Biomarcadores como ferramentas para de monitoramento da contaminação aquática

inct
institutos nacionais
de ciência e tecnologia

INCT – TA
TOXICOLOGIA AQUÁTICA

CNPq

Biomarcadores Fisiológicos e Genéticos de Contaminação Aquática

Claudia Bueno dos Reis Martinez

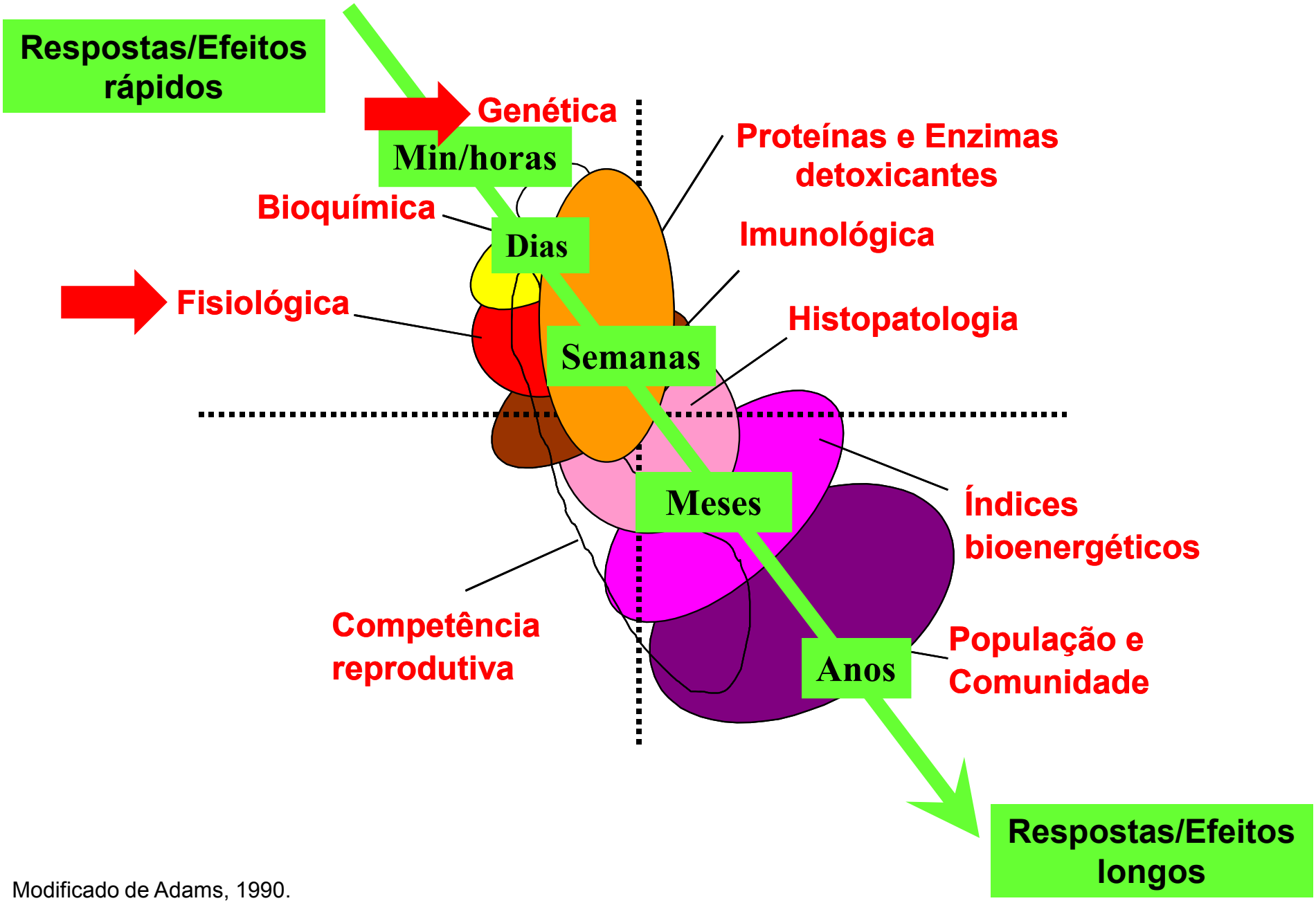
cbueno@uel.br

Departamento de Ciências Fisiológicas

LEFA

Laboratório de Ecofisiologia Animal
UEL

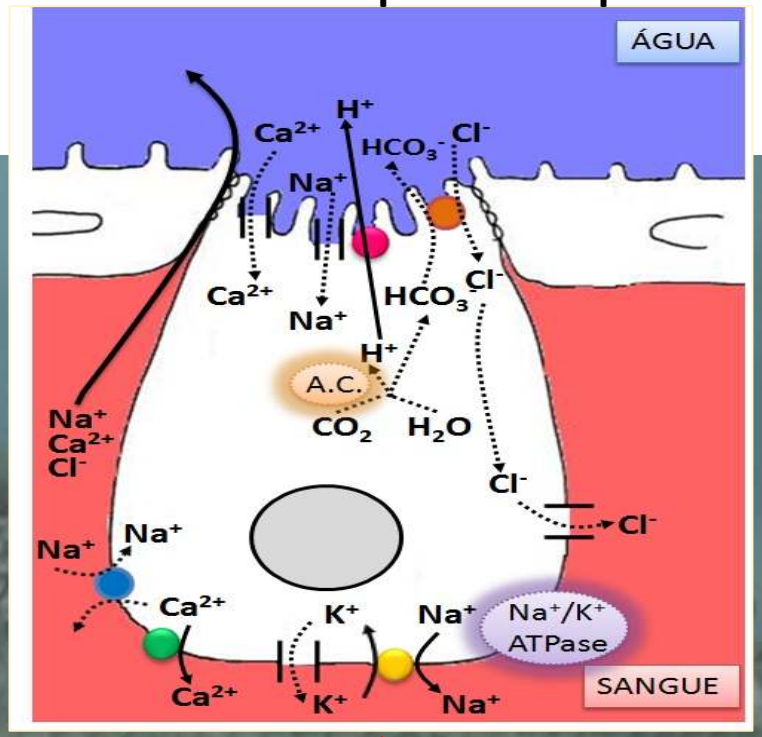
Universidade Estadual de Londrina



Modificado de Adams, 1990.

Peixes de água doce

Tomada de íons pelas brânquias



Água doce: 5 mOsm

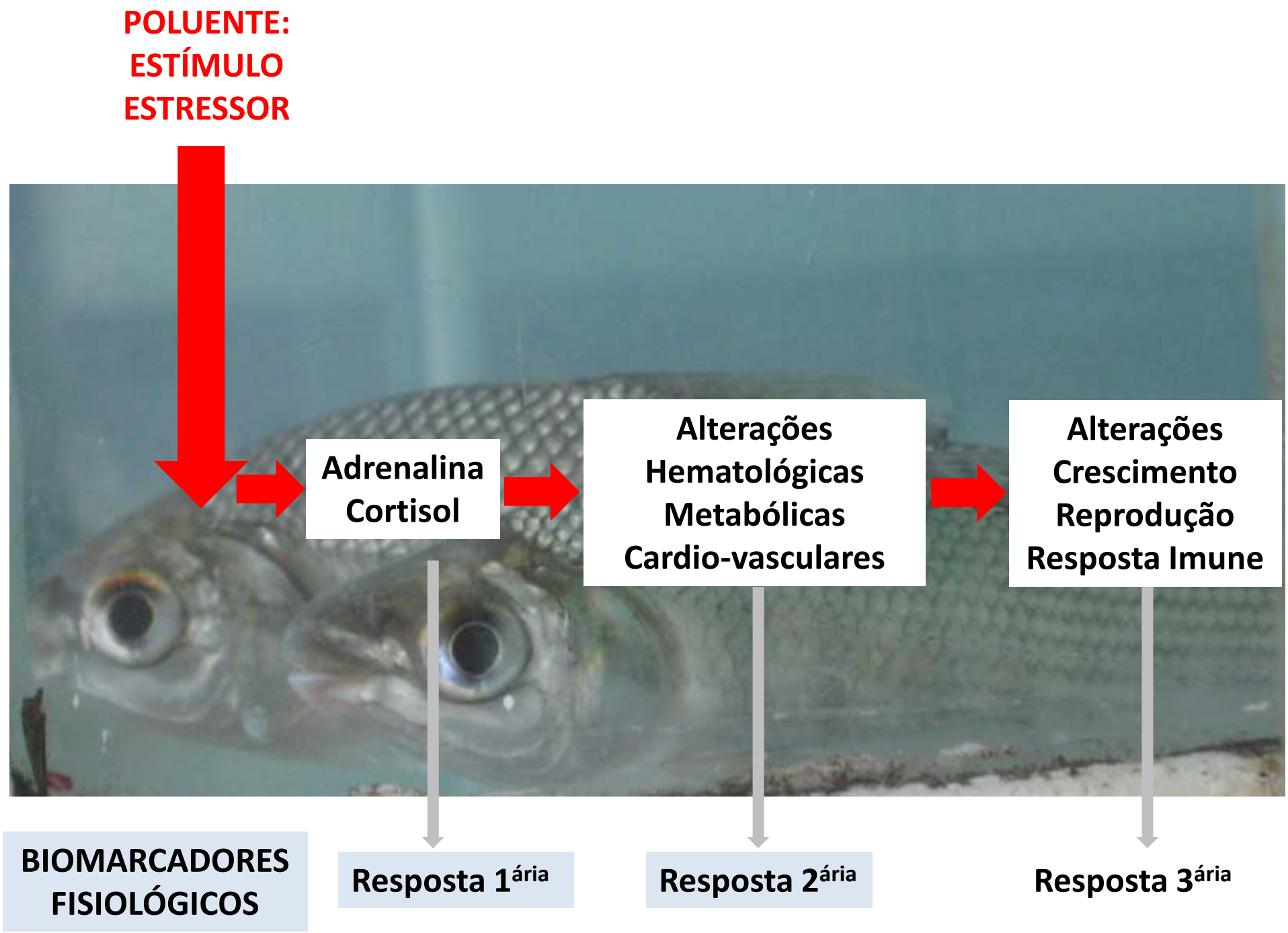
300 mOsm

ÁGUA

ÍONS

URINA DILUÍDA

BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS → **Íons e osmolaridade plasmática**
Atividade das enzimas ao transporte de íons


POLUENTE:
ESTÍMULO
ESTRESSOR
Adrenalina
Cortisol
Alterações
Hematológicas
Metabólicas
Cardio-vasculares
Alterações
Crescimento
Reprodução
Resposta Imune
BIOMARCADORES
FISIOLÓGICOS
Resposta 1ária
Resposta 2ária
Resposta 3ária

