

Juliana Moreira Mendonça Gomes

**Avaliação de marcadores de integridade celular,
genotoxicidade, reparo de DNA e hemocaterese em
tilápias expostas a cádmio**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Novembro/2016

Juliana Moreira Mendonça Gomes

**Avaliação de marcadores de integridade celular,
genotoxicidade, reparo de DNA e hemocaterese em
tilápias expostas a cádmio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Celular

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Novembro/2016

Este trabalho está sendo realizado nos seguintes laboratórios e instituição:

1. Laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e Reprodução Animal, vinculado ao Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
2. Laboratório das Interações Celulares, vinculado ao Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
3. Laboratório de Química Analítica, vinculado ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICEX), da Universidade Federal de Minas Gerais;
4. Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas, vinculado ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
5. Laboratório de Biologia Celular, vinculado ao Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
6. Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR – Fiocruz Minas). Unidade Regional da Fundação Oswaldo Cruz ligada ao Ministério da Saúde do Governo Federal.

Orientador: Dr. José Dias Corrêa Junior

Agência de fomento:

1. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico esta tese ao meu esposo Bruno, minha filha Alice, meus pais e familiares

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus caminhos;

Ao meu orientador Dr. José Dias Corrêa Junior, pelo incentivo à busca do conhecimento e aprimoramento profissional;

À colaboradora deste projeto, Dra. Walderez Ornelas Dutra e Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau e suas equipes de trabalho;

À professora Dra. Andréa Teixeira de Carvalho e equipe da Plataforma Citometria da Fiocruz;

Ao professor Dr. Rodrigo Ribeiro Resende e sua equipe de trabalho (em especial Anderson Kenedy Santos);

Ao professor Dr. Kleber Campos Miranda Filho e sua equipe de trabalho (em especial Márcio Silva);

Aos professores Dr. Antônio Carlos Santana Castro e Dr. José Carlos Nogueira;

A equipe do professor Dr. Luiz Renata França (em especial a Samira Nassif);

Aos colegas (alunos, funcionários e professores) do curso de pós-graduação em Biologia Celular;

Ao Bruno pelo apoio incondicional e a Alice pela alegria diária.

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros já foram” (Alexander Graham Bell)

RESUMO

Diversas condições ambientais são capazes de induzir diferentes danos aos organismos. Quando o dano ocorre no DNA são considerados genotóxicos e caracterizados por alterações nas expressões gênicas, no processo de replicação e no reparo cromossômico que levam à instabilidade gênica e eventualmente à morte celular. Neste trabalho utilizamos o cádmio como agente indutor de genotoxicidade em tilápias. Após a análise de eritrócitos, estabelecemos a relação temporal entre marcadores de viabilidade, reparo e danos celulares. Estudamos temporalmente a concentração de cádmio em diversos órgãos e tecidos das tilápias tais como baço, hepatopâncreas, brânquias, rim cranial, músculo e sangue, sendo o baço o órgão de maior retenção. Os trabalhos publicados e os dados adicionais contidos nesta tese indicam que o efeito genotóxico do cádmio está associado prioritariamente a sua concentração sistêmica. Os parâmetros de viabilidade e reparo celular participam de forma sequencial e distinta nas diferentes concentrações e tempos testados. Adicionalmente, processos hemocateréticos realizados principalmente por centros melanomacrofágicos do baço sugerem sua participação na remoção de eritrócitos portadores de alterações nucleares da circulação. Dentre as alterações nucleares eritrocíticas estudadas, as frequências de bolha nuclear, vacuolização e condensação nuclear são alteradas durante a exposição e núcleo lobado e broto nuclear no período de depuração. Em paralelo, propusemos a quantificação de alterações nucleares eritrocíticas utilizando a técnica de citometria de fluxo e estabelecemos um método analítico para determinação de cádmio em tecidos utilizando tilápias como modelo biológico.

Palavras-chave. Nrf2, H2AX, genotoxicidade, espécies reativas de oxigênio (ROS), danos celulares, hemocaterese e cádmio.

ABSTRACT

Several environmental conditions induce different damages to organisms. When damage occurs in the DNA, it is considering genotoxics and characterized by alterations in gene expressions, defects in chromosome replication and repair processes. These events could lead to genetic instability and cells death. In this study, we used cadmium as inducing agent of genotoxicity in tilapia. After the analysis of erythrocytes, we established the temporal relationship between viability markers, repair and cellular damage. The cadmium concentrations were analyzed in various organs and tissues of tilapia such as spleen, hepatopancreas, gills, head kidney, muscle and blood. The spleen presented the higher cadmium content after exposure. Published papers and additional data in this study indicate that the genotoxic effect of cadmium is associated primarily to its systemic concentration. The viability and cell repair parameters participate sequentially in different ways to different concentrations and times tested. Additionally, hemocateretic processes mainly performed by spleen melanomacrophage centers suggest their involvement in removal of nuclear alterations from blood stream. Among the erythrocyte nuclear alterations studied, the frequencies of blebbed, vacuolization and nuclear condensation were changed during exposure and lobed and bud in depurate period. In parallel, we proposed quantifying erythrocyte nuclear alterations using a flow cytometry technique and established an analytical method for the determination of cadmium in tissues using tilapia as a biological model.

Key words. Nrf2, H2AX, genotoxicity, reactive oxygen species (ROS), cellular damage and cadmium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral da consequência biológica de intoxicação por cádmio	16
Figura 2. Atividade de Nrf2 sobre condições normais e de estresse	18
Figura 3. H2AX e seu papel no reparo do DNA lesado	20
Figura 4. Alterações nucleares em eritrócitos de <i>O. niloticus</i>	22
Figura 5. Atividade de p53 diante de estressores celulares	25
Figura 6. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	27
Figura 7. Expressão do fator de transcrição Nrf2 em células sanguíneas de tilápias	64
Figura 8. Expressão do gene H2AX em células sanguíneas de tilápias	65
Figura 9. <i>Cell sorting</i> de células sanguíneas de tilápias	66
Figura 10. Gráficos de citometria de fluxo com aquisição de imagens em citômetro (Image Stream®)	67
Figura 11. Gráfico representativo da população eritrocítica marcadas por DRAQ-5 em citômetro (Image Stream®)	68
Figura 12. Gráfico de eritrócitos marcados por DRAQ-5 em posição frontal e aquisição de imagens de núcleo alterados com determinação de posição de algumas alterações nucleares	69
Figura 13. Gráficos de acúmulo de cádmio nos diferentes tecidos de tilápias	71

Figura 14. Esquema demonstrativo de diferentes marcadores de exposição ao cádmio _____ 73

Figura 15. Gráfico da dispersão de células sanguíneas de *O. niloticus* adquiridos em citômetro Image Stream® _____ 78

LISTA DE ABREVIATURAS

ANEs – alterações nucleares em eritrócitos

BL – bolha nuclear (*blebbed*)

BU – broto nuclear (*bud*)

FI – fissura nuclear (*notched*)

CO – condensação nuclear

LO – núcleo lobado (*lobed*)

MN – micronúcleo

VA – vacuolização nuclear

DSBs – danos em fita dupla de DNA

CMM – centros melanomacrofágicos

ROS – espécies reativas de oxigênio

PRE – porção rica em eritrócitos *ERP*

PI – iodeto de propídeo

DHE – diidroetídeo

FSC – *forward scatter* (dispersão frontal do laser), indica tamanho

SSC – *side scatter* (dispersão lateral do laser), indica granulosidade

Aspect Ratio – razão entre largura e altura da estrutura analisada

H2AX – histona da classe H2A

γ H2AX – histona da classe H2A fosforilada

Nrf2 – fator eritróide nuclear 2 relacionado ao fator 2

DDR – reparos de danos de DNA

ATM – ataxia telangiectasia mutada

MDC1 – proteína checkpoint 1

BRCA1 – gene *breast cancer 1*

ATR – ataxia telangiectasia relacionada com Rad 3

NER – reparo por excisão de nucleotídeos

BER – reparo por excisão de bases

NHEJ – união terminal não-homóloga (*non-homologous end-joining*)

HSP – proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*)

°C – graus Celsius

μ g – micrograma

μm – micrômetro

Cd – cádmio

$\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – cloreto de cádmio hidratado

Ct – grupo controle

Cd-0,2 – 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd

Cd-2 – 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd

Cd-0,025 – 0,025 mg L^{-1} de Cd

Cd-0,25 – 0,25 mg L^{-1} de Cd

Cd-2,5 – 2,5 mg L^{-1} de Cd

C – carbono

Ca – cálcio

Cl – cloro

Fe – ferro

K – potássio

P – fosfato

Na – sódio

O – oxigênio

S – enxofre

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1. Geral	15
2. ROS	15
3. Genotoxicidade	18
4. Alterações morfológicas nucleares	21
5. Citometria de Fluxo	23
6. Cádmio como indutor de instabilidade gênica	24
7. Peixes	26
OBJETIVOS	29
1. Objetivo geral	29
2. Objetivos específicos	29
ARTIGO 1	31
ARTIGO 2	55
RESULTADOS NÃO INCLUÍDOS NAS PUBLICAÇÕES	64
BLOCO 1 – PCR em tempo real	64
1. Expressão de indicador de estresse oxidativo (Nrf2) e indicador de reparo celular (H2AX) em células sanguíneas de tilápias expostas ao cádmio	59
BLOCO 2 – Citometria de fluxo nas análises das populações sanguíneas e alterações nucleares em eritrócitos	66
1. Separação (<i>Cell sorting</i>) e imageamento por citometria de fluxo e microscopia de luz	66
2. Localização da posição de eritrócitos e núcleos alterados em citômetro de fluxo (Image Stream®)	67

BLOCO 3 – Espectrometria de absorção atômica	70
1. Determinação por espectrometria de absorção atômica da concentração de cádmio nos órgãos e tecidos (baço, brânquia, hepatopâncreas, músculo, rim cranial e sangue) de tilápias expostas	70
DISCUSSÃO	72
Menor concentração (Cd-0,25)	73
Maior concentração (Cd-2,5)	75
Comportamento das ANEs durante a exposição e depuração	76
Citometria de Fluxo nas análises de núcleos eritrocíticos alterados	77
Validação da dosagem e acúmulo de cádmio em diferentes órgãos e tecidos	79
CONCLUSÕES	82
PERSPECTIVAS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO 1: Artigo submetido	104
ANEXO 2: Protocolo CEUA	105

INTRODUÇÃO

1. Geral

O aporte crescente de xenobióticos (compostos estranhos aos organismos) no meio ambiente tem sido relacionado principalmente ao crescimento populacional e ao avanço tecnológico, resultando na liberação de numerosos agentes tóxicos. Esses geralmente são produzidos por atividades industriais, agrícolas e domésticas (Cajaraville et al., 2000).

Esta contaminação ambiental vem contribuindo para a redução da qualidade dos diversos compartimentos (água, sedimento, ar, solo), bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que neles habitam. Os efeitos da liberação inadequada de tóxicos no ambiente podem ser detectados em níveis macroscópicos (população, indivíduos) e microscópicos (tecidos, células e moléculas) (Cajaraville et al., 2000).

Dentre os poluentes mais prejudiciais ao ecossistema estão os metais pesados, as radiações e os compostos orgânicos, tais como pesticidas e drogas (ATSDR, 2008). Metais pesados como o cádmio são frequentemente relacionados ao aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), descritas como principais indutores de danos em ácidos nucleicos (Pachecco e Santos, 1998; Ayylon e Garcia-Vazquez, 2000; Bertin e Averbeck, 2006).

2. ROS

Vários estudos sugerem que o DNA é afetado através do estresse oxidativo e de seus efeitos indiretos em organismos expostos ao cádmio. Esses efeitos podem ser caracterizados pela diminuição de antioxidantes intracelulares, diminuição da atividade de enzimas relacionadas ao reparo de DNA, oxidação de proteínas, peroxidação de lipídeos e interrupção de duplicação cromossômica, com eventual impedimento do ciclo celular (Figura 1) (Uchida et al., 2004; Bertin e Averbeck, 2006; Joseph, 2009, Le et al., 2013, Sayed et al., 2014).

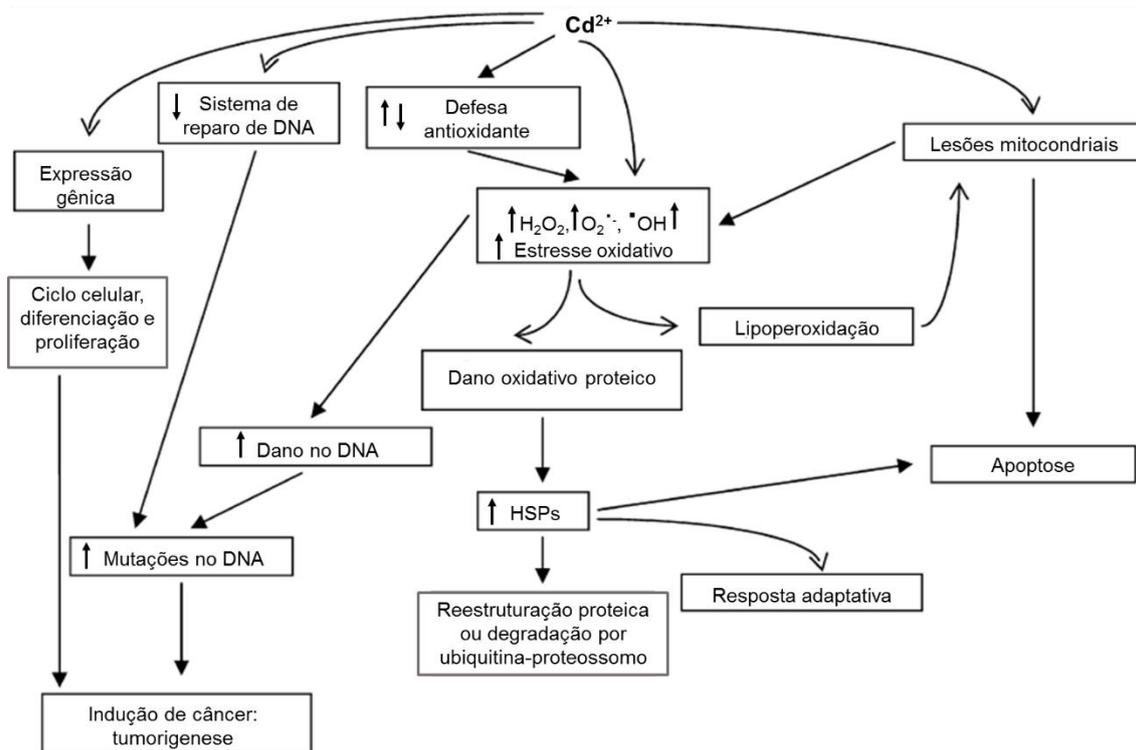


Figura 1. Esquema geral da consequência biológica da intoxicação de cádmio nas células. O cádmio interfere em vários mecanismos importantes, tais como expressão gênica, ciclo celular, diferenciação e proliferação. A indução de estresse oxidativo pelo cádmio afeta o DNA, as proteínas e os lipídeos. Danos oxidativos estão associados a disfunção mitocondrial, desequilíbrio de defesas antioxidantes e apoptose. O estresse oxidativo sobre as proteínas induz a ativação de HSPs (*heat shock proteins* – proteínas de choque térmico) associada a resposta adaptativa, reestruturação proteica ou degradação via ubiquitina-proteossomo. O dano oxidativo ao DNA leva a mutações e câncer. A inibição de algumas vias de reparo do DNA contribui para o aumento de mutações e câncer (Bertin e Averbek, 2006).

