrados para a microalga com os das células de *zebrafish*, em relação à exposição à atrazina, apenas a maior concentração testada (20 µg.L⁻¹) foi citotóxica para ambos modelos, de acordo com alvos distintos, para a microalga a funcionalidade mitocondrial e para o *zebrafish* a integridade lisossomal. Os alvos celulares que identificaram citotoxicidade indicam relação com a natureza do contaminante e com o tipo celular.

A microalga foi mais sensível ao cobre do que os hepatócitos, pois já na concentração de 9 µg.L⁻¹ (CONAMA), além da de 90 µg.L⁻¹, foi evidenciado citotoxicidade em *D.communis*, enquanto que para as células de *zebrafish* apenas a maior concentração testada (90 µg.L⁻¹) foi citotóxica. Quanto para a mistura dos contaminantes, a única concentração que foi testada em ambos modelos foi as concentrações consideradas seguras pela legislação brasileira (A2CU9), a qual não foi citotóxica para nenhum dos modelos celulares estudados. No entanto cabe ressaltar, que a análise de defesa celular, realizado apenas nas microalgas, mostra que nesta condição as células apresentavam atividade aumentada das proteínas de extrusão de xenobióticos.

Estudos apontam microalgas como “detoxificadoras” dos ambientes, a presença desses organismos no ambiente pode diminuir a concentração de contaminantes através da biotransformação desses compostos, assim protegendo os consumidores do fitoplâncton. De acordo com este estudo a atividade das proteínas ABC defendem as células de sofrerem citotoxicidade.

A análise com modelos celulares distintos permite o pesquisador a ter uma noção do quanto esses contaminantes podem afetar os organismos presentes no mesmo ambiente. A microalga apresentou uma sensibilidade aos contaminantes próxima à dos hepatócitos de *zebrafish*, o que torna interessante para futuros estudos sobre citotoxicidade, podendo-se inferir que modelos celulares distintos podem estar sendo afetados de forma semelhante.