Pergamon

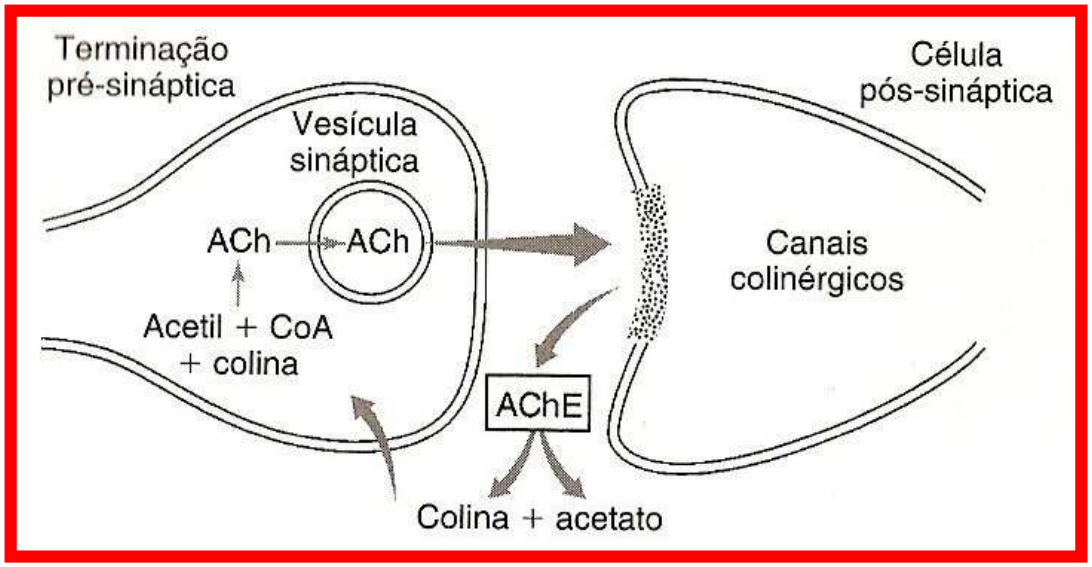
0025–326X(95)00112–3

Marine Pollution Bulletin, Vol. 32, No. 2, pp. 225–231, 1996
Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd
Printed in Great Britain. All rights reserved
0025–326X/96 $15.00+0.00

Acetylcholinesterase, an Old Biomarker with a New Future? Field Trials in Association with Two Urban Rivers and a Paper Mill in Newfoundland

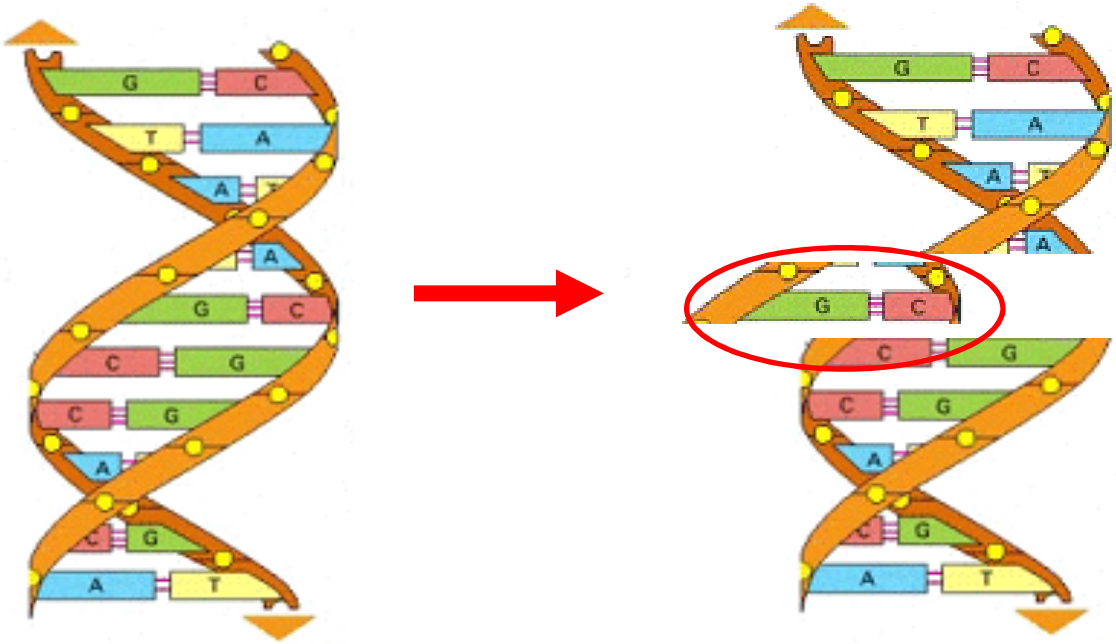
J. F. PAYNE, A. MATHIEU*, W. MELVIN and L. L. FANCEY

Acetilcolinesterase

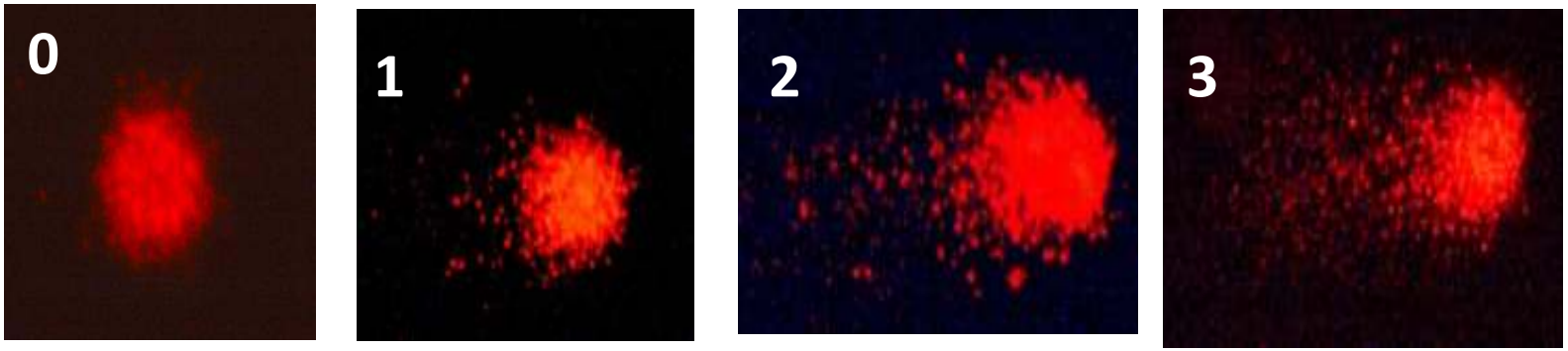


- Inibição da AChE no cérebro: alterações comportamentais
- Inibição da AChE no músculo: hiper estimulação das fibras musculares → pode causar tetania, paralisia e morte.
- **Distúrbios na atividade da AChE podem afetar locomoção, alimentação, fuga e comportamento reprodutivo**

POLUENTES

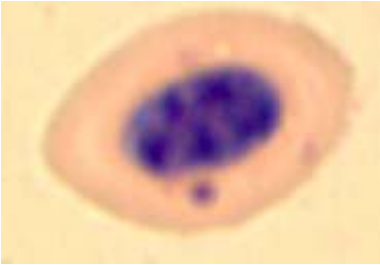


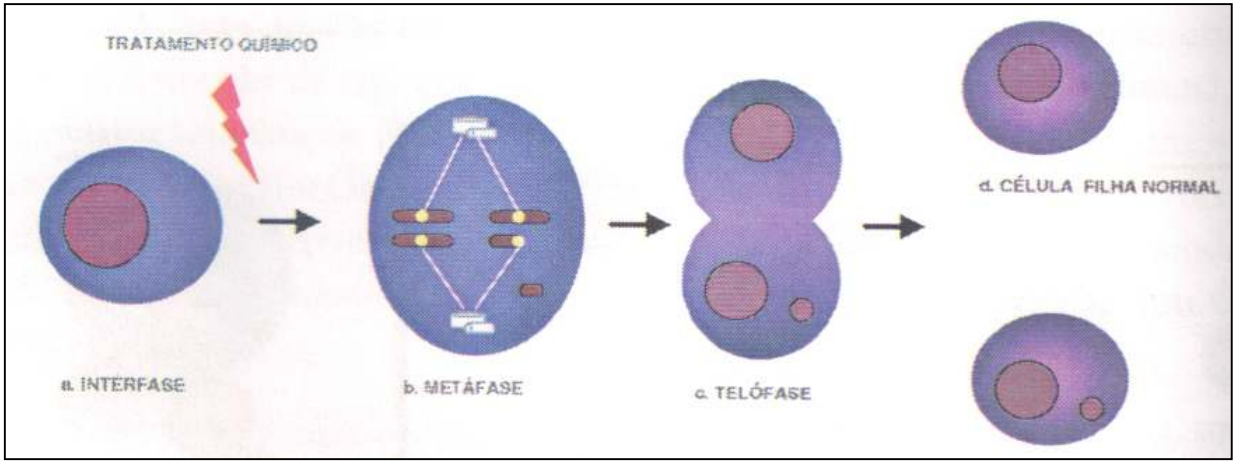
ENSAIO DO COMETA → Detecta lesões primárias no DNA, que não dependem de divisão celular

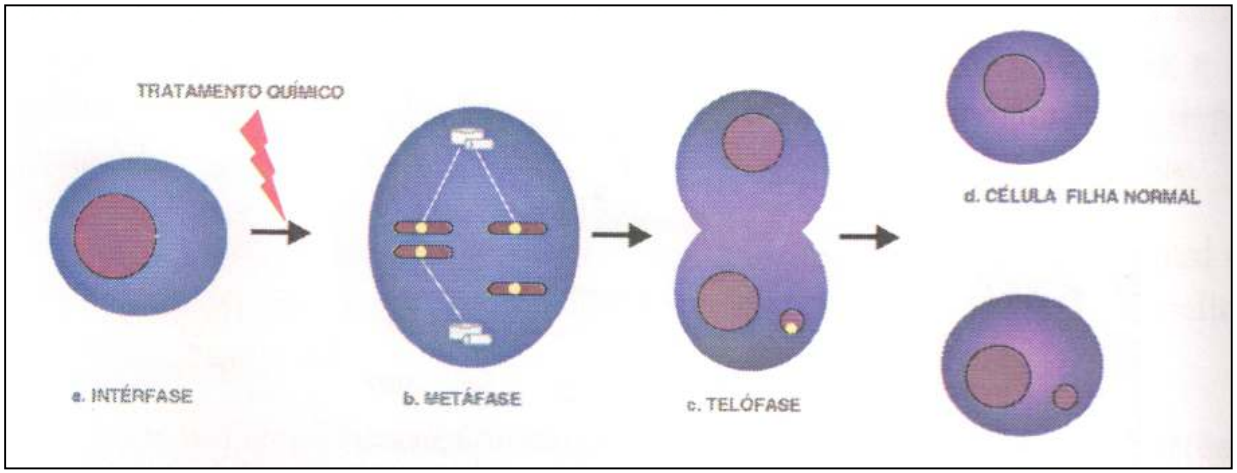


BIOMARCADOR GENÉTICO → QUEBRAS NO DNA → DANOS GENOTÓXICOS

Micronúcleos (MN) ➔ pequenos corpúsculos compostos por material cromossômico







Agente clastogênico:

Cromossomos

↓ **Quebra**

fragmentos

Agente aneugênico:

Segregação anormal

↓

Cromossomos inteiros

BIOMARCADOR GENÉTICO ➔ **FREQUÊNCIA DE MN** ➔ **DANOS MUTAGÊNICOS**

Classes de Contaminantes

Metais → **Alumínio**

Pesticidas → **Herbicidas a base de glifosato**

Combustíveis → **Derivados de Petróleo x Biocombustíveis**

Aquatic Toxicology 94 (2009) 40–46

Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*

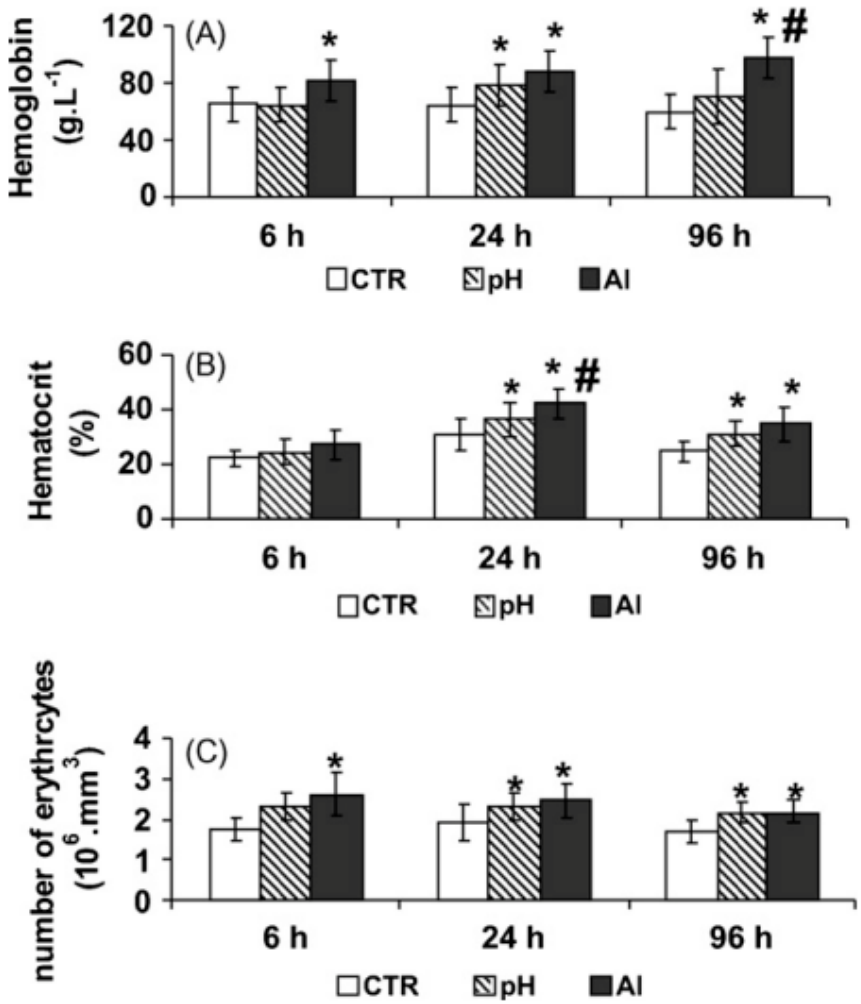
Marina M.P. Camargo[a,b], Marisa N. Fernandes[a], Cláudia B.R. Martinez[b,*]

Peixes expostos ao Al por 6, 24 e 96 h

[Al] testada: 196 µg de Al dissolvido L^{-1}

Resolução CONAMA 357 (2005): Concentração máxima permitida para água doce é 200 µg de Al dissolvido L^{-1}

Hematologia



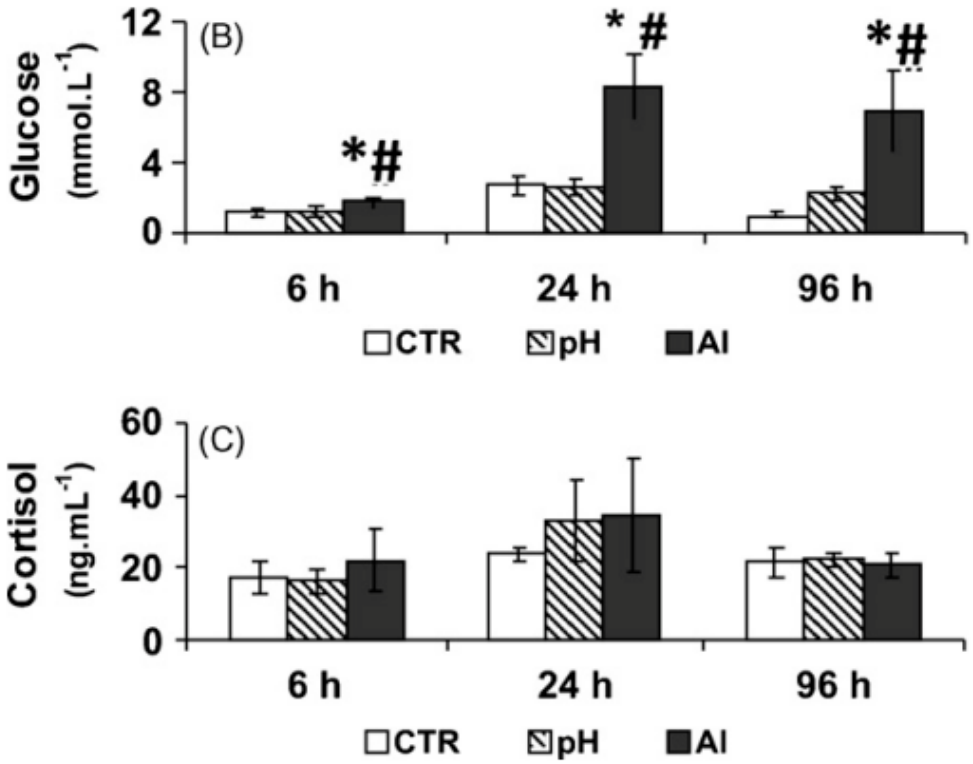
- Conteúdo de hemoglobina
- Hematócrito
- Número de eritrócitos

Aumento nos parâmetros hematológicos (Hb, Hct e RBC)

Resposta 2ária de estresse: aumento no número de hemácias circulantes, como consequência de contração esplênica.

Resposta de Estresse

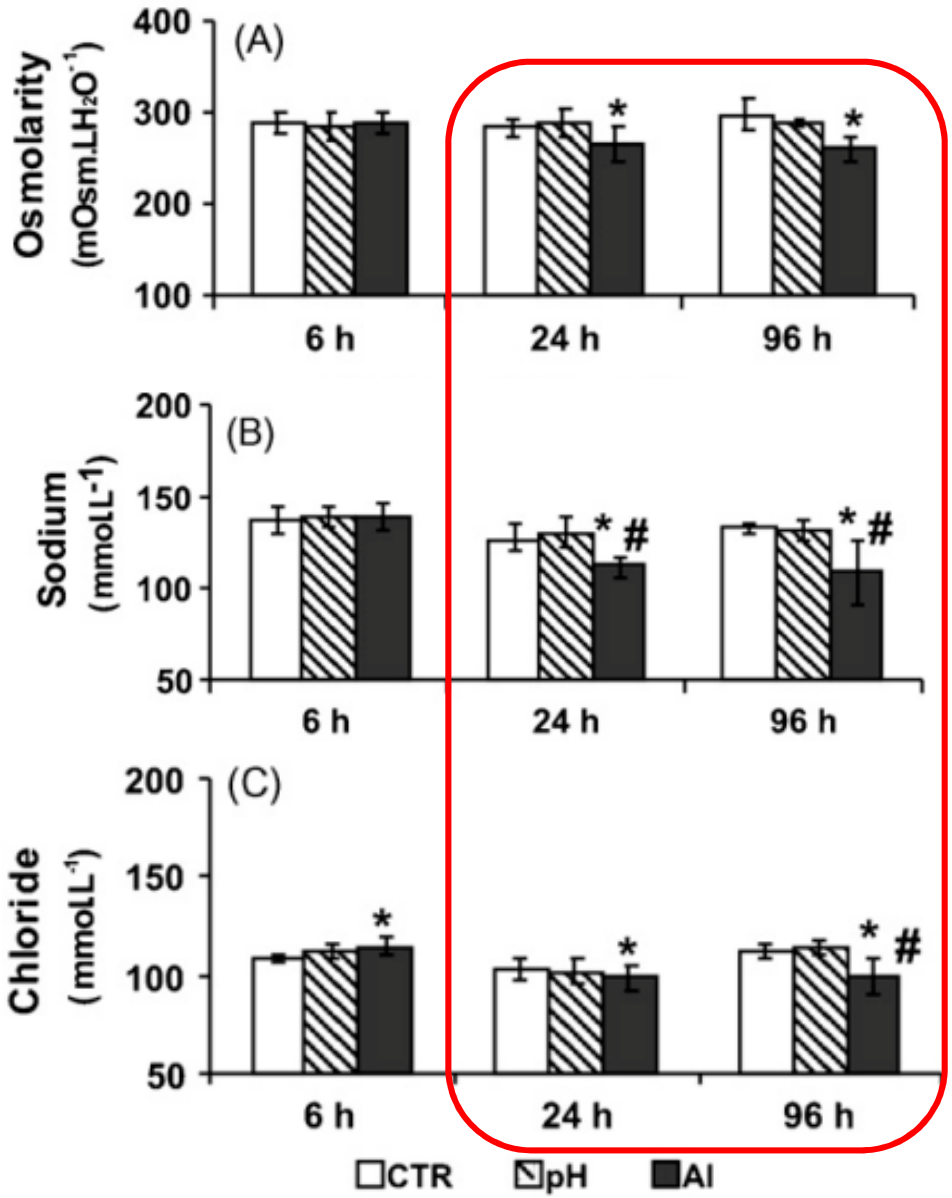
- Glicemia
- Cortisol



Aumento da glicemia (resposta 2ária de estresse)

Não foi detectado aumento de cortisol (resposta 1ária de estresse)

Regulação Osmo-iônica



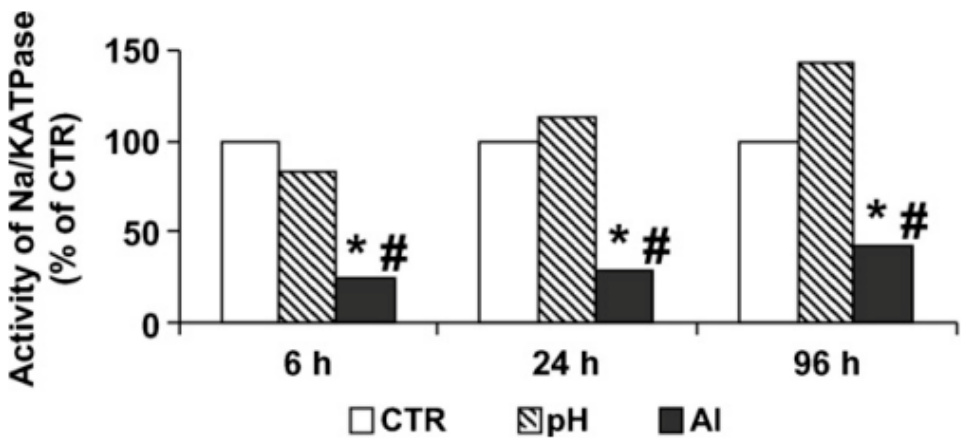
- Osmolaridade
- Íons plasmáticos: Na^+ e Cl^-

Redução nos íons Na^+ e Cl^- e redução na osmolaridade plasmática

Al interfere nas vias de tomada de íons?