As membranas biológicas em particular, também são extremamente sensíveis à oxidação, que causa danos aumentando potencialmente a permeabilidade e reduzindo a sua fluidez (Slater, 1982; Sakai et al., 1989; Ito et al., 1999; Mai et al., 2010). Esses efeitos são recorrentes e encontrados em diversos modelos biológicos também induzidos por concentrações-traço de cádmio, onde o aumento de peroxidação lipídica em plasma, células hepáticas, musculares esqueléticas, renais e branquiais tem sido descrito (Karmakar et al., 1999; Jurczuk et al., 2004; Yano e Marcondes, 2005).

De acordo com a literatura, o equilíbrio do complexo proteico envolvendo as proteínas Keap1 e Nrf2 formam um sistema-chave de defesa celular contra estresse oxidativo. Nrf2 é um fator de transcrição que ativa um conjunto de importantes genes citoprotetores, como da glutathione transferases (GST), subunidades de glutamato-cisteína ligase (Gclc e Gclm), heme oxigenase 1 (Hmox1) e peroxiredoxina 1 (Prdx1) (Wang e Gallagher, 2013) que regulam uma série de enzimas sequestradores de ROS, tais como catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e tioredoxina (Kwak et al., 2001; Pietsch et al., 2003; Ishii et al., 2004).

A Keap1 regula a atividade de Nrf2 em resposta a estresse eventualmente causado por agentes xenobióticos. Em condições celulares normais, Keap1 degrada constitutivamente Nrf2 através da via proteassomal. Quando as células são expostas a estressores tais como ROS, a degradação de Nrf2 é parada e consequentemente Nrf2 é acumulada no núcleo o que induz a expressão de genes-alvo através da formação de um heterodímero com sMaf (small Maf). Além da degradação pela via Keap1, GSK-3 (glicogênio sintase-quinase-3) e β -TrCP (proteína contendo β -transducina) também estão envolvidos na inibição de acúmulo de Nrf2. O heterodímero Nrf2-sMaf unem a sequências referentes a ARE (elementos de respostas a antioxidantes) e induz a expressão de genes antioxidantes que exercem função de proteção celular (Figura 2) (McMahon et al., 2003; Katsuoka et al., 2005; Chowdhry et al., 2013). Este mecanismo está associado à redução de danos genotóxicos dependentes de ROS (Waisberg et al., 2003).

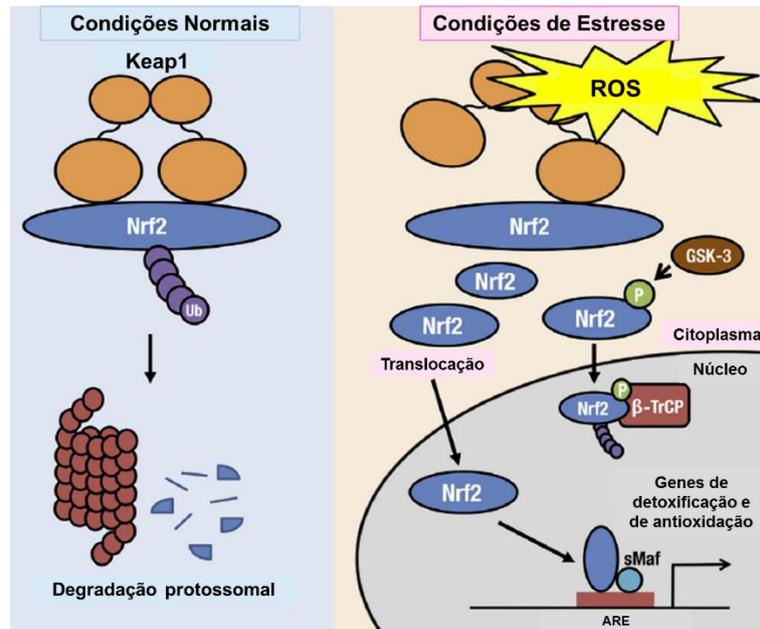


Figura 2. Esquema da via Keap1-Nrf2. Sob condições normais (à esquerda), Nrf2 é capturado por Keap1 e constantemente degradado através da ubiquitinação (Ub) no citosol. Quando as células são expostas a ROS (direita), Keap1 é dissociado de Nrf2 que transloca-se para o núcleo e forma um heterodímero com sMaf para ativar genes de desintoxicação e antioxidantes. GSK-3 catalisa a fosforilação de Nrf2 levando ao recrutamento de β -TrCP para posterior degradação de Nrf2 (adaptado de Suzuki et al., 2016).

3. Genotoxicidade

A genotoxicidade se refere à alteração na estrutura geral, na disposição dos cromossomos (clastogenicidade) ou nas sequências de pares de bases do DNA (mutagenicidade) (Al-Sabti e Metcalfe, 1995). Danos no DNA podem ser induzidos por exposição a agentes tóxicos como radiação UV, tabaco e por oxidantes exógenos e endógenos (Darzynkiewicz et al., 1992).

Em cada fita simples de DNA podem ser geradas a cada 24 horas aproximadamente 5000 lesões, sendo que dessas, 99% sofrem reparo e 1% (50 lesões) geram DSB (Double Strand Breaking – Quebra em Fita Dupla). De fato, essas lesões em fita dupla são críticas e podem resultar em morte celular ou instabilidade gênica comprometendo a regulação de ciclo celular que participam na indução de efeitos carcinogênicos e epigenéticos (Darzynkiewicz et al., 1992; Joseph, 2009; Filipič, 2011; Xu et al., 2011).

Os eventos envolvidos na resposta das células ao dano no DNA estão relacionados a um grande número de modificações pós-translacionais de proteínas que podem provocar interações entre as moléculas intracelulares, ativando vias de sinalização diversas. A ativação da via de sinalização de reparo apresenta quatro pontos críticos: o primeiro corresponde a interrupção da progressão do ciclo celular impedindo assim a transferência de DNA danificado para células descendentes, o segundo ponto se refere à melhoria da acessibilidade ao sítio danificado pela maquinaria de reparação do DNA, o terceiro está relacionado à ativação da maquinaria de reparo e o quarto ponto crítico se refere ao desencadeamento da apoptose ou indução da senescência de células cujo DNA danificado não pode ser reparado com sucesso (Bakkenist e Kastan, 2003, 2004; Helt et al., 2005).

A histona H2AX desempenha um papel crítico no recrutamento de fatores de reparo do DNA: atrai o mediador de danos proteína *checkpoint 1* (MDC1), que também é fosforilada pela proteína *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM). MDC1 por sua vez, serve como suporte para o recrutamento de outras proteínas necessárias para a ativação do gene *breast cancer 1* (BRCA1) pelo ATM, promovendo a parada do ciclo celular e a reparação do DNA. ATM fosforila outros substratos-alvo, como a proteína *checkpoint* Chk2 e p53, que também são responsáveis pela interrupção do ciclo celular ou apoptose se o dano não pode ser reparado (Figura 3) (Paull et al., 2000; Giunta e Belotserkovskaya, 2010; Nakamura et al., 2010).

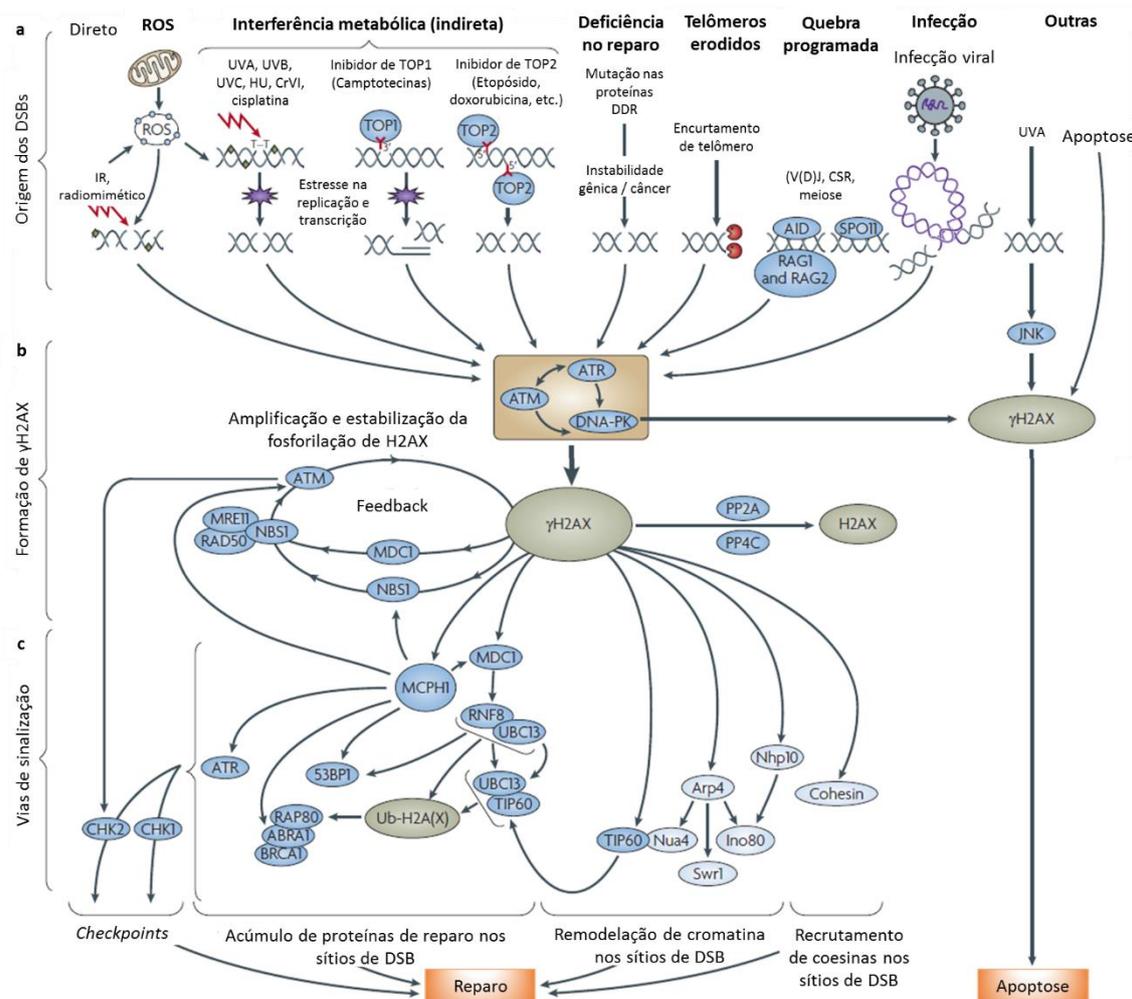


Figura 3. H2AX é um componente central de inúmeras vias de sinalização em resposta a DSBs (danos em fitas duplas de DNA). **a.** Existem várias categorias de origens de DSB. Direto: a fosforilação do H2AX ocorre após o tratamento com agentes que incluem radiação ionizante (IR), drogas radiomimética ou ROS. Indiretos: drogas, produtos químicos e as modificações do DNA induzem estresse na replicação e na transcrição levando a DSBs. Reparo deficiente: as mutações nas proteínas de reparo de danos de DNA (DDR) resultam em instabilidade gênica, levando à DSBs. Telômeros erodidos: telômeros criticamente curtos que mostram pontas de fita dupla. Programado: fosforilação de H2AX ocorre na recombinação V(D)J, CSR (recombinação por interruptor de classe) e meiose. Infecção: a integração retroviral induz DSBs. **b.** Ataxia telangiectasia mutated (ATM), ataxia telangiectasia relacionada com Rad3 (ATR) e proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK), respondem a DSBs, resultando na fosforilação inicial de H2AX. Uma amplificação de sinal envolvendo H2AX, NBS1 e a proteína mediadora de dano no DNA (MDC1) estimula ATM e aumenta a fosforilação de H2AX. As proteínas fosfatases PP2A e PP4C ligam-se e desfosforilam γ H2AX. **c.** Vias de sinalização: NBS1 e MDC1 ligam-se a γ H2AX, o que permite que o acúmulo de

proteínas DDR incluindo o complexo MRN (MRE11-RAD50-NBS1), RNF8, BRCA1 e proteína de ligação a p53 (53BP1). RNF8 catalisa a ubiquitilação de H2AX, que recruta RAP80 e BRCA1 para DSBs através de ABRA1. O acúmulo nos sítios de DSBs de MCPH1 também depende de γ H2AX. A MCPH1 está envolvida na condensação da cromatina e na parada do ciclo celular, interagindo com BRCA1, NBS1, CHK1, 53BP1, MDC1, ATR, RPA (proteína de replicação) e ATM. O complexo de remodelação da cromatina participam do reparo no DNA. O complexo de histona acetiltransferase TIP60 humana (em levedura, Nua4) e os complexos Ino80 e Swr1 de levedura interagem com H2AX ou γ H2AX. Os DSBs facilitam a associação entre TIP60 e UBC13, regulando a acetilação de H2AX que é necessária para a ubiquitilação (Ub) de H2AX e sua liberação da cromatina. γ H2AX é crucial para a recombinação homóloga das cromátides irmãs. As proteínas humanas são representadas em azul escuro, proteínas de levedura em azul claro. AID, citidina desaminase induzida por ativação; CrVI, cromo hexavalente; HU, hidroxureia; RAG, V(D)J, proteínas ativadas por recombinação-ativação; ROS, espécies reativas de oxigênio; TOP, topoisomerase (adaptado de Bonner et al., 2008).

A deficiência na expressão ou alterações mutagênicas nesta histona têm sido relacionadas a ocorrência de instabilidade gênica (Bassing et al., 2002; 2003). De fato, alguns tipos de cânceres tais como leucemia mielóide aguda e leucemia linfóide aguda foram associados a mutações ou deleções na região cromossômica correspondente ao gene H2AX (Thirman et al., 1993).

Algumas vias de sinalização de reparo gênico comprometidas por agentes genotóxicos têm sido associadas à ocorrência de alterações morfológicas nucleares tais como micronúcleo e bolha nuclear (blebs) como observado em linhagens de MCF-7, PC3 e LLC pela a fosforilação da histona H2AX no seu resíduo C-terminal Ser139 pela ATM (Utani et al., 2011; Xu et al., 2011).

4. Alterações morfológicas nucleares

A maioria das pesquisas abordando a origem de alterações nucleares tem sido dedicada à morfologia da lesão nuclear denominada de micronúcleo (Osman et al., 2010, Harabawy e Mosleh, 2014). Mas outras alterações nucleares também têm sido observadas, sugerindo que estas também devem ser consideradas como consequência de falha na divisão celular, processos de

morte, genotoxicidade ou mutagênese (Schroeder, 1970; Tolbert et al., 1991; Fenech et al., 1999). Estas são descritas frequentemente como bolha nuclear ou *blebbed*, broto nuclear ou *bud*, condensação nuclear, fissura nuclear ou *notched*, núcleo lobado ou *lobed*, micronúcleo e vacuolização (Carrasco et al., 1990; Grisolia et al., 2009) (Figura 4). Dados da literatura também sugerem a possível relação entre suas frequências, o tipo de agente genotóxico, a dose e o tempo de exposição, mas um comportamento mais específico frente aos percentuais gerados são encontrados apenas em trabalhos recentes (Gomes et al., 2015, Gusso-Choueri et al., 2016; Sadiqul et al., 2016).

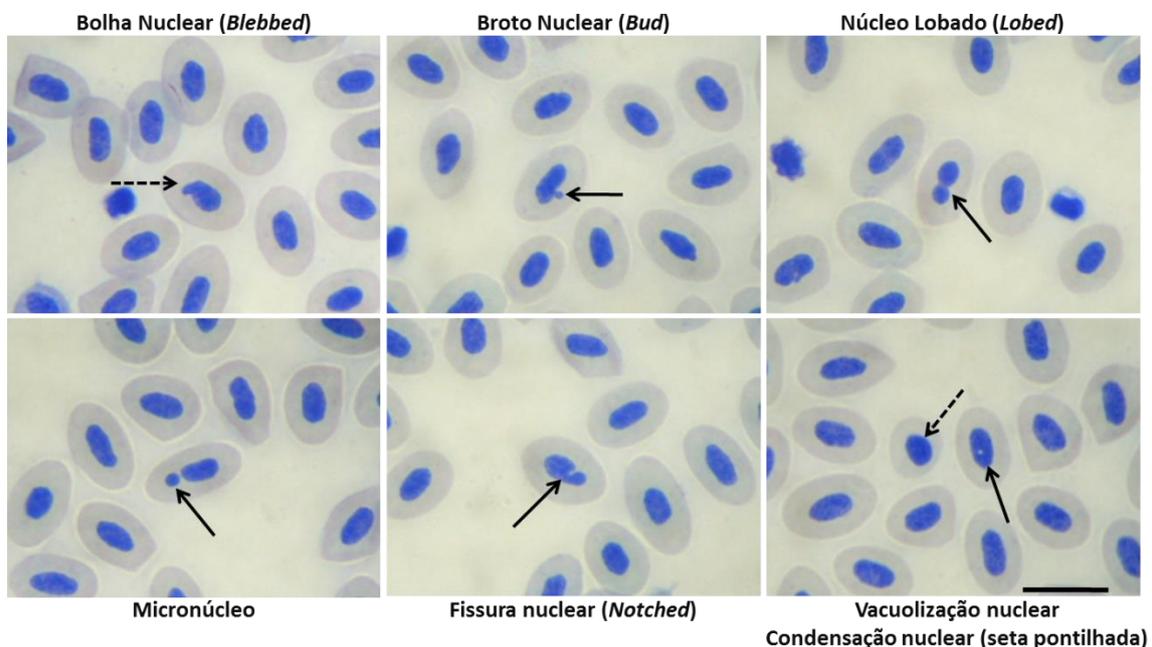


Figura 4. Alterações nucleares em eritrócitos de *O. niloticus* corado por by May-Grünwald. Barra=10 μ m. (Gomes et al., 2015).

A relação entre instabilidade gênica e o surgimento de alterações nucleares tem sido sugerida por diversos trabalhos na literatura, utilizando-se desde cultura de células até avaliações de espécimes aquáticos oriundos de ambientes contaminados (Souza e Fontanetti, 2006; Rocha et al., 2009; Barbosa et al., 2010; Summak et al., 2010; Sayed et al., 2016). Ainda assim a utilização da técnica morfológica de citometria de fluxo ainda não figura nos trabalhos referentes à quantificação de ANEs (alterações nucleares em eritrócitos).

5. Citometria de Fluxo

Recentemente a utilização de técnicas morfológicas com maior capacidade analítica focada em estudos nucleares tem aumentado (Anbumani e Mohankumar, 2015; Nowicka et al., 2016). Ainda que os procedimentos histológicos envolvidos na caracterização de alterações nucleares sejam bastante eficientes e reprodutíveis, até o momento poucos são correlatos aos efeitos genotóxicos sob condições *in vitro* e *in vivo* (Bishop et al., 2016; Mathew et al., 2016).

A citometria de fluxo é um método sensível de análise que permite uma rápida avaliação multiparamétrica de características em grande número de células em pequeno intervalo de tempo (usualmente centenas a milhares de células por segundo). A sua utilização na avaliação de efeitos genotóxicos tem sido realizada com a utilização de fluorocromos específicos tais como Draq-5, Hoechst e Iodeto de Propídeo. Estes são intercalantes às bases nitrogenadas de DNA e permitem avaliações quantitativas de apoptose, imunofenotipagem, atividade metabólica e viabilidade celular e permeabilidade de membrana (Darzynkiewicz et al., 1992; Vermes et al., 1995; Bunthof et al., 1999; Klimowicz-Bodys, 2011; Anbumani e Mohankumar, 2015). Esta técnica tem sido utilizada em inúmeras abordagens em diferentes tipos celulares de diferentes organismos aquáticos, geralmente utilizando marcadores fluorescentes (Sandsrom et al., 2000, Klimowicz-Bodys et al., 2011).

Outras abordagens têm sido conduzidas utilizando citômetro capaz de adquirir imagens (Image Stream®) tais como determinação da intensidade de conteúdo de DNA, centrômeros monocêntricos e dicêntricos, análise de patógenos intracelulares e inflamação aguda (Saha et al., 2003; Delaporte et al., 2008; Xi et al., 2011; Klimowicz-Bodys, 2011; Anbumani e Mohankumar, 2015; Bayona et al., 2016; Beaton-Green et al., 2016; Haridas et al., 2016). Entretanto, ainda não foi estabelecido pela literatura científica um protocolo que permita uma rotina rápida e eficiente de quantificação de eventos genotóxicos principalmente associados a características morfológicas nucleares.

6. Cádmio como indutor de instabilidade gênica

O cádmio (Cd) é o elemento químico de número atômico 48 e de massa atômica igual a 112,4u (unidade de massa atômica). Está situado no grupo 12 (2 B) da classificação periódica dos elementos. O cádmio ocorre naturalmente na crosta terrestre geralmente associado a zinco, chumbo, cobre e minérios e também nas águas dos oceanos à concentrações menores que 5 e 110 ng/L. Nas águas costeiras, níveis mais altos de cádmio foram relatados. A concentração de cádmio das águas superficiais naturais e das águas subterrâneas é geralmente <1µg/L. Este metal é bastante utilizado na produção de baterias (83%), pigmentos (8%), revestimentos (7%), estabilizadores para plásticos (1,2%) e ligas não ferrosas e outros usos (0,8%) (ATSDR, 2008).

Encontra-se como um dos elementos-traço mais estudados em toxicologia na atualidade, devido ao aumento significativo da sua concentração no ambiente, resultante do acúmulo de resíduos industriais e domésticos. (Wright e Welbourn, 1994; Goering et al., 1995; Bertin e Averbeck, 2006; Mahrous et al., 2015). Apresenta caráter persistente (não sofre degradação química ou física), sendo bioacumulado e biomagnificado, o que lhe confere um importante significado nas relações ecológicas e humanas (Jensen e Bro-Rasiriussen, 1992; Alazemi et al., 1996). É caracterizado como um poluente particularmente perigoso devido a sua alta toxicidade e grande solubilidade em água (Celik et al., 2007).

Estudos em células renais de camundongos, células reprodutivas de hamster e eritrócitos de peixes demonstraram que estas células quando expostas ao cádmio apresentam danos no DNA. As células respondem a estes danos, parando o ciclo celular para facilitar a reparo do DNA ou sinalizando para morte por apoptose a fim de eliminar células danificadas (Figura 5) (Rani e Pang, 2008). O mecanismo descrito para esta interrupção envolve a proteína supressora de tumor p53 que atua no ciclo celular pela inibição de quinases dependentes de ciclinas (Cdks). Com isso, são ativados os sistemas de reparo, no qual o dano será revertido ou fixado por enzimas específicas, ou se iniciará apoptose (Figura 5) (Yang et al., 2004; Xie e Shaikh, 2006; Sayed et al., 2014).

A ativação (fosforilação) de p53 ocorre também em resposta a fatores de stress incluindo danos no DNA tais como radiação UV, ROS, hipóxia e mutações

(Zakaria et al., 2009). Em resposta a danos no DNA, p53 é extensivamente fosforilada em vários resíduos de aminoácido incluindo Ser-15, Ser-20, and Ser-46 (Hong et al., 2006).

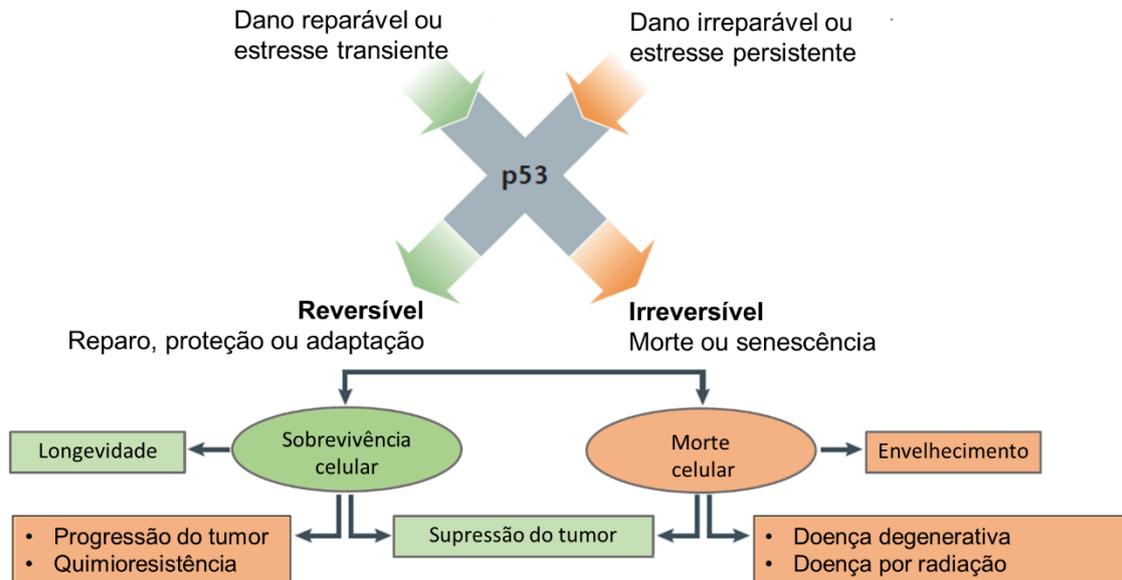


Figura 5. Funções de p53 para integrar os sinais a partir de diferentes estressores celulares e promove a adequada resposta biológica, que pode levar a sobrevivência ou a morte da célula. No caso de danos reparáveis ou estresse transiente, um processo reversível é ativado e os danos são reparados ou fixados. Quando o estímulo é persistente e irreparável, a célula afetada é permanentemente removida através da morte celular ou senescência. Embora ambas respostas podem promover a supressão do tumor, a sobrevivência desregulada pode contribuir para a progressão do tumor e quimioresistência. E a morte celular inapropriada pode levar ao surgimento de outras doenças como as neurodegenerativas ou doenças causadas por radiação (adaptado de Kruiswijk et al., 2015).

Entretanto, o cádmio parece interferir na conformação de p53, resultando na inibição de sua função (Meplan et al., 1999). Recentemente foi demonstrado que o acúmulo de p53 na forma fosforilada é resultante da inibição das proteínas expressas pela família de ubiquitinação do gene Ube2d (Lee et al 2016). Ainda que diferentes tipos celulares derivados de rim, fígado, células endoteliais de vasos e astrócitos possam responder de forma específica a esta inibição (Lee et al., 2016), excesso de p53 fosforilada pode permitir que a célula entre em mitose ou inicie a replicação do DNA, causando instabilidade gênica (Bork et al., 2010).

Estes estudos sugerem que reações similares podem ocorrer em diversos tipos celulares incluindo células sanguíneas nucleadas como as dos peixes.

7. Peixes

Descargas industriais e domésticas encontram como destinos finais rios, lagos e estuários, que quando contaminados influenciam diretamente organismos de relevância ecológica tais como os peixes. Estes tem sido frequentemente utilizados por apresentarem respostas similares a de grandes vertebrados, permitindo sua utilização em estudos de agentes tóxicos com potenciais carcinogênico e teratogênico para seres humanos bem como na avaliação do nível de toxicidade do ambiente aquático (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Ateeq et al., 2002; Jorgensen, 2011; Howe et al., 2013; MacRae e Peterson, 2015). Este monitoramento é caracterizado por diminuir custos, sendo aplicada em algumas situações a utilização dos peixes como organismos-sentinela que minimizam a susceptibilidade de humanos a exposição a genotóxicos químicos por suspensão de seu consumo ou exposição ambiental (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Schalie et al., 1999).

Oreochromis niloticus, popularmente conhecida por tilápia do Nilo (Figura 6), foi a espécie utilizada nesse estudo. A tilápia é natural da África e foi introduzida no Brasil em 1971 (Castagnolli, 1992). É uma espécie importante em bioensaios laboratoriais, pois apresenta alta prolificidade, resistência a muitas doenças (Bentsen et al., 1998), crescimento rápido e rusticidade (Hayashi et al., 1999). Adapta-se facilmente a ambientes lênticos e tolera grandes variações de temperatura (18 a 35°C), baixo nível de oxigênio dissolvido (1,2 mg L⁻¹) (Lim e Webster, 2006) e alta concentração de amônia na água (1 mg L⁻¹) (Fontainhas-Fernandes, 1998; Lim e Webster, 2006). Além disso, é comercialmente muito importante em todo mundo, e embora seja uma espécie de água doce, também pode ser encontrada em água salobra e estuários do todo mundo (Vijayan et al., 1996).



Figura 6: Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). (<http://www.nwtilapia.com>)

As células sanguíneas de peixes, similar ao observado em mamíferos, refletem o estado geral de saúde dos indivíduos. Além disso, estudos genotóxicos têm dado especial atenção à utilização de sangue de peixes, já que suas células vermelhas são nucleadas assim como de outros vertebrados com exceção dos mamíferos (Castaño et al., 1998; Çavas e Ergene-Gözükara, 2003 e 2005; Çavas et al., 2005; Costa e Costa, 2007; Çavas e Könen, 2008; Talapatra et al., 2010; Ansari et al., 2011; Costa et al., 2011).

Os glóbulos vermelhos (eritrócitos) dos peixes possuem núcleo e ribossomos o que lhes permite sintetizar proteínas como a hemoglobina. Este tipo celular apresenta um tempo de vida de 4 a 6 meses (Lane et al., 1982; Lane, 1984; Boutilier e Ferguson, 1989; Keen et al., 1989; Lund et al., 2000; Phillips et al., 2000; Tiano et al., 2000; 2001).

Suas membranas biológicas são sensíveis ao estresse oxidativo, uma vez que são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, os quais são extremamente sensíveis à oxidação e podem direta ou indiretamente causar muitas doenças aos peixes (Slater, 1982; Sakai et al., 1989; Ito et al., 1999; 2000; Mai, et al., 2010). Os glóbulos vermelhos estão constantemente expostos a ROS, por ter a função de transporte de oxigênio. Nagasaka et al. (2004) demonstrou que o estresse oxidativo afeta a permeabilidade de membrana de eritrócitos do sangue

de peixes, reduzindo sua fluidez. Mesmo que possa apresentar sistema de reparo contra o estresse oxidativo, a exposição constante pode levar ao acúmulo de danos tais como o envelhecimento e declínio do sistema de reparo (Kaewsrithong et al., 2001).