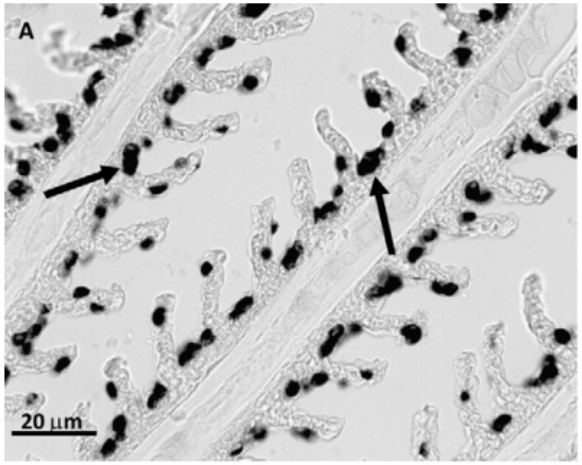
Tomada Iônica

- Atividade da Na^+/K^+ - ATPase
- Células cloreto ou MRC

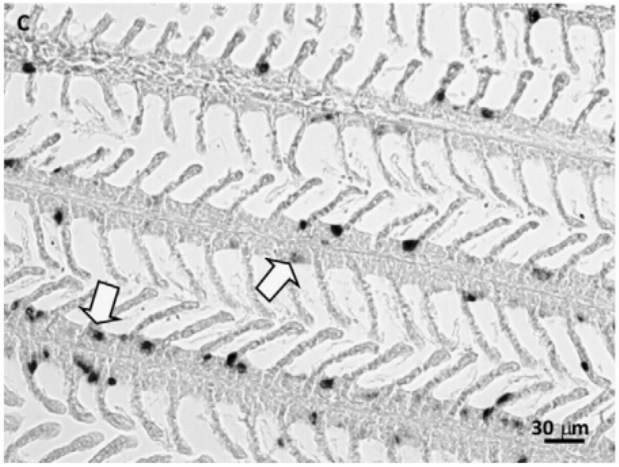


Al diminuiu a atividade da Na^+/K^+-ATPase e a densidade de células cloreto nas brânquias

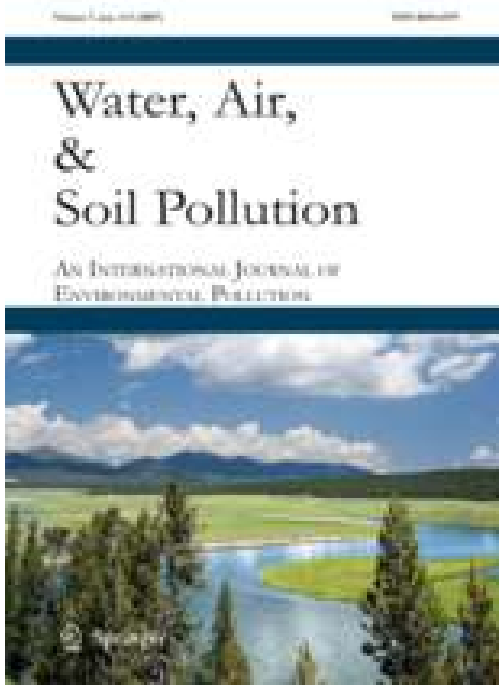
Controle



Alumínio

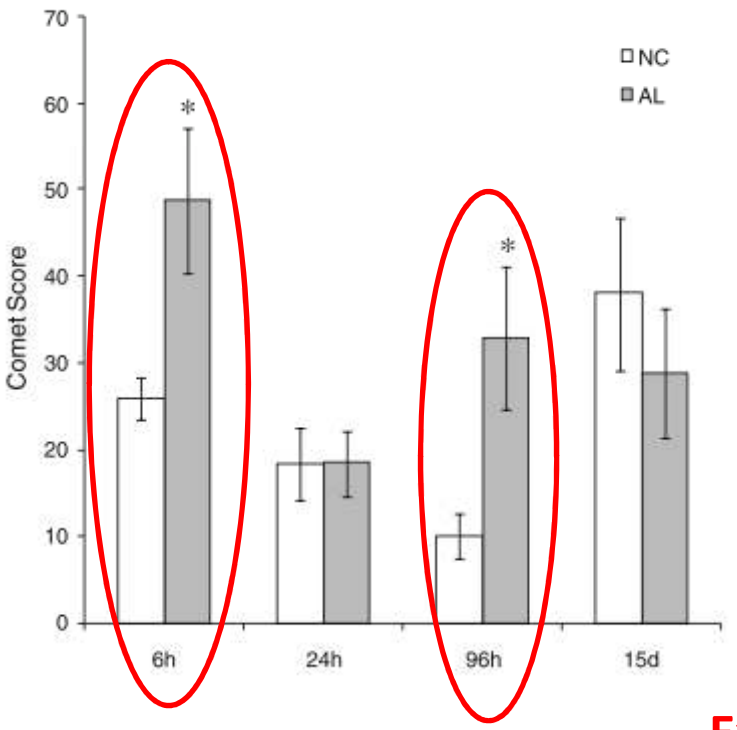


Water Air Soil Pollut
DOI 10.1007/s11270-010-0357-5



Genotoxic Effects of Aluminum on the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*

Bruno A. Galindo · Gabriel Troilo · Ilce Mara S. Cólus · Cláudia B. R. Martinez · Silvia H. Sofia



Time	Group	N	MN frequency (‰)	ENA frequency (‰)
24 h	NC	8	0	1.44±0.44
	Al	10	0.17±0.11	4.30±0.83*
96 h	NC	9	0.09±0.09	2.73±0.86
	Al	12	0.27±0.14	5.00±1.12*
15 days	NC	5	0	3.25±0.22
	Al	9	0.22±0.15	6.75±1.15*

Exposição ao Al: promoveu danos genotóxicos, mas não promoveu danos mutagênicos

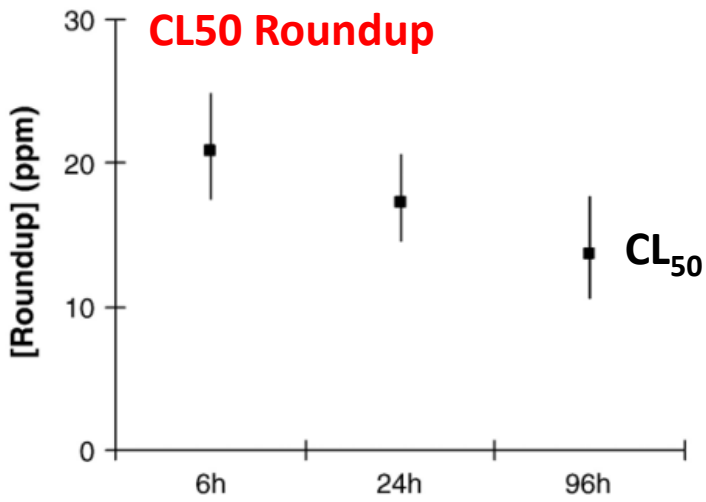
Resolução CONAMA 357 (2005):
Concentração máxima permitida para água doce é 200 µg de Al dissolvido L^{-1}

Nossos resultados mostram que esta concentração limite promove danos fisiológicos e genotóxicos para uma espécie de peixe neotropical

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 147 (2008) 222 – 231
CBP
www.elsevier.com/locate/cbpc

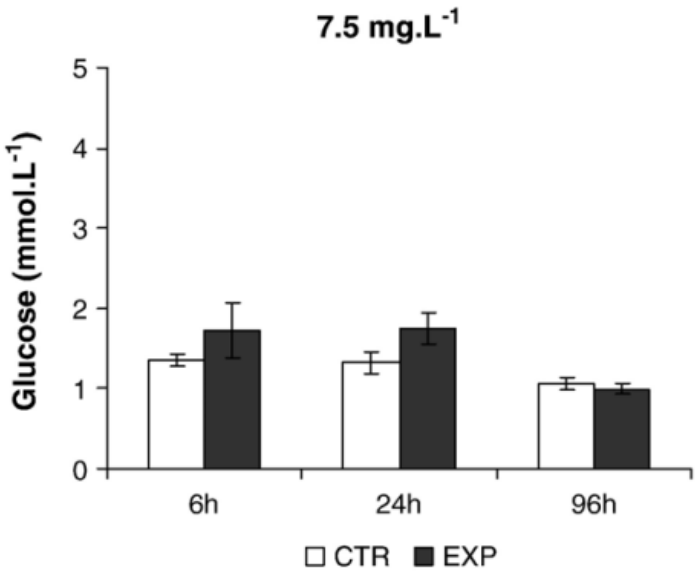
Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*

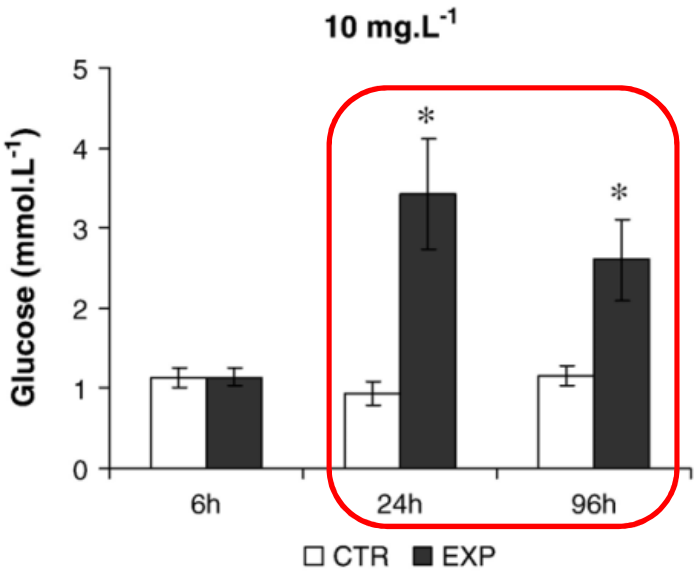
Vivian do Carmo Langiano, Cláudia B.R. Martinez *



CL_{50} (96h): 13,69 mg L^{-1}

Corpos d´água podem apresentar concentrações de até 3,7 mg L^{-1} glifosato ou 9 mg L^{-1} de Roundup





Chemosphere 78 (2010) 294–299

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

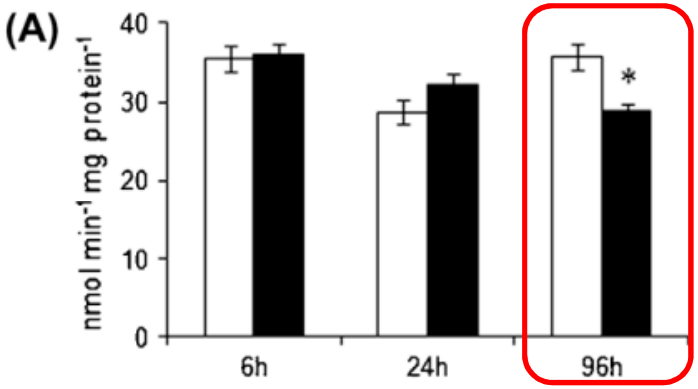
Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*