Os eventos associados à exposição a cádmio induzem o stress oxidativo. Este está descrito como grande elemento promotor de instabilidade gênica. No entanto, poucos dados têm sido adquiridos na literatura sobre a geração, dinâmica temporal na circulação e processo de remoção do sistema circulatório de alterações nucleares eritrocíticas. Neste estudo, técnicas morfológicas, bioquímicas e analíticas foram utilizadas visando determinar as relações entre a integridade celular e sistêmica dos eritrócitos utilizando modelo biológico aquático de grande relevância alimentar e ecológica expostos a diferentes concentrações de cádmio.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos de diferentes concentrações de cádmio em diferentes órgãos e tecidos de tilápias (*O. niloticus*), visando esclarecer os principais mecanismos associados aos efeitos genotóxicos que podem estar relacionadas às frequências dos diferentes tipos de alterações nucleares eritrocíticas.

1.1. Objetivos específicos

1. Determinar as diferentes populações sanguíneas nos gráficos de citometria de fluxo;
2. Avaliar a indução do estresse oxidativo na porção rica em eritrócitos por citometria de fluxo submetidas a diferentes tempos de exposição e concentrações de cádmio;
3. Avaliar comprometimento da permeabilidade de membrana em eritrócitos por citometria de fluxo após exposição a diferentes tempos e concentrações de cádmio;
4. Determinar as frequências dos diferentes tipos de alterações genotóxicas (bolha nuclear, broto nuclear, condensação nuclear, fissura nuclear, núcleo lobado, micronúcleo, vacuolização nuclear) em eritrócitos provenientes de animais expostos a diferentes tempos e concentrações de cádmio;
5. Avaliar morfometricamente a distribuição de pigmentos (hemossiderina, lipofuscina e melanina) e centros melanomacrofágicos em baço e rim cranial de tilápias submetidas a diferentes tempos e concentrações de cádmio;

6. Quantificar as expressões de Nrf2 e H2AX em sangue de tilápias submetidas a diferentes tempos e concentrações de cádmio
7. Determinar as concentrações de cádmio nos diferentes órgãos (baço, brânquia, hepatopâncreas e rim cranial) e tecidos (muscular e sanguíneo) de animais expostos a diferentes tempos e concentrações de cádmio e na água dos aquários utilizados durante o período experimental;
8. Relacionar a influência da concentração e tempo de exposição do cádmio com marcadores de estresse oxidativo e danos nucleares, permeabilidade de membrana, genotoxicidade e eventos hemocateréticos utilizando a tilápia como modelo de estudo.

Parte dos resultados estão incluídos em dois artigos publicados nas revistas Plos One e Microchemical Journal

Artigo 1

What the erythrocytic nuclear alteration frequencies could tell us about genotoxicity and macrophage iron storage?

Resumo

Alterações nucleares têm sido consideradas como indicativos de presença de contaminantes no ambiente. Em vertebrados, as alterações nucleares eritrocíticas são consideradas excelentes marcadores de exposição, devido à estreita relação entre suas frequências e danos no DNA. No entanto, poucos dados têm sido descritos na literatura sobre sua gênese, frequências de ocorrência e eliminação destas alterações após depuração. Neste estudo, avaliamos marcadores de viabilidade celular; genotoxicidade e hemocaterese utilizando as técnicas de citometria de fluxo, microscopia óptica, espectrometria de absorção atômica de forno de grafite e técnicas de microscopia eletrônica analítica. Os resultados mostraram uma estreita relação entre as alterações nucleares, conteúdo de cádmio no sangue total e ocorrência de centros melanomacrofágicos. Estes eventos ocorreram independentemente dos demais como ocorrência de espécies reativas de oxigênio e danos à membrana. Além disso, as frequências de bolha nuclear, condensação e vacuolização foram alteradas durante o período de exposição e núcleos lobados e broto nuclear durante o período de depuração. Uma queda na frequência das alterações nucleares durante o período de depuração foi associada ao aumento de células hemossiderina positiva no baço e no rim cranial. Estes dados demonstram de forma temporal os principais processos relacionados as frequências de alterações nucleares com alguns biomarcadores celulares e sistêmicos.

Artigo 2

Validation of methods employing fast alkaline solubilization to determine cadmium in fish liver, spleen, gills and muscle by graphite furnace atomic absorption spectrometry

Resumo

A contaminação do ambiente aquático ocorre por numerosos agentes tóxicos resultantes de atividades industriais agrícolas e domésticas. Metais pesados como o cádmio são poluentes altamente danosos ao ecossistema devido a sua persistência e bioacumulação. As validações dos métodos analíticos foram realizadas para determinar o acúmulo de cádmio no fígado, baço, brânquia e músculo de peixe por espectrometria de absorção atômica de forno de grafite (GF AAS). Os métodos basearam-se na solubilização alcalina das amostras com hidróxido de benziltrimetilamônio a 40% v/v em água (Universol®). A solubilização ocorreu de forma imediata sem necessidade de aquecimento, micro-ondas ou qualquer outro equipamento. Rutênio foi o melhor modificador (500 µg) para as amostras de baço, brânquia e músculo. Para o fígado, o melhor modificador foi irídio permanente (500 µg). As temperaturas ótimas de pirólise foram 450°C para o fígado e baço, 500°C para a brânquia e 400°C para o músculo, enquanto que para a atomização, as temperaturas ótimas foram de 1800, 1100, 1600 e 900°C, respectivamente. Não foram observados efeitos de matriz para fígado e brânquia quando a calibração externa foi realizada. Para baço e músculo, foram observados efeitos de matriz e foi utilizada a calibração de correspondência de matriz. Os limites das quantificações foram 0,13, 1,20, 0,34 e 1,80 µg g⁻¹ para o fígado, baço, brânquia e músculo, respectivamente. Os sinais de absorção obtidos para cada amostra foram simétricos e voltou à linha de base em menos de 5 s. Os níveis de recuperação variaram de 87,1 a 108,2. Para a análise de sete materiais de referência certificados, os valores obtidos não foram estatisticamente diferentes dos valores certificados. Os dados mostraram acúmulo de cádmio em todos os órgãos e tecidos estudados.

RESULTADOS NÃO INCLUIDOS NAS PUBLICAÇÕES

BLOCO 1 – PCR em tempo real

1. *Expressão de indicador de estresse oxidativo (Nrf2) e indicador de reparo celular (H2AX) em células sanguíneas de tilápias expostas ao cádmio.*

A expressão de Nrf2 foi crescente nas primeiras 48h para o tratamento Cd-0,25 e até 96h para o tratamento de Cd-2,5. Nas duas concentrações de cádmio, o aumento máximo foi próximo a 6 vezes da expressão basal (controle). O tratamento Cd-0,25 apresentou uma queda na superexpressão de Nrf2 em 96 h e subsequente subexpressão de Nrf2 no período de depuração. O valor de expressão ao final do período de depuração foi abaixo do basal (controle). O tratamento Cd-2,5 apresentou queda apenas durante o período de depuração (Figura 7).

Em 48 horas a superexpressão do Nrf2 ocorreu de forma mais intensa no tratamento Cd-0,25, invertendo-se com o Cd-2,5 no tempo seguinte em decorrência da queda na expressão de Nrf2 em Cd-0,25 e elevação em Cd-2,5 observada em 96 horas de exposição (Figura 7).

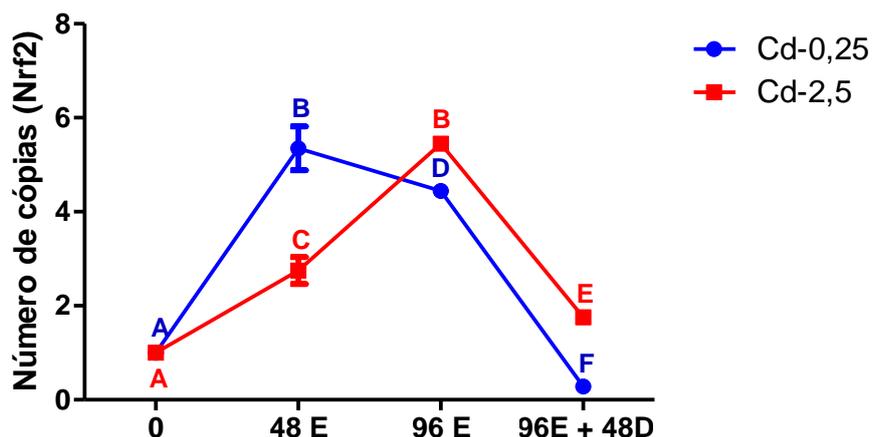


Figura 7. Expressão do fator de transcrição Nrf2 em células sanguíneas de tilápias expostas a diferentes tempos e concentrações de cádmio. Diferentes letras indicam diferença significativa entre tempos e tratamentos pelo teste ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$).

Foi observada uma superexpressão de H2AX (3 vezes superior ao basal - controle) nas primeiras 48h de exposição ao tratamento Cd-0,25, seguido de subexpressão nos tempos subsequentes. No tratamento Cd-2,5 o pequeno aumento de expressão foi obtido apenas em 96 horas de exposição, também seguido de subexpressão no período de depuração (Figura 8).

Em 48 horas a superexpressão do H2AX ocorreu de forma mais intensa no tratamento Cd-0,25, invertendo-se com o tratamento Cd-2,5 nos tempos de 96h em consequência de queda na expressão de Cd-0,25 e leve elevação em Cd-2,5 (Figura 8).

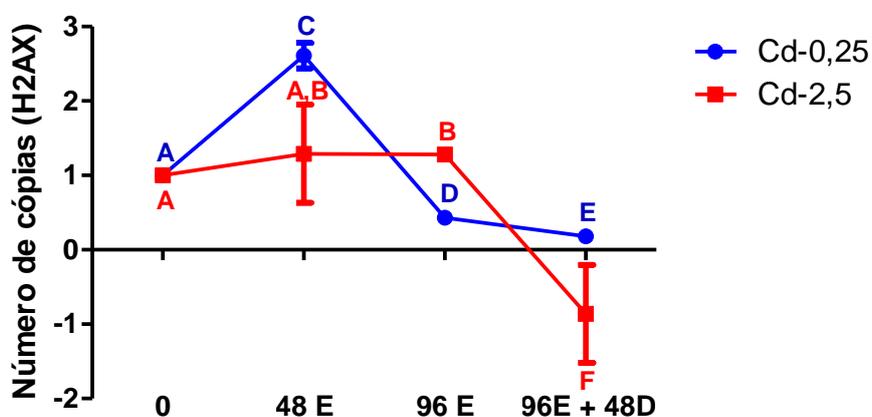


Figura 8. Expressão do gene H2AX em células sanguíneas de tilápias expostas a diferentes tempos e concentrações de cádmio. Diferentes letras indicam diferença significativa entre tempos e tratamentos pelo teste ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$).

BLOCO 2 – Citometria de fluxo nas análises das populações sanguíneas e alterações nucleares em eritrócitos

1. Separação (Cell sorting) e imageamento por citometria de fluxo e microscopia de luz

Com o uso de citômetro (FACSAria) capaz de isolar as células a partir de áreas específicas dos gráficos citométricos, conseguimos minimizar a contaminação obtida entre as populações adquiridas pelo método Ficoll (Artigo 1). As células adquiridas de cada quadrante específico (P2, P3, P4 e P5), utilizando o citômetro FACSAria, foram analisadas em esfregaços sanguíneos corados por May-Grünwald e visualizadas através de microscopia de luz (Figura 9).

Adicionalmente, utilizando o equipamento ImageStream®X foi possível obter imagens de campo claro das células em tempo real, confirmando os dados referentes às populações celulares e ao aspecto morfológico obtido pela microscopia de luz (Figura 9).

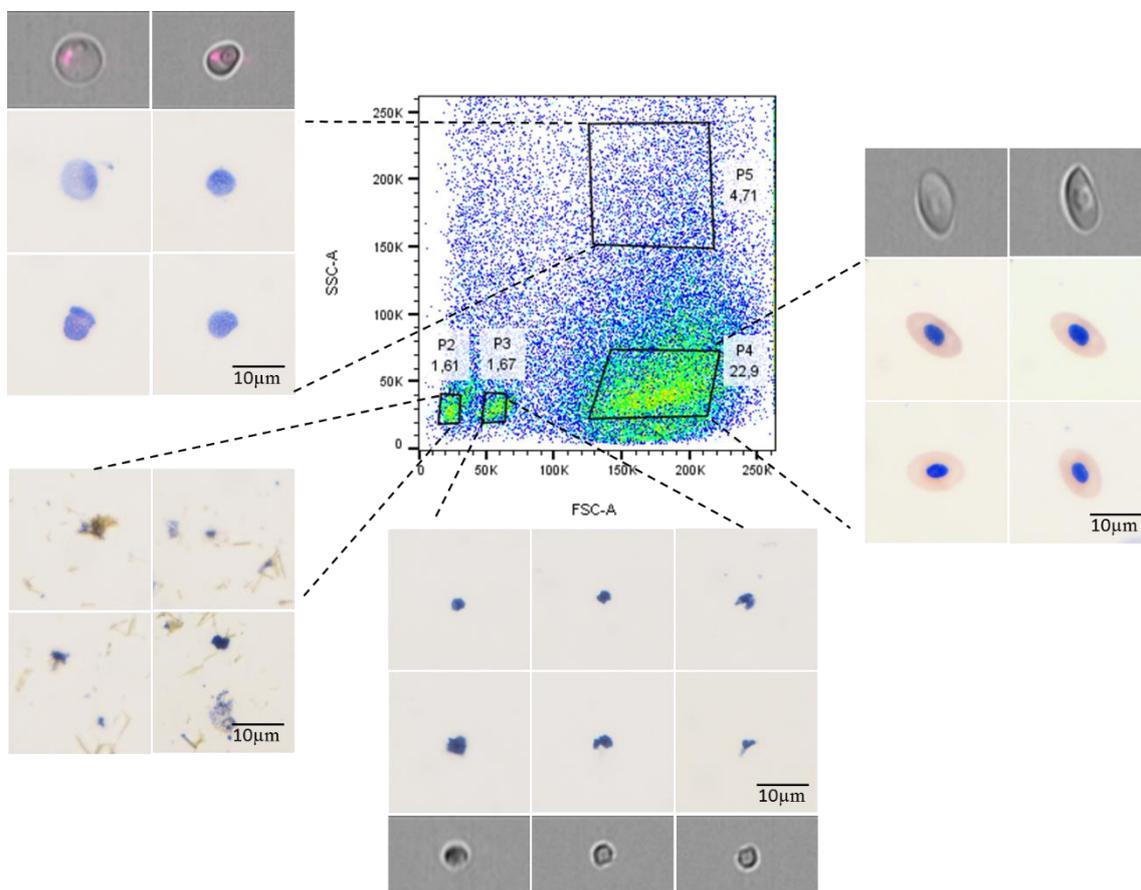


Figura 9. Gráfico de sangue total (FSH x SSC) avaliando as diferentes populações de células sanguíneas após separação (*Cell Sorting*) e aquisição direta de imagens por citometria de fluxo (imagens de fundo cinza) e microscopia de luz (coloração por May-Grünwald). P2 – resíduos celulares; P3 – porção rica em linfócitos/trombócitos; P4 – porção rica em eritrócitos; P5 – porção rica em granulócitos. Barra = 10µm.