Kathya A. Modesto, Cláudia B.R. Martinez *

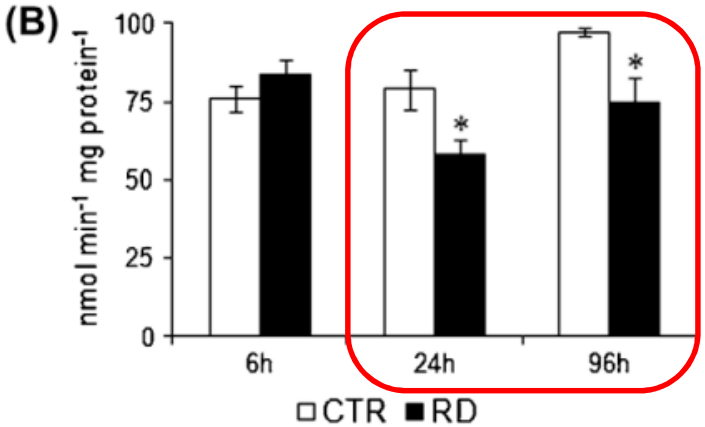
Roundup : 10 mg L^{-1}

Δt: 6, 24 e 96 h

AChE no cérebro



AChE no músculo



Chemosphere xxx (2010) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

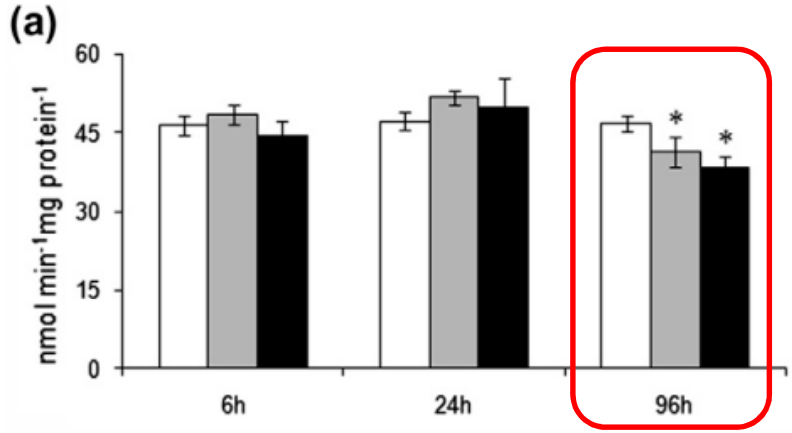
Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity

Kathya A. Modesto, Cláudia B.R. Martinez *

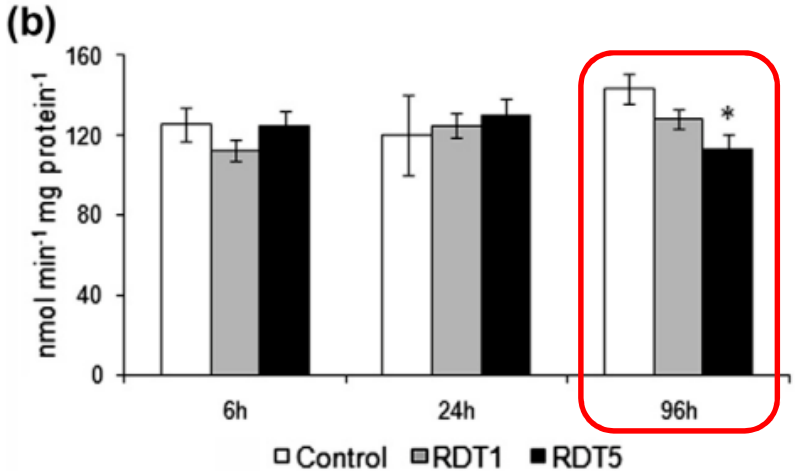
Roundup Transorb: a 1 e 5 mg L^{-1}

Δt: 6, 24 e 96 h

AChE no cérebro



AChE no músculo



Mutation Research 655 (2008) 41–46

Contents lists available at ScienceDirect

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

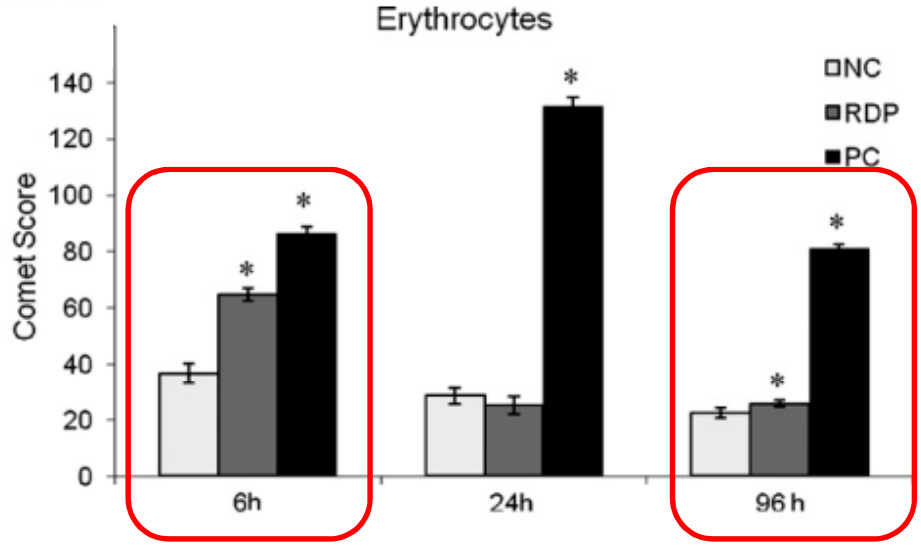
journal homepage: www.elsevier.com/locate/gentox

Community address: www.elsevier.com/locate/mutres

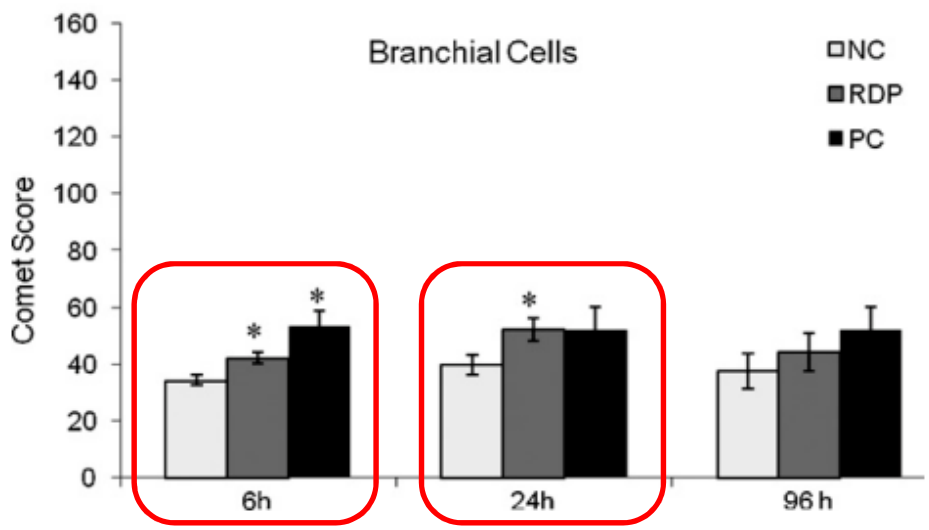
Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*

D.G.S.M. Cavalcante[a], C.B.R. Martinez[b], S.H. Sofia[a,*]

Exposição ao Roundup promoveu danos genotóxicos nas células de sangue e brânquia, mas não promoveu danos mutagênicos nos eritrócitos.



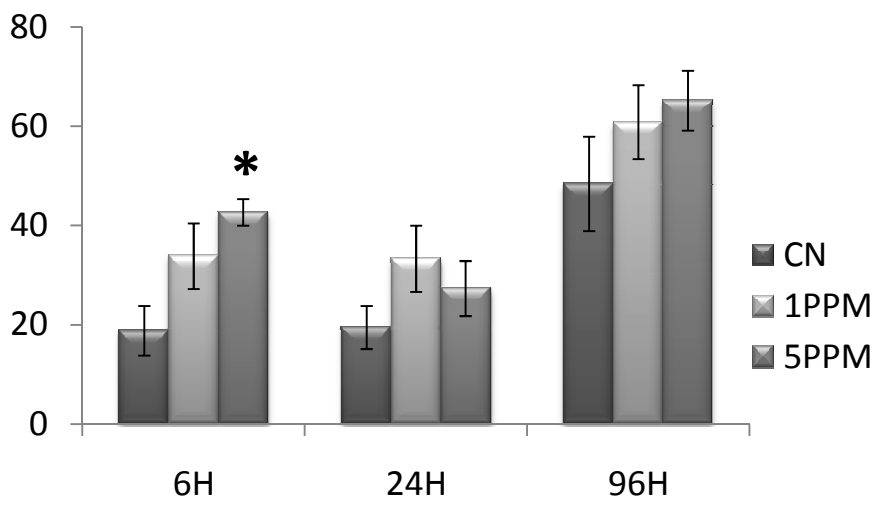
Time	Group	N	MN frequency (‰)	ENA frequen
6 h	NC	8	0	3.00 ± 0.34
	RDP	10	0	2.37 ± 0.16
	PC	7	0.05 ± 0.05	2.33 ± 0.38
24 h	NC	9	0.07 ± 0.05	2.11 ± 0.30
	RDP	12	0.05 ± 0.05	2.33 ± 0.46
	PC	8	0.71 ± 0.22*	2.33 ± 0.35
96 h	NC	9	0.18 ± 0.11	4.11 ± 0.38
	RDP	12	0.11 ± 0.08	3.67 ± 0.36
	PC	8	0.54 ± 0.09*	4.00 ± 0.30