2. *Localização da posição de eritrócitos e núcleos alterados em citômetro de fluxo (Image Stream®)*

Um novo estudo da posição das populações sanguíneas em gráficos de citometria foi realizado utilizando o citômetro Image Stream® capaz de adquirir imagens de células em campo claro e marcadas por diferentes fluorocromos. Este equipamento não apresenta o mesmo perfil celular encontrado em outros citômetros. As características dos núcleos das células sanguíneas marcados por Draq-5 foram utilizadas para determinar a posição das populações sanguíneas com o objetivo subsequente de avaliar alterações nucleares nessas células. Foram detectadas 4 populações (P3, P4/P5, P6 e P7) distintas e suas respectivas imagens foram destacadas (Figura 10).

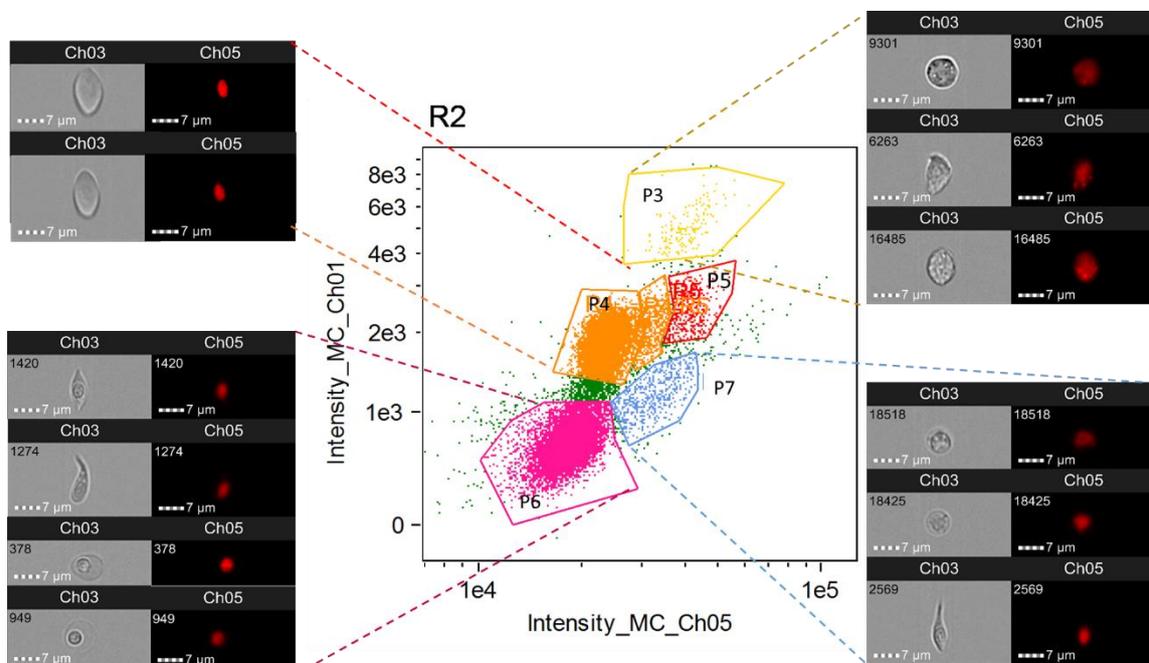


Figura 10. Gráfico de sangue total avaliando as diferentes populações de células sanguíneas e aquisição direta de imagens por citometria de fluxo (imagens de fundo

cinza e fundo preto com células marcadas por DRAQ-5). P3 – granulócitos; P4 e P5 – eritrócitos; P6 e P7 linfócitos e trombócitos. Barra=7 μ m.

Avaliando a porção eritrocítica, observamos eritrócitos em diferentes posições: (1) posição visual superior; (2) posição visual frontal e (3) posição visual lateral. Estes dados foram demonstrados através da marcação dos núcleos por Draç-5 e utilizando os parâmetros *Aspect Ratio* (razão entre largura e altura da célula) da intensidade de marcação x Intensidade de marcação (Figura 11).

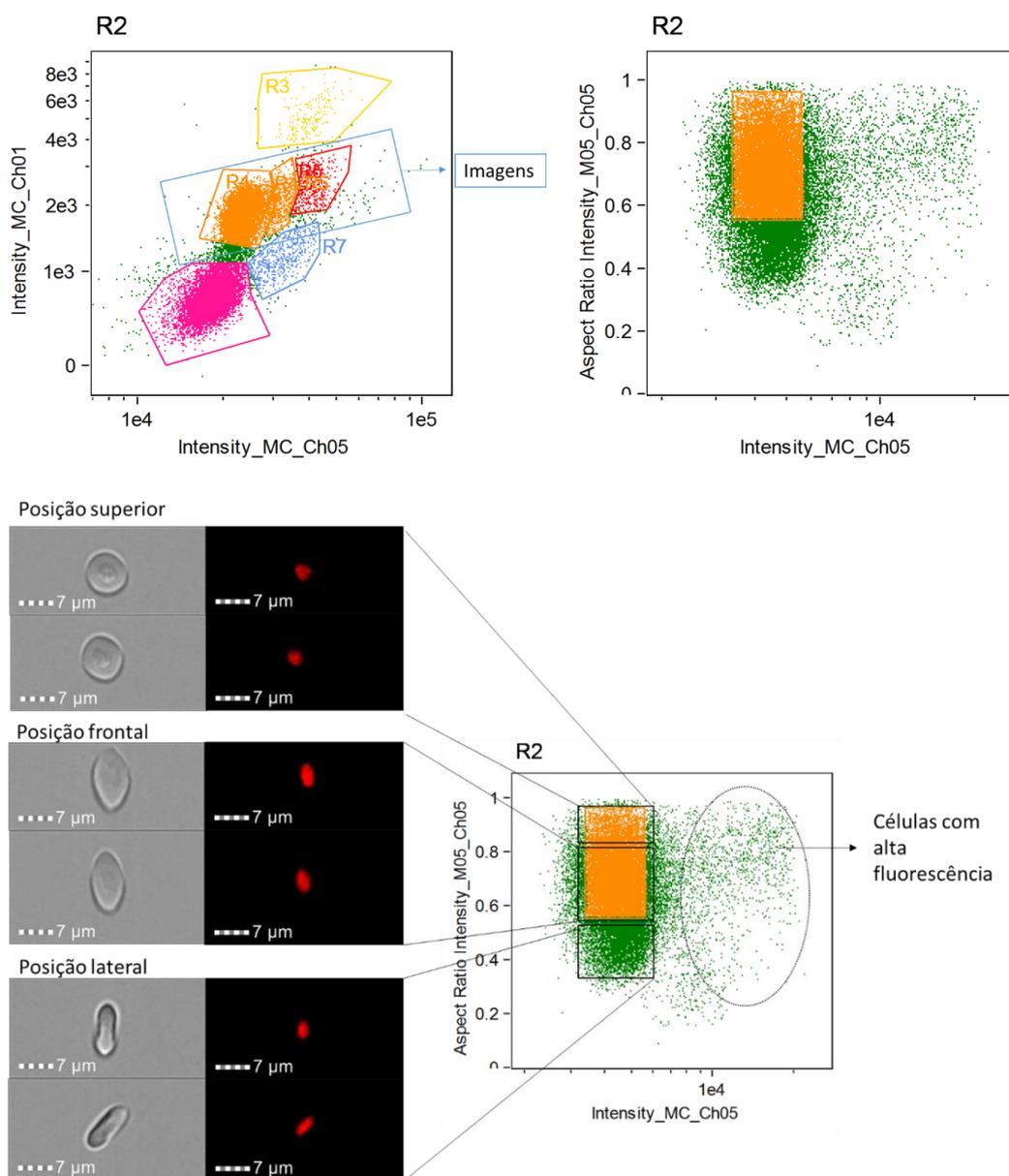


Figura 11. Gráfico representativo da população eritrocítica marcada por DRAQ-5 em citômetro de fluxo (Image Stream®) com aquisição de imagens de eritrócitos em diferentes posições (células vistas de cima - superior, de frente -frontal e de lado - lateral). Barra=7 μ m.

Os eritrócitos em vista frontal são os mais adequados para avaliar alterações nucleares. Portanto, nesta região foi identificado porção rica em determinadas alterações nucleares como os núcleos condensados na porção superior e núcleo lobado (*lobed*), bolha nuclear (*blebbed*) e fissura nuclear (*notched*) predominantemente na porção inferior (Figura 12).

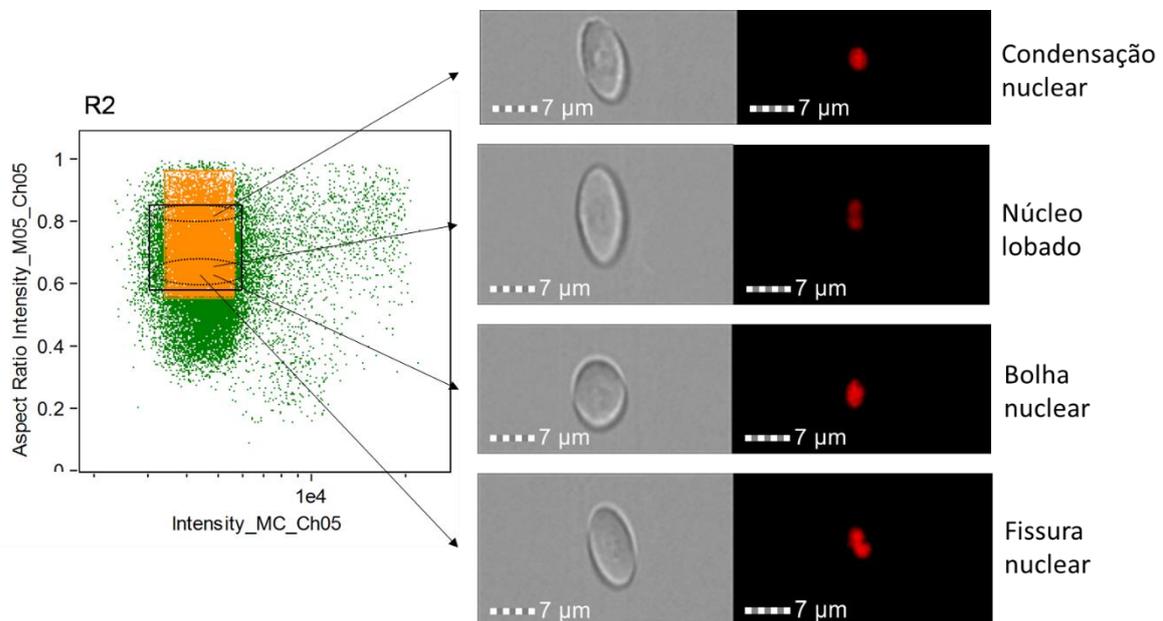


Figura 12. Gráfico de eritrócitos marcados por DRAQ-5 em posição frontal e aquisição de imagens de núcleo alterados com determinação de posição de algumas alterações nucleares. Barra=7 μ m.

BLOCO 3 – Espectrometria de absorção atômica

1. *Determinação por espectrometria de absorção atômica da concentração de cádmio nos órgãos e tecidos (baço, brânquia, hepatopâncreas, músculo, rim cranial e sangue) de tilápias expostas.*

O acúmulo de cádmio foi determinado nos órgãos e tecidos de tilápias expostas a este metal. De forma geral, o acúmulo variou predominantemente em função do tempo e da concentração de exposição. O baço foi o órgão de maior concentração de cádmio em todos os tratamentos. O acúmulo neste órgão ocorreu mais tardiamente na menor concentração e mais precocemente na maior concentração. O hepatopâncreas acumulou cádmio nas primeiras 48 horas nos grupos Cd-0,25 e Cd-2,5, sendo observado um maior aumento na maior concentração. Nas brânquias, o acúmulo ocorreu no período de depuração da menor concentração, no grupo Cd-0,25 o aumento ocorreu em 48 horas e na maior concentração o aumento foi observado durante toda a exposição e uma diminuição foi visualizada no período de depuração. O rim cranial demonstrou um aumento de cádmio apenas nas duas maiores concentrações (Cd-0,25 e Cd-2,5) durante a exposição (48 e 96 horas) e no músculo este acúmulo foi verificado apenas no grupo Cd-2,5 durante a exposição com subsequente diminuição no período de depuração (Figura 13).

Os valores obtidos para os órgãos de tilápias expostas ao cádmio apresentaram uma influência da concentração do metal que foi inserido na água. O hepatopâncreas apresentou o maior aumento (aproximadamente 280x) e um menor aumento (2,5x) foi observado no baço (Figura 13).

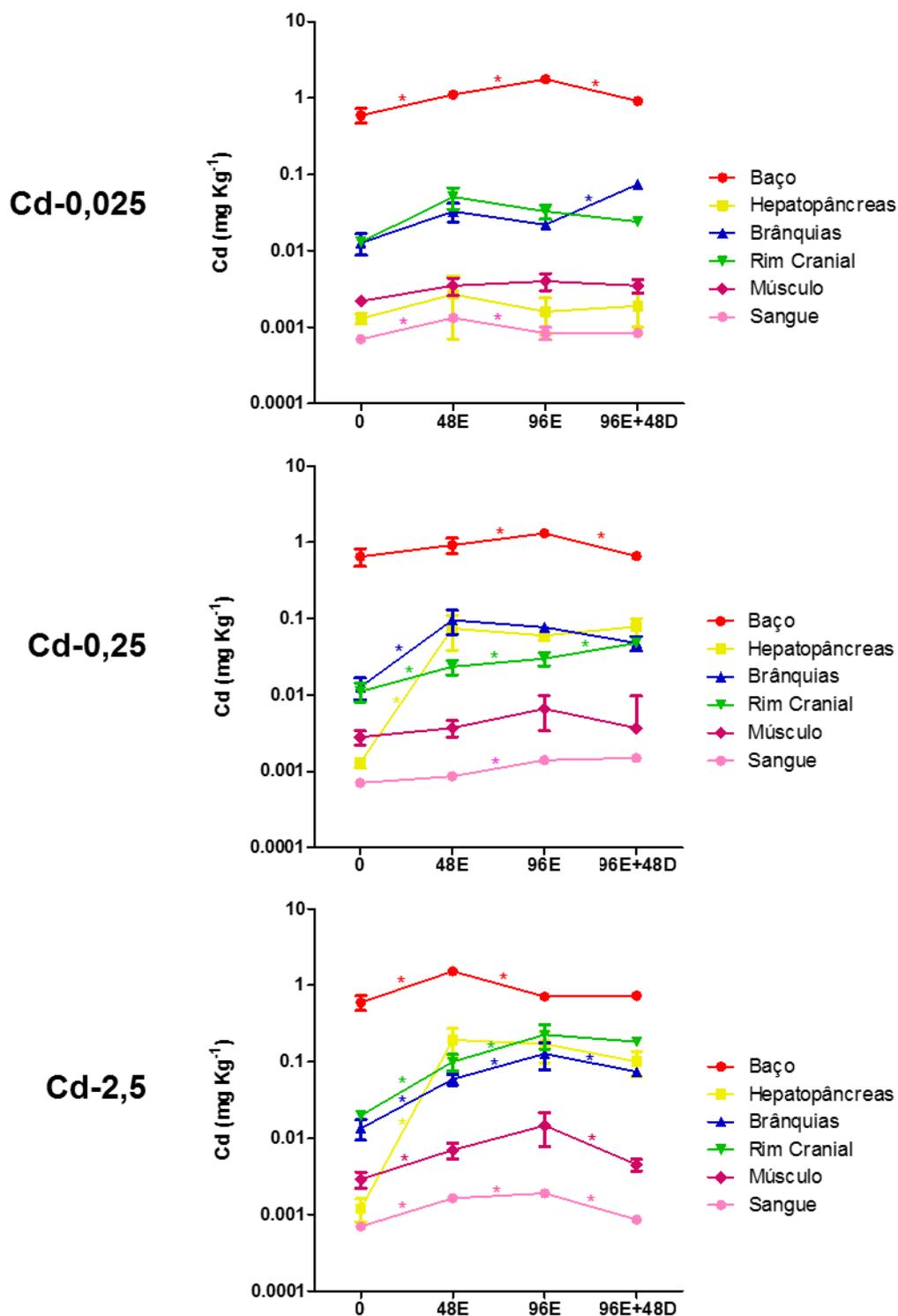


FIGURA 13. Gráficos de acúmulos de cádmio nos diferentes tecidos de tilápias expostas a diferentes concentrações de cádmio. Asterisco (*) indica diferença estatística pelo teste ANOVA e pós teste Bonferroni ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A avaliação morfológica de danos genotóxicos abordada em nossos estudos sugere que o tecido sanguíneo se apresenta como um bom modelo para a análise dos eventos relacionados à geração de danos genotóxicos, bem como a mecanismos de reparo. Além disso, a simplicidade de aquisição desse tecido associada às técnicas utilizadas na obtenção de dados confirmaram a viabilidade de seu uso como indicador de exposição (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Osman et al., 2010; Summak et al., 2010; Harabawy e Mosleh, 2014).

Nosso modelo de estudo foi desenvolvido a partir de seis experimentos preliminares e nos permitiu estabelecer os tempos e concentrações específicos para a determinação e avaliação de eventos lesivos à integridade celular (produção de ROS, danos de membrana e processos transcripcionais) bem como relaciona-los à ocorrência de ANEs (Artigo 1, Bloco 1).

O teor de cádmio no sangue durante o período experimental (Artigo 1 e Artigo submetido) e a frequência de ANEs apresentaram aumentos muito similares (cerca de 2x) durante o período de exposição com subsequente diminuição após o período de depuração. Este comportamento ocorre de forma independente dos parâmetros de viabilidade celular avaliados (ROS e danos membranares). Além disso, a frequência de algumas alterações nucleares como bolha nuclear (BL), vacuolização (VA) e condensação nuclear (CO) é alterada durante a exposição e núcleo lobado (LO) e broto nucleares (BU) no período de depuração (Artigo 1). Estes eventos estão sintetizados na figura 14 (abaixo). Outro aspecto importante é a característica do sangue manter relativa baixa concentração de cádmio mesmo após exposição a $2,5\text{mg L}^{-1}$

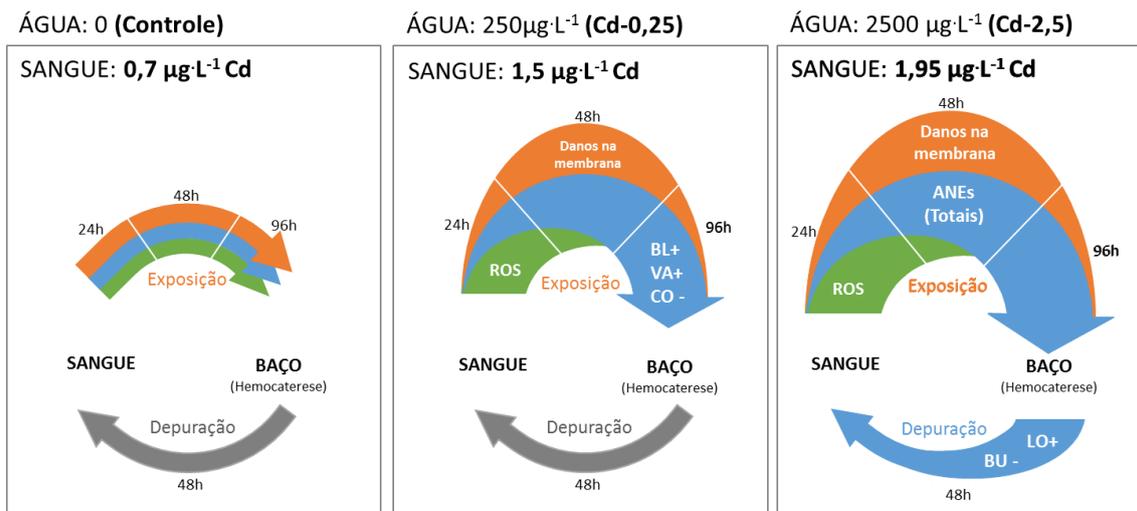


Figura 14. Esquema demonstrativo de diferentes marcadores de exposição ao cádmio. No grupo controle não foi observada alteração nos marcadores estudados. Nos grupos expostos foi observado aumento de ROS em 24 horas, aumento de danos membranares em 48 horas e aumento das ANEs em 96 horas. A frequência de bolha nuclear, vacuolização e condensação foram alteradas durante o período de exposição e núcleo lobado e broto nuclear durante o período de depuração. O sinal positivo (+) indica que tais alterações acompanharam o comportamento das ANEs totais. O sinal negativo (-) indica que a frequência das alterações foi inversamente proporcional ao total das ANEs.

A relação entre os danos eritrocíticos avaliados (aumento de ROS, danos membranares e ocorrência de ANEs) com as expressões de Nrf2 e H2AX sugere uma sequência de eventos culminando no aumento de ANEs na circulação sanguínea (Artigo 1 e Bloco 1). Entretanto, o mecanismo de indução de danos bem como o reparo e/ou retirada das células lesadas da circulação é bastante distinto entre as duas concentrações utilizadas neste estudo.

Menor concentração (Cd-0,25)

No tratamento Cd-0,25, o aumento na produção de ROS em 24hs de exposição ocorre associado à elevação no número de células com comprometimento na permeabilidade de membrana (Artigo 1) resultando na superexpressão de Nrf2 em 48h (Bloco 1). Dados similares foram obtidos por Zheng et al. (2016) que após exposição aguda ao cádmio (1 mg L^{-1}) observou aumento dos níveis de ROS e de oxidação lipídica acompanhados por uma elevação nos níveis de Nrf2 em fígado e cérebro de peixe zebra. Esses dados

sugerem que o mecanismo de ação de Nrf2 (síntese de enzimas antioxidantes) reduz expressivamente os danos nas membranas após 48 horas de exposição (Artigo 1 e Bloco 1).

Ainda em 48 horas, a superexpressão de H2AX indica clara ativação dos mecanismos de reparo celular que coincidem com a manutenção das frequências de ANEs próximas ao número basal sugerindo sucesso no mecanismo de remediação dos danos no DNA. Esses dados são acompanhados também da marcação basal de hemossiderina nos sítios hemocateréticos do baço e do rim cranial durante este tempo de exposição (Artigo 1, Bloco 1).

Após 96 horas de exposição, sob níveis basais de ROS, a superexpressão de Nrf2 foi mantida e uma marcante subexpressão de H2AX foi observada (Artigo 1, Bloco 1), indicando que o aumento das frequências de ANEs ocorreu sob condições de redução das respostas de reparo de lesões de DNA (Artigo 1, Bloco 1). Estes dados sugerem que o aumento da frequência das ANEs estaria associado ao aumento da remoção de eritrócitos no período de maior instabilidade gênica que teve início significativo no intervalo entre 48- e 96hs.

Essa aparente contradição (favorecimento de replicação/aporte de células sem ativação de reparo a circulação) evidenciam uma instalação de instabilidade gênica crônica. De acordo com Bertin e Averbeck (2006) e Giagini et al. (2006) vários sistemas de reparo de danos no DNA como NER (reparo em excisão de nucleotídeos) e BER (reparo em excisão de bases) são afetados de forma reversível por cádmio. Já o reparo das lesões mais severas como as de dupla fita de DNA (NHEJ – união terminal não homóloga) são menos efetivos (Rothkamm e Lobrich, 2003).

O aumento provável de NHEJ é mostrado em estudo associando as frequências de micronúcleos e γ H2AX (forma fosforilada) em células embriogênicas de peixe zebra expostas a diferentes concentrações de cádmio por 24 horas. Neste estudo foi observado que em concentrações mais elevadas de cádmio (50 μ M e 100 μ M) as expressões de H2AX são diminuídas e acompanhadas pelo crescimento constante de instabilidade gênica (Pereira et al., 2013).

Durante o período de depuração, a redução das respostas antioxidantes e de reparo (subexpressão de Nrf2 e H2AX respectivamente) (Bloco 1) e

manutenção das ANEs em elevado número (Artigo 1) sugerem uma ação epigenética. Modificações epigenéticas incluem permutação, silenciamento de genes, reprogramação, progressos de carcinogênese, efeitos teratogênicos, regulação das modificações de histona e heterocromatina (Deichmann, 2016). Em estudo de diabetes melitus, utilizando peixe zebra como modelo, foram demonstradas alterações teciduais epigenéticas como uma consequência inicial de eventos hiperglicêmicos. Estas alterações persistiram e continuaram a progredir mesmo após o controle da glicemia (Capiotti et al., 2014). Efeitos epigenéticos podem ser gerados por elementos tóxicos, levando as células e os organismos a um desequilíbrio metabólico independentemente da genotoxicidade (Baccarelli e Bollati, 2009; Herceg e Vaissiere, 2011; Paul et al., 2011).

Demonstramos também que sob condições ambientais favoráveis, a manutenção do elevado número de ANEs e aumento relevante na marcação de hemossiderina em centros melanomacrofágicos do baço e macrófagos isolados do baço, do rim cranial sugere elevação ativação da função hemocaterética. No período de depuração, órgãos como o rim cranial, recrutam macrófagos que normalmente não são associados ao processo hemocaterético (Artigo 1).

Maior concentração (Cd-2,5)

Na mais alta concentração (Cd-2,5), nas primeiras 48 horas de exposição, já pode ser notado um acúmulo de cádmio no sangue, fator que não alterou o aumento de ROS de forma dose-dependente (a produção de ROS foi similar nas duas concentrações). Entretanto, o aumento no número de eritrócitos com permeabilidade de membrana comprometida foi mais expressivo em 48 horas em relação a menor concentração (Artigo 1). Este fato pode estar relacionado ao baixo aumento na expressão de Nrf2 em 48 horas (Bloco 1), comprometendo as respostas antioxidantes celulares. A superexpressão de Nrf2 crescente entre o período de 48 e 96 horas sendo reduzida apenas no período de depuração, sugere a manutenção dos organismos e células sob regime de inibição dos mecanismos antioxidantes. Este fato foi observado também por Wang e Gallagher (2013) durante exposição aguda ao cádmio mostrando que este

elemento inibiu a expressão do gene Nrf2 induzindo danos nos tecidos olfatórios de peixe zebra pela elevação de estresse oxidativo.

Em exposição a altas concentrações de cádmio, o comprometimento das respostas de reparo é mais severo. As expressões de H2AX praticamente mantiveram seus níveis basais durante o período de exposição (até 96 horas) o que favoreceu o aumento da ocorrência de ANEs (Artigo 1, Bloco 1).

O severo comprometimento gênico instalado sob estas condições não impediu o aumento das ANEs desde as primeiras 48 horas, mas parece influenciar negativamente nos tamanhos dos centros melanomacrofágicos do baço em 96 horas (Artigo 1). Interessantemente, o acúmulo de cádmio neste órgão também apresenta queda (Bloco 3).

Quando os animais são retirados da alta concentração de cádmio (Cd-2,5) no período de depuração uma queda marcante nas expressões de Nrf2 e H2AX é observada. Esta queda ocorre concomitantemente a queda das células circulantes contendo ANEs. Sugerimos que a diminuição de ANEs estaria relacionada à retirada das células com núcleos alterados da circulação já que não há estímulo de reparo (Artigo 1 e Bloco 1). Estes dados são corroborados pelo aumento dos centros melanomacrofágicos do baço associadas a macrófagos isolados hemossiderina positivos no baço e no rim cranial.

Comportamento das ANEs durante a exposição e depuração

O número de correlações entre as frequências das diferentes ANEs foi numericamente maior em organismos expostos às concentrações mais elevadas (Tabela 5 do Artigo 1). Esses dados mostraram de forma simples que o aumento das frequências das alterações nucleares pode não necessariamente indicar a exposição a agentes genotóxicos e que diferentes tipos de ANES ou a ausência delas podem ajudar na inferência sobre a exposição ou depuração do animal.

Os aspectos da gênese de ANEs em diferentes modelos biológicos têm referenciado principalmente ao micronúcleo frequentemente descrito como resultado de replicação celular imperfeita. Para muitos outros tipos de alterações tem sido sugerido a mesma via de geração, mas estes foram ainda pouco estudadas sob este aspecto. Sendo assim a ideia é que alterações seriam vinculadas a eritrócitos recém-chegados ao sistema circulatório. De fato,

trabalhos como Çavas e Ergene-Gozukara (2005), Xu et al. (2011) e Sayed et al. (2016) mostram ocorrência de alterações em células tipicamente ricas em RNA. Poucos e recentes trabalhos como do Utani et al. (2011) evidenciaram a possibilidade da geração de alterações nucleares como micronúcleo e broto nuclear em células COLO 320DM em interfase. Portanto, esta questão ainda necessitando de novos estudos.

Se considerarmos que a grande maioria das ANEs entra na circulação já com seus núcleos alterados, especial atenção deve ser dada ao órgão hemocitopoiético, sendo nos peixes o rim cranial. Motivo importante de avaliar a concentração de cádmio neste órgão bem como outros marcadores de ciclo celular como a p53.

A ativação de p53 (proteína supressora de tumor) interrompe o ciclo celular em fase G2/M para que o sistema de reparo celular possa reverter o dano, caso contrário a instabilidade gênica é instalada (Bork et al., 2010; Sayed et al., 2016). A necessidade de compreensão sobre a resposta de p53 na formação das ANEs foi ampliada principalmente pela evidente diferença na resposta celular ao reparo associada às concentrações de cádmio aplicadas, mostrando que a queda nas expressões de H2AX permitiu uma inesperada progressão do ciclo celular em células marcadamente dotadas de instabilidade gênica.

Citometria de Fluxo nas análises de núcleos eritrocíticos alterados

A técnica de citometria de fluxo tem sido utilizada na avaliação de danos em células sanguíneas de peixes. Espécies como carpas, peixe zebra e salmão tiveram a posição de suas populações sanguíneas determinadas nos gráficos de citometria de fluxo (Pettersen et al., 2000; Inoue et al., 2002; Traver et al., 2003; Langenau e Zon, 2005). No entanto, para tilápias ainda não havia descrição disponível na literatura da disposição destas populações.