Roundup → Glifosato + Surfactante

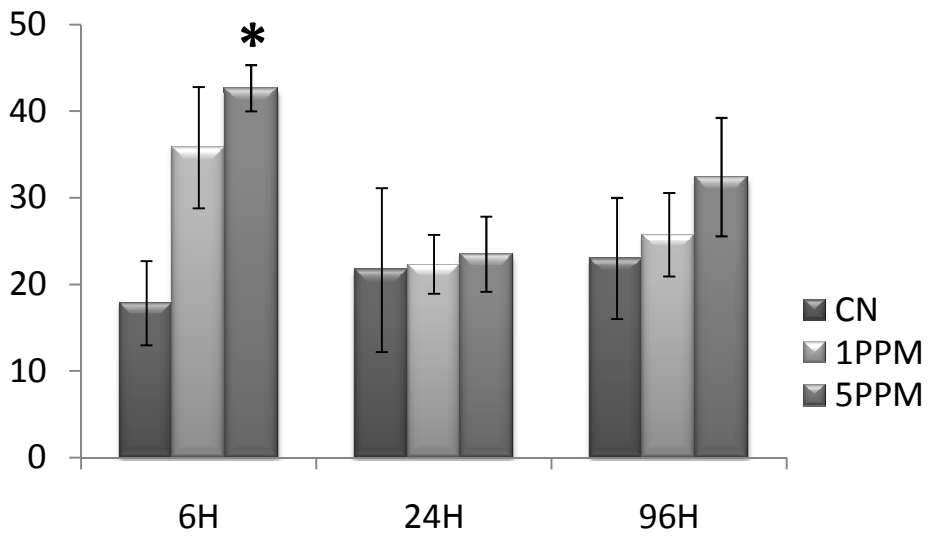
GLIFOSATO

Danos no DNA de células de sangue



GLIFOSATO

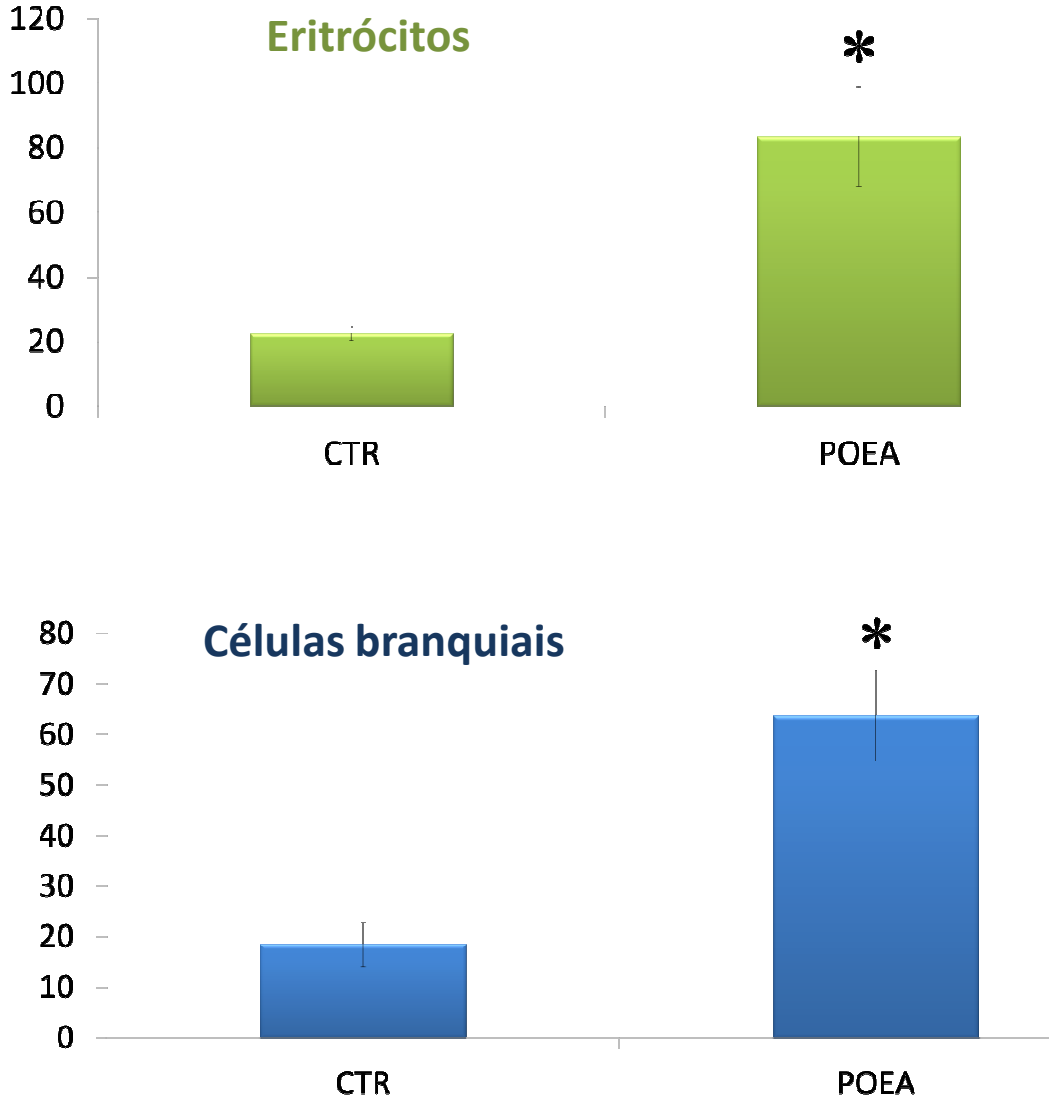
Danos no DNA de células branquiais



Roundup

Glifosato + Surfactante

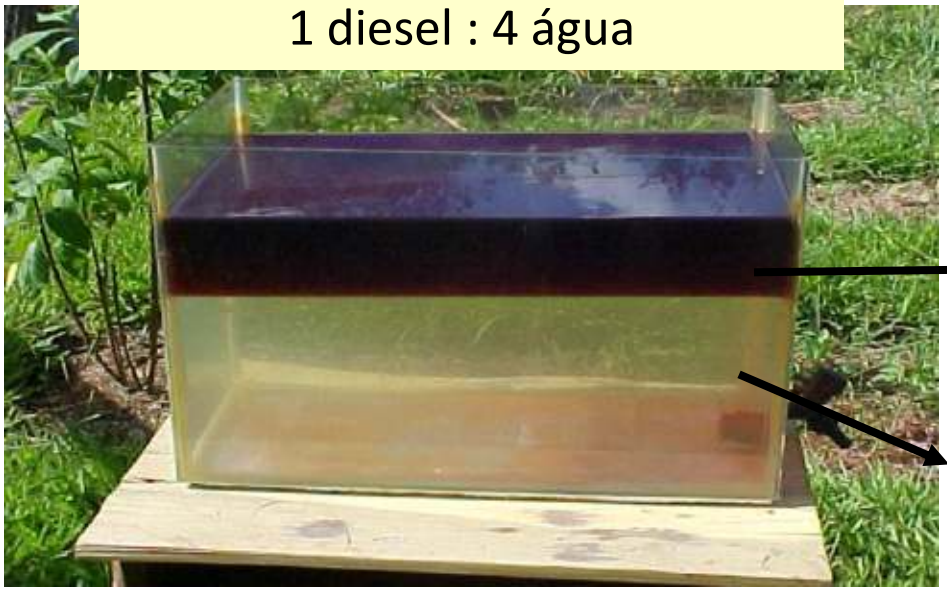
O polioxietilenoamino (POEA) é o surfactante usado na formulação de herbicidas a base de glifosato, como o Roundup Original.



Escores danos no DNA em eritrócitos e células branquiais de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou a 4 mg.L^{-1} de POEA, **durante 24 h**. As barras representam a média e a linha vertical o erro padrão. * diferente do CTR ($p < 0,01$).

Simulação do derrame de gasolina
1 gasolina : 4 água

Simulação do derrame de diesel
1 diesel : 4 água



Peixes expostos a uma simulação de derrame de diesel e gasolina em condições tropicais

Mistura

(gasolina + água)

(diesel + água)

6 h sob radiação solar direta

Processos fotoquímicos

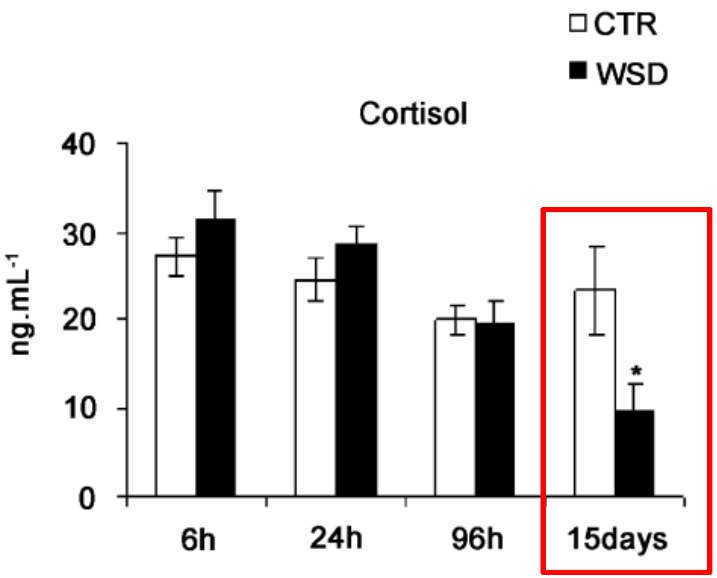
FSG → FSG foi diluída para 5%

FASE INSOLÚVEL

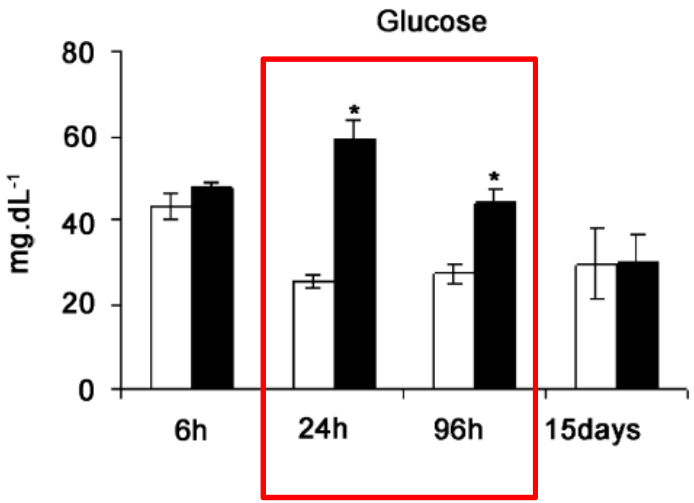
FSD → FSD foi diluída para 50%

TESTES DE TOXICIDADE
(6, 24, 96 h e 15 dias)

DIESEL



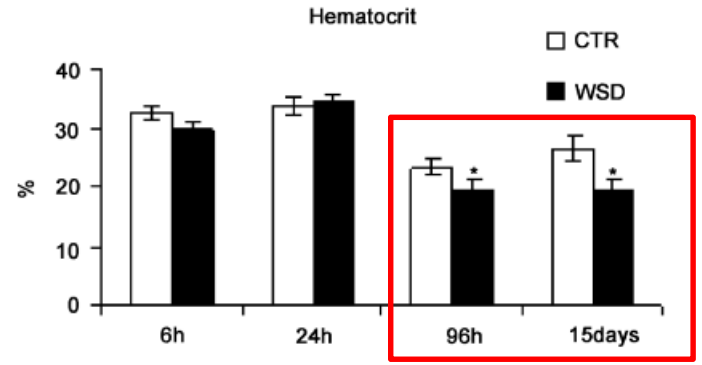
Redução no cortisol em peixes expostos à FSD por 15 dias: pode comprometer as respostas adaptativas ao estresse.



Aumento da glicemia: Resposta 2ária de estresse.

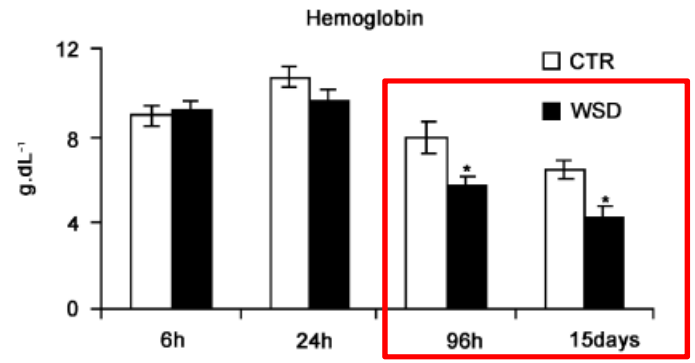
Simonato, Guedes and Martinez
Ecotoxicol Environ Saf 69 (2008) 112–120

DIESEL



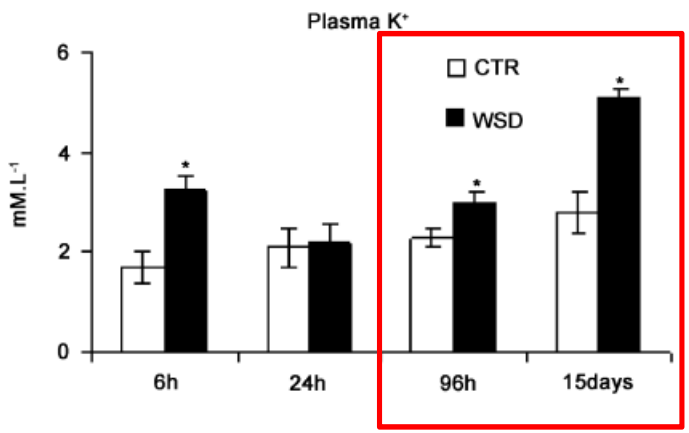
→ ↓ hematócrito

+



→ ↓ Hb

+



→ ↑ K^+

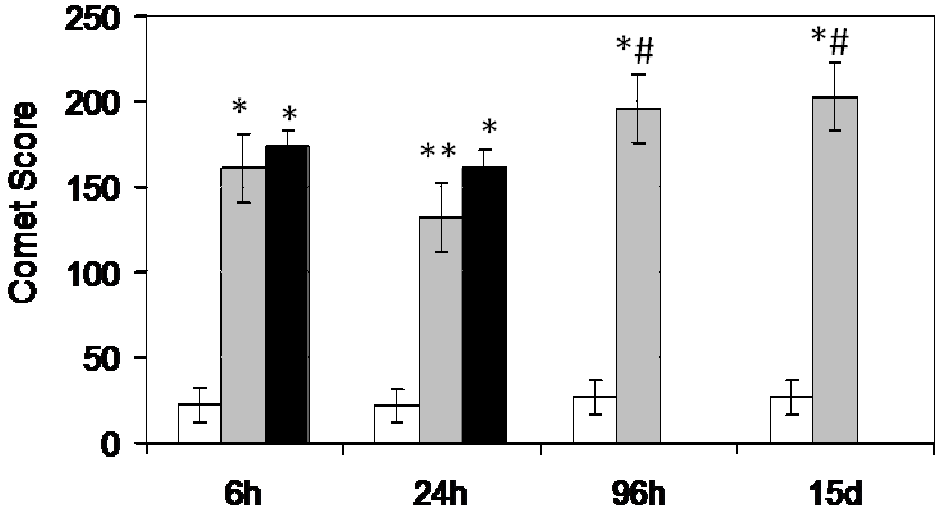
Exposição prolongada a FSD induz hemólise

↓

Dano oxidativo ?