Em nossos estudos foi determinado a posição da população eritrocítica a qual denominamos porção rica em eritrócitos (PRE), utilizando técnicas de separação por gradiente de Ficoll, lise de eritrócitos (Artigo 1) e sorteamento celular (*cell sorting*) (Bloco 2 – Figura 9). As análises de danos celulares como permeabilidade de membrana foram possíveis com o auxílio desta técnica.

Técnica de citometria convencional seria ineficiente para outras abordagens tais como avaliações de danos morfológicos no DNA. Entretanto, o uso de um citômetro capaz de adquirir imagens em alta resolução possibilitou a visualização de células com danos morfológicos nucleares. Estas análises foram realizadas em colaboração com a Pesquisadora Andrea Teixeira de Carvalho utilizando as instalações da Fundação Oswaldo Fiocruz (Centro de Pesquisa René Rachou).

Inicialmente, definimos a posição dos eritrócitos no citômetro Image Stream® (Bloco 2, Figura 10). Na região correspondente à população eritrocítica, verificamos a ocorrência de células fotografadas em diferentes posições (de frente, de perfil e de cima). Nas células fotografadas em posição frontal visualizamos as mesmas alterações nucleares vistas em microscópio de luz (Bloco 2, Figura 11). Subsequentemente, foi possível observar microrregiões ricas em determinadas alterações nucleares como condensação, bolha nuclear, núcleo lobado e fissura nuclear (Bloco 2, Figura 12). Os parâmetros utilizados que permitiram determinar estas microrregiões foram intensidade de fluorescência do marcador nuclear (DRAQ-5) adquirido no canal 5 (Ch 05) X *Aspect Ratio* da intensidade de fluorescência de DRAQ-5. *Aspect Ratio* é a resultante da razão da largura pelo comprimento (L/C) (Figura 15).

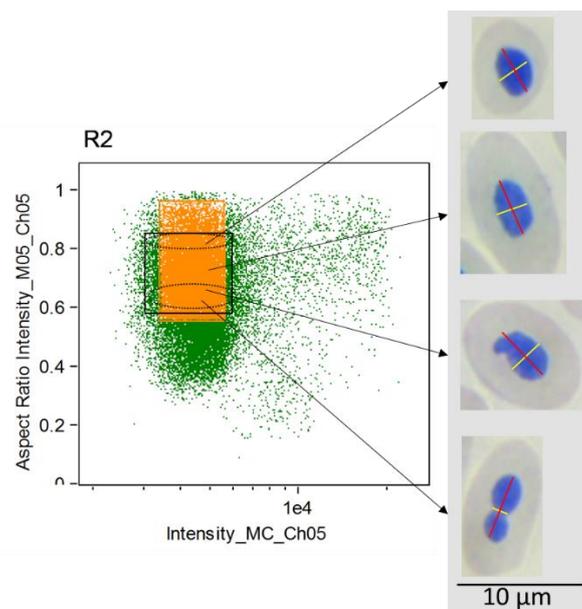


Figura 15. Gráfico da dispersão de células sanguíneas de *O. niloticus* adquiridos em citômetro Image Stream® (direita). Os parâmetros utilizados foram intensidade de fluorescência de DRAQ-5 X *Aspect Ratio* da intensidade de DRAQ-5. A esquerda,

demonstrativo da posição dos eritrócitos de acordo com a resultante de *Aspect Ratio*. Linha amarela representa largura e linha vermelha o comprimento.

A determinação da posição de algumas alterações nucleares através da técnica de citometria de fluxo está sendo descrita pela primeira vez por nosso grupo de pesquisa. Acreditamos que após a validação do método conseguiremos análises rápidas e eficazes. Poderemos, por exemplo, analisar efeitos genotóxicos em eritrócitos de tilápias de animais retirados de diversas condições ambientais. Estes poderão ser utilizados como biomarcadores de exposição através da citometria de fluxo.

Validação da dosagem e acúmulo de cádmio em diferentes órgãos e tecidos

Resultados relevantes sobre o acúmulo de cádmio nos diferentes tecidos foi possível após a validação do método de detecção do cádmio utilizando Universol® (solvente de matriz orgânica alcalino que dispensa uso de ácido e aquecimento) otimizando e barateando as análises (Artigo 2 e Artigo submetido).

A validação do método analítico para determinar quantitativamente a presença de cádmio foi realizada para cada órgão e tecido antes da análise dos animais do ensaio de exposição ao cádmio. Utilizamos então um método de solubilização das amostras baseado em uma digestão alcalina com hidróxido de benziltrimetilamônio a 40% v/v em água (Universol®) também com a realização de uma varredura para a adequação das temperaturas e tempos de pirólise e atomização. É importante ressaltar que as temperaturas ideais para cada matriz (órgão e/ou tecido) é muito variável, sendo de extrema importância a padronização delas antes da execução das análises dos materiais experimentais. Considerando a demanda deste trabalho decidimos, em colaboração como Professor José Bento Borba (Química-UFMG), desenvolver a validação do método. Nessa linha avaliamos também diferentes modificadores químicos (irídio, nióbio, tântalo, rutênio, o ródio, o zircônio e o tungstênio) que convertem o analito em uma forma menos volátil permitindo a eliminação da matriz sem vaporizar o elemento a ser analisado, o que ocorrerá na atomização em altas temperaturas (Artigo 2).

Em humanos, as vias de acesso ao organismo pelo cádmio são as aéreas e gástricas. A principal entrada ocorre pelas vias aéreas (25 - 60 %) seguidas pela ingestão de alimentos e água contaminados absorvidos pelo trato gástrico (5 - 10 %) (ATSDR, 2008). Nos peixes, as brânquias são os primeiros órgãos que entram em contato com poluentes. Sua grande área superficial (cerca de 90% da superfície) permite uma maior interação e absorção de tóxicos (Evans, 1987; Wu et al., 2007). Após a absorção pelas brânquias, o metal é transferido para órgãos de estoque (fígado e rim) através da circulação sanguínea (Chowdhury et al., 2005).

Nas tilápias, observamos que apesar da total submersão dos peixes em águas contendo cádmio, o acúmulo deste metal ocorreu de forma distinta nos diferentes órgãos e tecidos. A variação desse acúmulo foi relacionada a concentração de cádmio e tempo de exposição (Artigo 1, Artigo 2, Bloco 1 e Artigo submetido).

O baço foi o órgão de maior retenção de cádmio em todas as concentrações de cádmio provavelmente pela íntima relação da remoção de células danificadas como sugerido nos dados do processo hemocaterético (Artigo 1, Artigo 2). Em 96 horas da mais alta concentração de cádmio (Cd-2,5) observamos uma baixa no acúmulo de cádmio no baço (Bloco 3) associado à estabilidade do número de eritrócitos com núcleos alterados e queda na atividade hemocaterética deste órgão neste tempo (Artigo 1).

Brânquias e rim cranial em geral apresentam acúmulos semelhantes nas 3 concentrações utilizadas (Artigo 2). As brânquias mostraram indícios de processo depurativo quando submetidos a baixas concentrações (Cd-0,025). Nesta mesma concentração e neste mesmo período experimental, o baço apresentou uma redução no acúmulo de cádmio (Bloco 3).

O hepatopâncreas se mostrou como órgão de estoque de cádmio apenas nas mais altas concentrações (Cd-0,25 e Cd-2,5). Em Cd-0,025 o acúmulo de cádmio no hepatopâncreas foi inferior ao acúmulo no músculo, indicando que a concentração de cádmio influencia diretamente o estoque de cádmio no hepatopâncreas via circulação sanguínea (Artigo 2, Bloco 3).

O tecido muscular das tilápias se apresentou como um dos órgãos de menor acúmulo de cádmio. Dados similares também foram encontrados em

Tilapia guineenses e *Carassius auratus* (Etesin e Benson, 2007; Qu et al., 2014). De acordo com Qu et al. (2014), este fato pode ser explicado pelo tamanho deste tecido em relação aos outros, diluindo este acúmulo na massa total deste tecido. Em nossos estudos, o acúmulo máximo deste metal no músculo foi de 0,02 mg kg⁻¹. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) recentemente (2010) estabeleceu um limite de ingestão mensal tolerável de cádmio de 0,025 mg / kg de peso corporal. Assim sendo, animais que sofreram exposição aguda a 2,5 mg L⁻¹ são definitivamente impróprios para consumo (Artigo 2, Bloco 3).

CONCLUSÕES

1. Alterações nucleares eritrocíticas são excelentes marcadores de exposição aguda ao cádmio. A ocorrência das ANEs está intimamente relacionada com o teor de cádmio no sangue, mas não está relacionada à ocorrência de ROS e de permeabilidade de membrana;
2. A produção de ROS e o comprometimento da permeabilidade de membrana em eritrócitos são eventos sequenciais modulados pelas expressões de Nrf2;
3. O aumento das ANEs está associado à não indução de reparo por H2AX, demonstrando alta susceptibilidade deste gene a concentrações subletais de cádmio;
4. Cada ANE apresentou comportamento específico indicando a existência de um possível mecanismo subjacente à ocorrência de diferentes ANEs em estudos de genotoxicidade;
5. O padrão de marcação hemossiderina obtidos para os centros melanomacrofágicos de baço sugerem que estes são estruturas específicas de resposta na remoção de hemácias durante os períodos de maior instabilidade gênica;
6. Os padrões de marcação de hemossiderina obtido nos órgãos analisados (baço e rim cranial) evidenciam seu envolvimento na remoção e degradação de células circulantes danificadas durante o período de depuração;
7. A citometria de fluxo nas análises da instabilidade gênica poderá contribuir para um monitoramento ambiental rápido e eficiente utilizando eritrócitos de tilápias;

8. O acúmulo de cádmio em *O. niloticus* após exposição acontece em diversos órgãos e tecidos e pode variar dependendo da concentração e do tempo de exposição a cádmio.

PERSPECTIVAS

- Estudos da origem dos diferentes tipos de ANEs utilizando o tecido hemocitopoiético dos peixes (rim cranial).
- Quantificação por rtPCR de marcadores de estresse oxidativo, danos em DNA e alterações em ciclo celular em eritrócitos e rim cranial expostos ao cádmio.
- Quantificação das histonas (H2AX e γ H2AX) e mapeamento da marcação em cada tipo de ANEs.
- Estudo da influência do cádmio na fosforilação de proteínas envolvidas na expressão de H2AX, tais como ATM e ATR.
- Realização de ensaio *in vivo* para quantificação de alterações nucleares em citômetro de fluxo (Image Stream®) de células marcadas por fluorocromo.
- Avaliação do uso de eritrócitos fixados com aplicabilidade em estudos ambientais visando monitoramento com baixo custo e fácil reprodutibilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agency for toxic substances and disease registry. *Draft toxicological profile for cadmium. Atlanta*, 454p, 2008.

Alazemi, B. M.; Lewis, J. W.; Andrews, E.B. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Environmental Technology*, v. 17, p. 225-238, 1996.

Al-Sabti, K.; Metcalfe, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, v. 343, p. 121-135, 1995.

Anbumani, S.; Mohankumar, M. N. Gamma radiation induced cell cycle perturbations and DNA damage in *Catla Catla* as measured by flow cytometry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 113, p. 18-22, 2015.

Ansari, R. A.; Rahman, S.; Kaur, M.; Anjum, S.; Raisuddin, S. In vivo cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p.150-156, 2011.

Ateeq, B.; Abul Farah, M.; Ali, M. N.; Ahmad, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research*, v. 518, p. 135-144, 2002.

Ayylon, F.; Garcia-Vazquez, G. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Paecilia latipinna*: An assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research*, v. 467 p.177-186, 2000.

Baccarelli A.; Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Current Opinion in Pediatrics*, v. 21, p. 243-51, 2009.

Bakkenist, C. J.; Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, v. 421, p. 499-506, 2003.

Bakkenist, C. J.; Kastan, M. B. Initiating cellular stress responses. *Cell*, v. 118, p. 9-16, 2004.

Barbosa J. S.; Cabral T. M.; Ferreira D. N.; Agnez-Lima L. F.; Batistuzzo De Medeiros, S. R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, p. 320-325, 2010.

Bassing, C. H.; Chua, K. F.; Sekiguchi, J.; Suh, H.; Whitlow, S. R.; Fleming, J. C.; Monroe, B. C.; Ciccone, D. N.; Yan, C.; Vlasakova, K.; Livingston, D. M.; Ferguson, D. O.; Scully, R.; Alt, F. W. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 8173-8178, 2002.

Bassing, C. H.; Suh, H.; Ferguson, D. O.; Chua, K. F.; Manis, J.; Eckersdorff, M.; Gleason, M.; Bronson, R.; Lee, C.; Alt, F. W. Histone H2AX: a dosage dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell*, v. 114, p. 359-370, 2003.

Bayona, J. A. M.; Karuppanan, A. K.; Trites, M. J.; Barreda, D. R. Application of imaging flow cytometry for characterization of acute inflammation in non-classical animal model systems. *Methods*, 2016.

Beaton-Green, L. A.; Rodrigues, M. A.; Lachapelle, S.; Wilkins, R. C. Foundations of identifying individual chromosomes by imaging flow cytometry with applications in radiation biodosimetry. *Methods*, 2016.

Bentsen, H. B.; Eknath, A. E.; Vera, M. S. P.; Danting, J. C.; Bolivar, H. L.; Reyes, R. A.; Dionisio, E. E.; Longalong, F. M.; Circa, A. V.; Tayamen, M. M.; Gjerd, B.

Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v. 160, n. 1/2, p. 145-173, 1998.

Bertin, G.; Averbeck, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, v. 88, 1549-1559, 2006.

Bishop, C. J.; Majewski, R. L.; Guiriba, T. M.; Wilson, D. R.; Bhise, N. S.; Quiñones-Hinojosa, A.; Green, J. J. Quantification of cellular and nuclear uptake rates of polymeric gene delivery nanoparticles and DNA plasmids via flow cytometry. *Acta Biomaterialia*, v. 37, p. 120-130, 2016.

Bonner, W. M.; Redon, C. E.; Dickey, J. S.; Nakamura, A. J.; Sedelnikova, O. A.; Solier, S.; Pommier, Y. γ H2AX and câncer. *Nature*, v. 8, p. 957-967, 2008.

Bork, U.; Lee, W. K.; Kuchler, A.; Dittmar, T.; Thévenod, F. Cadmium-induced DNA damage triggers G2/M arrest via chk1/2 and cdc2 in p53-deficient kidney proximal tubule cells. *American Journal of Physiology -Renal Physiology*, v. 298, p. 255-265, 2010.

Boutillier, R. G.; Ferguson, R. A. Nucleated red blood cell function: metabolism and pH regulation. *Canadian Journal of Zoology*, v. 67, p. 2986-2993, 1989.

Bunthof, C. J.; Van Den Braak, S.; Breeuwer, P.; Rombouts, F. M.; Abee, T. Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 3681-3689, 1999.

Cajaraville, M. P.; Bebianno, M. J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, v. 247, p. 295-311, 2000.

Capiotti, K. M.; Antonioli Jr. R.; Kist, L. W.; Bogo, M. R.; Bonan, C. D.; Da Silva, R. S. Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, v. 171, p. 58-65, 2014.

Carrasco, K. R.; Tilbury, K. L.; Myers, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Ottawa, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

Castagnolli, N. *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: Funep, 1992.