Simonato, Guedes and Martinez
Ecotoxicol Environ Saf 69 (2008) 112–120

DIESEL



Period of exposure	Treatment	Frequency (‰) MICRONUCLEATED ERYTHROCYTES
6 hours	DWSF NC	3.25 ± 2.27* 0.87 ± 1.13
24 hours	DWSF NC	**16.64 ± 4.78*** 1.80 ± 0.77
96 hours	DWSF NC	**10.19 ± 2.95*** 1.17 ± 1.19
15 days	DWSF NC	6.00 ± 1.67* 1.86 ± 1.07

ESCORE DE COMETA

maior nos peixes expostos à FSD

FSD

Danos no DNA dos eritrócitos

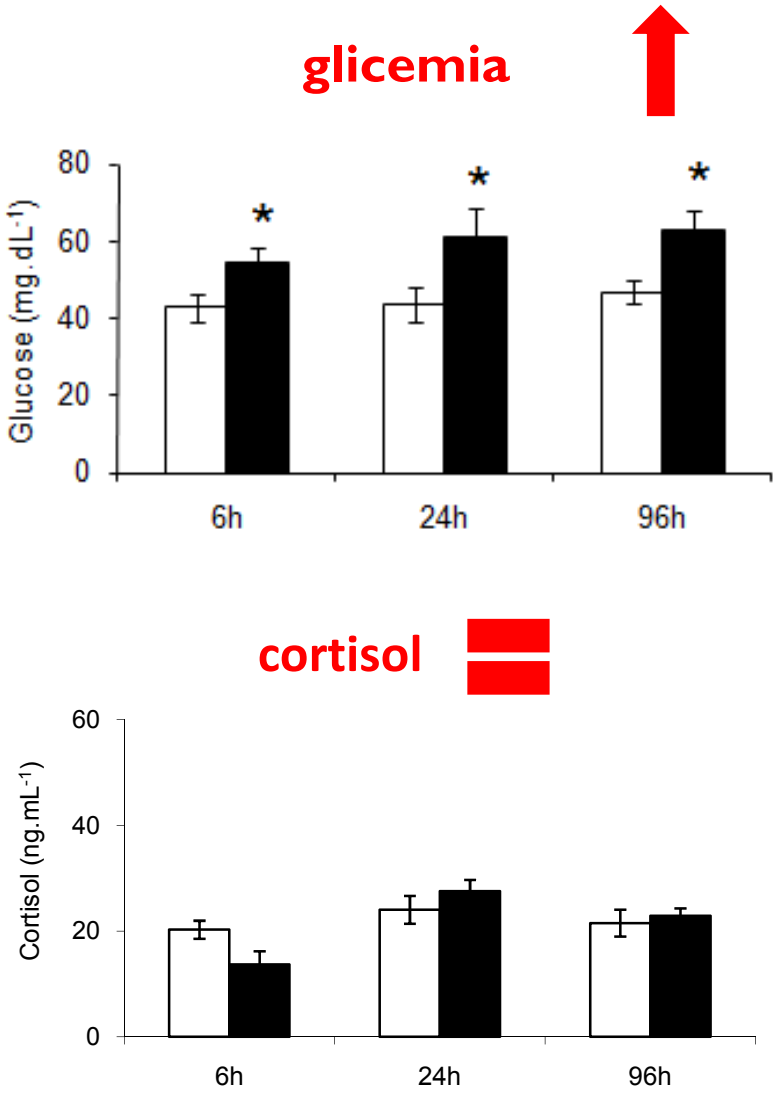
Indução de MN

FSD

Efeitos GENOTÓXICOS + MUTAGÊNICOS nas hemácias

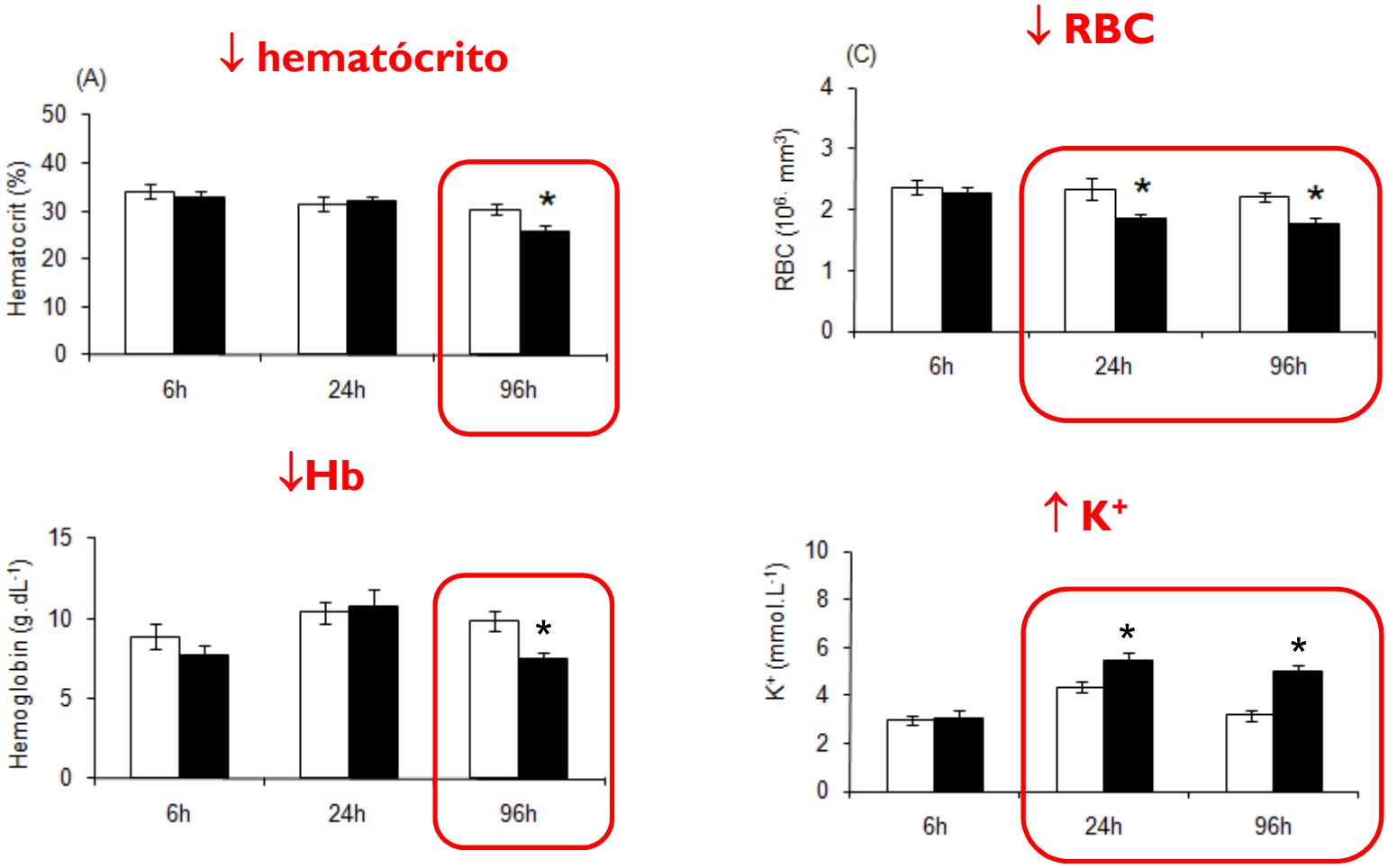
Vanzela, Martinez and Cólus
Mutat Res 631 (2007) 36–43

GASOLINA



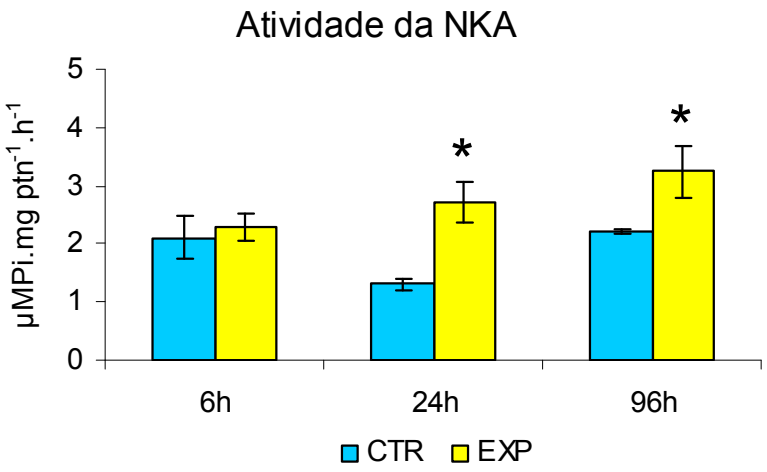
Aumento da glicemia sem aumento do cortisol.

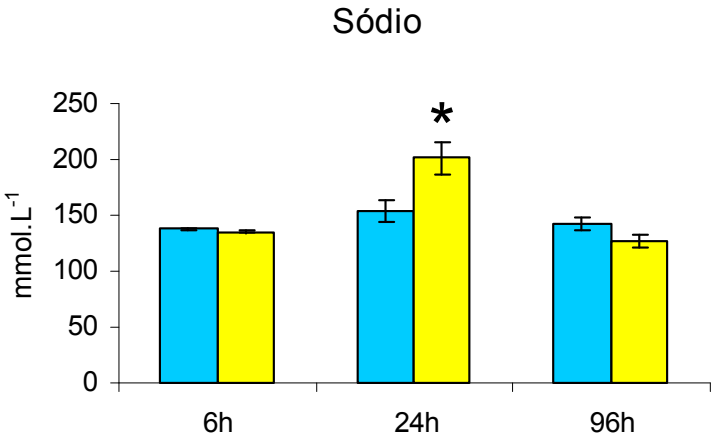
GASOLINA

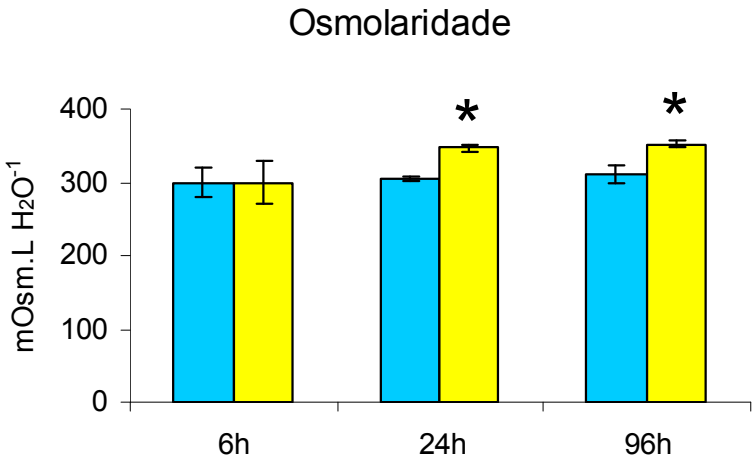


Exposição de 96h à FSG induz HEMÓLISE

GASOLINA

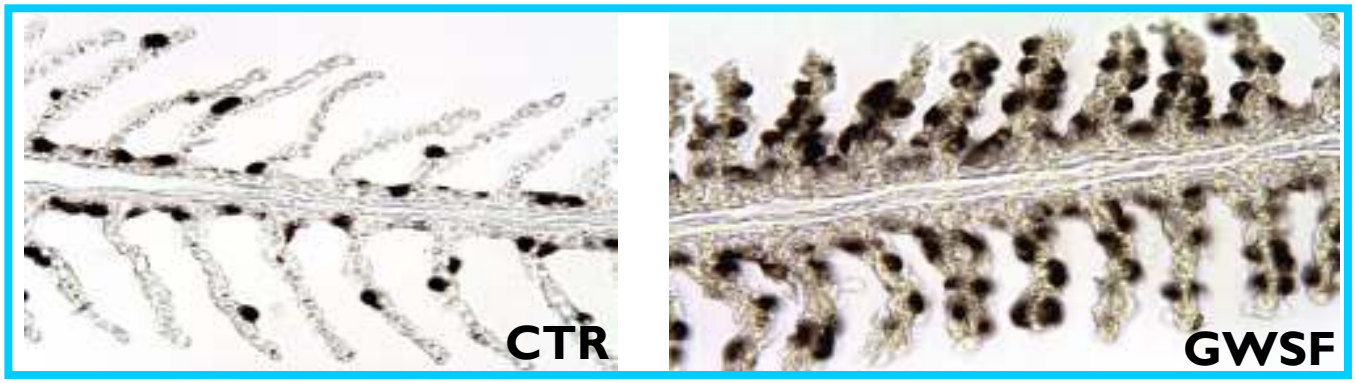




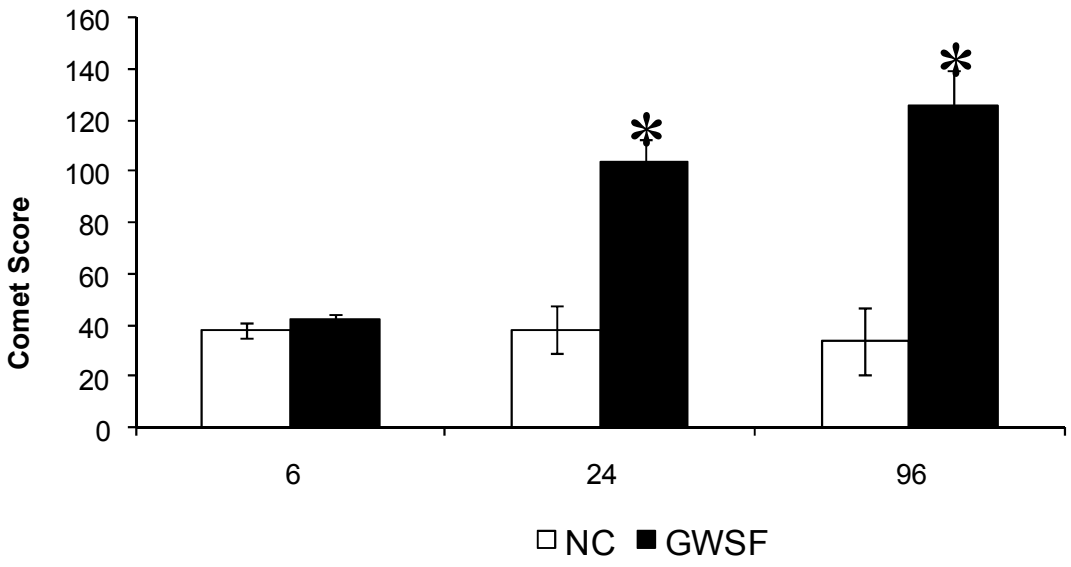


FSG → estimulação das vias de tomada de sódio (ativação da NKA).

FSG → diferenciação de células cloreto nas brânquias.



GASOLINA



FSG

Danos no DNA dos eritrócitos

FSG <u>não induziu</u> a ocorrência de MN nos eritrócitos

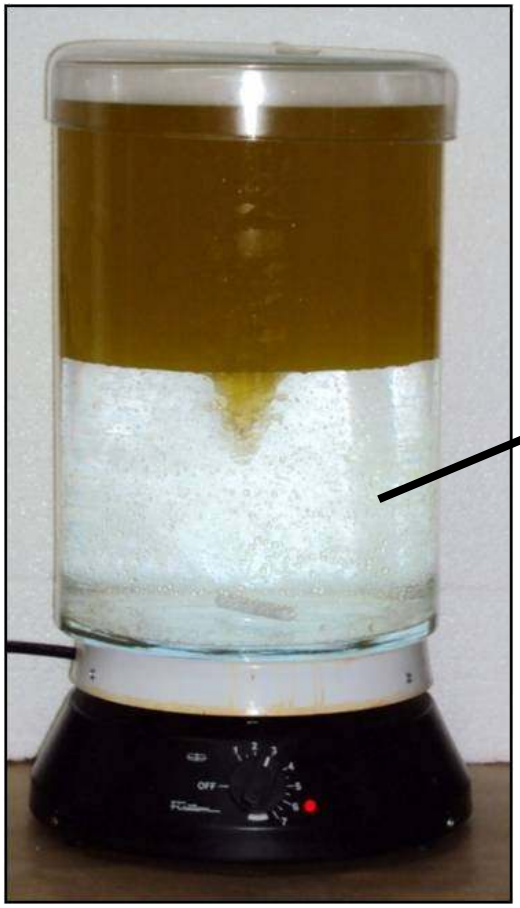
FSG: efeitos genotóxicos

BIODIESEL

BIODIESEL

Preparação da FSBd
1 biodiesel : 1 água
Agitação por 24 h

➢ Derivado do processo de transesterificação etílica dos ácidos graxos de cadeia longa do óleo de girassol



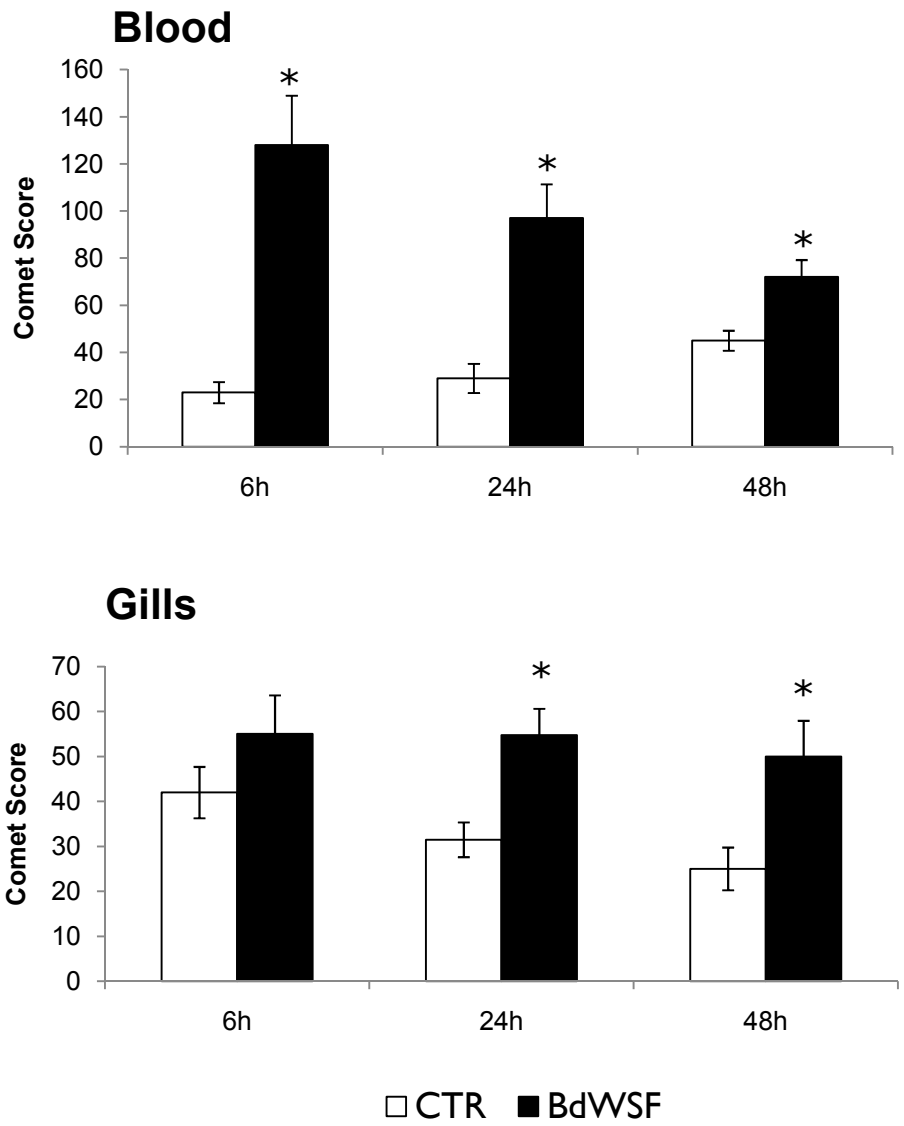
FSBd → FSBd diluída para 5%

↓

TESTES DE TOXICIDADE
(6, 24 e 48 h)

BIODIESEL

DNA DAMAGE: COMET TEST



BIODIESEL

Promove danos no DNA de eritrócitos e células branquiais

Classes de Contaminantes		Biomarcadores
Metais	Alumínio	↑ Hb, Hcto, RBC ↑ glicemia Inibe NKA: ↓ íons Promove danos genotóxicos
Pesticidas	Herbicidas a base de glifosato	↑ Hb, Hcto, RBC ↑ glicemia Sem alterações iônicas ↓ AChE Promovem danos genotóxicos
Combustíveis	Diesel Gasolina Biodiesel	↓ Hb, Hcto, RBC = hemólise ↑ glicemia; ↓ cortisol Estimula NKA: ↑ íons Promovem danos genotóxicos e o diesel mutagênicos

Apoio Financeiro

TECPAR
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ

CAPES

FAPESP
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

inct
institutos nacionais de ciência e tecnologia

INCT – Toxicologia Aquática

CNPq

Colaboradores

LEFA

Laboratório de Ecofisiologia Animal
UEL