Castaño, A.; Carbonell, G.; Carballo, M.; Fernandez, C.; Boleas, S.; Tarazona, J. V. Sublethal Effects of Repeated Intraperitoneal Cadmium Injections on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 41, p. 29-35, 1998.

Çavas, T.; Ergene-Gözükara, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*, v. 74, p. 264-271, 2005.

Çavas, T.; Ergene-Gözükara, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*, v. 538, p. 81-91, 2003.

Çavas, T.; Garanko, N. N.; Arkhipchuk, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology*, v. 43, p. 569-574, 2005.

Çavas, T.; Könen. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology*, v. 90, p.154-159, 2008.

Celik, A.; Unyayar, S.; Cekiç, F.O.; Güzel, A. Micronucleus frequency and lipid peroxidation in *Allium sativum* root tip cells treated with gibberellic acid and cadmium. *Cell Biology Toxicology*, v. 24, n. 2, p. 59-64, 2007.

Chowdhury, M. J.; Baldisserotto, B.; Wood, C. M. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to water-borne or dietary cadmium, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 48, p. 381-390, 2005.

Chowdhry, S.; Zhang, Y.; McMahon M, Sutherland, C.; Cuadrado A.; Hayes J. D. Nrf2 is controlled by two distinct b-TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene*, v. 32, p.3765-3781, 2013.

Costa, P. M.; Costa, M. H. Genotoxicity assessment in fish peripheral blood: a method for a more efficient analysis of micronuclei. *Journal of Fish Biology*, v. 71, p.148-151, 2007.

Costa, P. M.; Neuparth, T. S.; Caeiro, S.; Lobo, J.; Martins, M.; Ferreira, M.; Caetano, M.; Vale, C.; Delvals, T.; Costa, M. H. Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus in situ studies. *Environmental Research*, v. 111 p. 25-36, 2011.

Darzynkiewicz, Z. S.; Bruno, S.; Del Bino, G.; Gorczyca, W.; M.A. Hotz, M. A.; Lassota, P.; Traganos, F. Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. *Cytometry*, v. 13, p. 795-808, 1992.

Deichmann, U. Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. *Developmental Biology*, v. 416, p. 249-254, 2016.

Delaporte, M.; McKenna, P.; Siah, A.; Berthe, F. C. J. Immunophenotyping of *Mya arenaria* neoplastic hemocytes using propidium iodide and a specific monoclonal antibody by flow cytometry. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 99, p. 120-122, 2008.

Etesin, M. U.; Benson, N. U. Cadmium, copper, lead and zinc tissue levels in Bonga Shad (*Ethmalosa fimbriata*) and Tilapia (*Tilapia guineenses*) caught from Imo River, Nigeria. *American Journal of Food Technology*, v. 2, p. 48-54, 2007.

Evans, D. H. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspective*, v. 71, p. 47-58, 1987.

Fenech, M.; Crott, J.; Turner, J.; Brown, S. Necrosis, apoptosis, cytotaxis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, v. 14, p. 605-612, 1999.

Filipič. M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutation Research*, 2011.

Fontainhas-Fernandes A. A. Tilapia production, in: M.A. Reis-Henriques (Ed.), *Aquaculture Handbook*, 1998, pp. 135-150.

Giaginis, C.; Gatzidou, E.; Theocharis, S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 213, p. 282-290, 2006.

Giunta, S.; Belotserkovskaya, R.; Jackson, S. P. DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *Journal Cell Biology*, v. 190, p. 197-207, 2010.

Goering, P. L.; Waalkes, M. P.; Klaasen, C. D. Toxicology of cadmium. In: *Toxicology of metals: Biochemical aspects*. Berlin: Springer. p. 189-214, 1995.

Gomes, J. M. M., Ribeiro, H. J., Procópio, M. S., Alvarenga, B. M.; Castro, A. C. S.; Dutra, W. O.; Silva, J. B. B.; Corrêa Junior, J. D. What the erythrocytic nuclear alteration frequencies could tell us about genotoxicity and macrophage iron storage? *PlosOne*, v.11, e0143029, 2015.

Grisolia, C. K.; Rivero, C. L. G.; Starling, F. L. R. M.; Silva, I. C. R.; Barbosa, A. C.; Dorea, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, p. 138-143, 2009.

Gusso-Choueri, P. K.; Choueri, R. B.; Santos, G. S.; Araújo, G. S.; Cruz, A. C. F.; Stremel, T.; Campos, M. X.; Cestari, M. M.; Ribeiro, C. A. O.; Abessa, D. M. S. Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. *Marine Pollution Bulletin*, v. 104, p. 220-239, 2016.

Harabawy, A. S. A., Mosleh, Y. Y. I. The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.104, p. 28-35, 2014.

Haridas, V.; Ranjbar, S.; Vorobjev, I. A.; Goldfeld, A. E.; Barteneva, N. S. Imaging flow cytometry analysis of intracellular pathogens. *Methods*, 2016.

Hayashi, C.; Boscolo, W. R.; Soares, C. M. Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. *Acta Scientiarum*, v. 21, p. 733-737, 1999.

Helt, C. E.; Cliby, W. A.; Keng, P. C.; Bambara, R. A.; O'Reilly, M. A. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit

selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *Journal of Biological and Chemical*, v. 280, p.1186-1192, 2005.

Herceg, Z.; Vaissiere, T. Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics*, v. 6, p. 804-819, 2011.

Hong, S. K.; Pusapati, R. V.; Powers, J. T.; Johnson, D. G. Oncogenes and the DNA damage response-Myc and E2F1 engage the ATM signaling pathway to activate 53 and induce apoptosis. *Cell Cycle*, v. 5, p. 801-803, 2006.

Howe, K.; Clark, M. D.; Torroja, C. F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J. E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; McLaren, S.; Sealy, I.; Caccamo, M.; Churcher, C.; Scott, C.; Barrett, J. C.; Koch, R.; Rauch, G.; White, S.; Chow, W.; Kilian, B.; Quintais, L. T.; Guerra-Assunção, J. A.; Zhou, Y.; Gu, Y.; Yen, J.; Vogel, J.; Eyre, T.; Redmond, S.; Banerjee, R.; Chi, J.; Fu, B.; Langley, E.; Maguire, S. F.; Laird, G. K.; Lloyd, D.; Kenyon, E.; Donaldson, S.; Sehra, H.; Almeida-King, J.; Loveland, J.; Trevanion, S.; Jones, M.; Quail, M.; Willey, D.; Hunt, A.; Burton, J.; Sims, S.; McLay, K.; Plumb, B.; Davis, J.; Clee, C.; Oliver, K.; Clark, R.; Riddle, C.; Elliott, D.; Threadgold, G.; Harden, G.; Ware, D.; Begum, S.; Mortimore, B.; Kerry, G.; Heath, P.; Phillimore, B.; Tracey, A.; Corby, N.; Dunn, M.; Johnson, C.; Wood, J.; Clark, S.; Pelan, S.; Griffiths, G.; Smith, M.; Glithero, R.; Howden, P.; Barker, N.; Lloyd, C.; Stevens, C.; Harley, J.; Holt, K.; Panagiotidis, G.; Lovell, J.; Beasley, H.; Henderson, C.; Gordon, D.; Auger, K.; Wright, D.; Collins, J.; Raisin, C.; Dyer, L.; Leung, K.; Robertson, L.; Ambridge, K.; Leongamornlert, D.; McGuire, S.; Gilderthorp, R.; Griffiths, C.; Manthavadi, D.; Nichol, S.; Barker, G.; Whitehead, S.; Kay, M.; Brown, J.; Murnane, C.; Gray, E.; Humphries, M.; Sycamore, N.; Barker, D.; Saunders, D.; Wallis, J.; Babbage, A.; Hammond, S.; Mashreghi-Mohammadi, M.; Barr, L.; Martin, S.; Wray, P.; Ellington, A.; Matthews, N.; Ellwood, M.; Woodmansey, R.; Clark, G.; Cooper, J.; Tromans, A.; Grafham, D.; Skuce, C.; Pandian, R.; Andrews, R.; Harrison, E.; Kimberley, A.; Garnett, J.; Fosker, N.; Hall, R.; Garner, P.; Kelly, D.; Bird, C.; Palmer, S.; Gehring, I.; Berger, A.; Dooley, C. M.; Ersan-Ürün, Z.; Eser, C.; Geiger, H.; Geisler, M.; Karotki, L.; Kirn, A.; Konantz, J.;

Konantz, A.; Oberländer, M.; Rudolph-Geiger, S.; Teucke, M.; Lanz, C.; Raddatz, G.; Osoegawa, K.; Zhu, B.; Rapp, A.; Widaa, S.; Langford, C.; Yang, F.; Schuster, S.; Carter, N.; Harrow, J.; Ning, Z.; Herrero, J.; Searle, S.; Enright, A.; Geisler, R.; Plasterk, R. H. A.; Lee, C.; Westerfield, M.; Jong, P. J.; Zon, L. I.; Postlethwait, J. H.; Nüsslein-Volhard, C.; Hubbard, T. J. P.; Crollius, H. R.; Rogers, J.; Stemple, D. L. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v.496, p. 498-503, 2013.

Inoue, T.; Moritomo, T.; Tamura, Y.; Mamiya, S.; Fujino, H.; Nakanishi, T. A new method for fish leucocyte counting and partial differentiation by flow cytometry. *Fish Shellfish Immunology*, v. 13, p. 379-390, 2002.

Ishii, T.; Itoh, K.; Ruiz, E.; Leake, D. S.; Unoki, H.; Yamamoto, M.; Mann, G. E. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circulation Research*, v. 94, p. 609-616, 2004.

Ito, T.; Murata, H.; Tsuda, T.; Yamada, T.; Yamaguchi, K.; Ukawa, M.; Yamaguchi, T.; Yoshida, T.; Sakai, T. Effects of α -tocopherol levels in extrusion pellets on in vivo lipid peroxidation levels and antioxidant activities in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* injected with the causative bacteria of fish jaundice. *Fish Science Journal*, v. 65, p. 679-683, 1999.

Ito, T.; Kera, A.; Murata, H.; Yoshida, T.; Sasaki, T.; Yamauchi, K.; Yamasaki, Y.; Yamaguchi, T.; Ukawa, M. Experimentally induced bacterial hemolytic jaundice of yellowtail and oxidative stress. *Nippon Suisan Gakkaishi*, v. 66, p. 50-54, 2000.

Jensen, A.; Bro-Rasiriussen, F. Environmental cadmium in Europe. *Environmental Contamination Toxicology*, v. 125, p. 101-181, 1992.

Jorgensen, S. E. Handbook of ecological models used in ecosystem and environmental management. Denmark: Copenhagen University; 2011.

Joseph, P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 238, p. 272-279, 2009.

Jurczuk, M.; Brzoska, M. M.; Moniuszko-Jakoniuk, J.; Galazyn- Sidorczuk, M.; Kulikowska-Karpinska, E. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chemical and Toxicology*, v. 42, p. 429-438, 2004.

Kaewsritthong, J.; Ushio, H.; Ohshima, T. Seasonal variation of phosphatidylcholine hydroperoxides in blood of sweet smelt *Plecoglossus altivelis*. *Comparative Biochemistry Physiology*, v. 130, p. 33-42, 2001.

Karmakar, R.; Banerjee, A.; Datta, S.; Chatterjee, M.; Influence of cadmium intoxication on hepatic lipid peroxidation, glutathione level, and glutathione S-transferase and gamma glutamyl transpeptidase activities: correlation with chromosome aberrations in bone marrow cells. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, v. 18, p. 277-287, 1999.

Katsuoka, F.; Motohashi, H.; Ishii, T.; Aburatani, H.; Engel, J.D.; Yamamoto, M. Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element dependent genes. *Molecular and Cellular Biology*, v. 25, p. 8044-8051, 2005.

Keen, J. E.; Streele, A. M.; Houston, A. H. The circulating erythrocytes of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 94, p. 699-711, 1989.

Klimowicz-Bodys, M. D.; Batkowski, F.; Ochrem, A. S.; Savič M. A. Comparison of assessment of pigeon sperm viability by contrast-phase microscope (eosin-nigrosin staining) and flow cytometry (SYBR-14/propidium iodide (PI) staining) [evaluation of pigeon sperm viability]. *Theriogenology*, v. 77, p. 628-635, 2011.

Kruiswijk, F.; Labuschagne, C. F.; Vousden, K. H. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature Reviews*, v. 16, p. 393-405, 2015.

Kwak, M. K.; Egner, P. A.; Dolan, P. M. Ramos-Gomez, M.; Groopman, J. D.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W. Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones. *Mutation Research*, v. 480-481, p. 305-315, 2001.

Lane, H. C.; Weaver, J. W.; Benson, J. A.; Nichols, H. A. Some age related changes of adult rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich peripheral erythrocytes separated by velocity sedimentation at unit gravity. *Journal and Fish Biology*, v. 21, p. 1-13, 1982.

Lane, H. Nucleoside triphosphate changes during the peripheral lifespan of erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Experimental Zoology*, v. 231, p. 57-62, 1984.

Langenau, D. M.; Zon, L. I. The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development. *Nature Immunology*, v. 5, p. 307-317, 2005.

Le, M. T.; Hassanin, M.; Mahadeo, M.; Gailer, J.; Prenner, E. J. Hg- and Cd-induced modulation of lipid packing and monolayer fluidity in biomimetic erythrocyte model systems. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.171, p. 46-54, 2013.

Lee, J-Y.; Tokumoto, M.; Hattori, Y.; Fujiwara, Y.; Shimada, A.; Satoh, M. Different regulation of p53 expression by cadmium exposure in kidney, liver, intestine, vasculature, and brain astrocytes. *Toxicology Research*, v. 32, p. 73-80, 2016.

Lim, C.; Webster, C. D. *Tilapia: Biology, Culture and Nutrition*. Editora The Haworth Press, Binghamton, NY, 681p. 2006.

Lund, S. G.; Phillips, M. C.; Moyes, C. D.; Tufts, B. L. The effects of cell ageing on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *Journal of Experimental Biology*, v. 203, p. 1039-1045, 2000.

MacRae, C. A.; Peterson, R. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, p. 721-731 2015.

Mahrous, K. F.; Hassan, A. M.; Radwan, H. A.; Mahmoud, M. A. Inhibition of cadmium - induced genotoxicity and histopathological changes in Nile tilapia fish by Egyptian and Tunisian montmorillonite clay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 119, p. 140-147, 2015

Mai, W.; Yan, J.; Wang, L.; Zheng, Y.; Xin, Y.; Wang, W. Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells. *Aquatic Toxicology*, v. 100, p. 271-281, 2010.

Mathew, S.; Johansson, P.; Gao, Y.; Fath, A.; Ek, T.; Hammarsten, O. A flow cytometry assay that measures cellular sensitivity to DNA-damaging agents, customized for clinical routine laboratories. *Clinical Biochemistry*, v. 49, p. 566-572, 2016.

McMahon, M.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Hayes, J. D. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 21592-21600, 2003.

Meplan, C.; Mann, K.; Hainaut, P. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *Journal Biological Chemistry*, v.274, p. 31663-31670, 1999.

Nagasaka, R.; Okamoto, N.; Ushio, H. Partial oxidative-stress perturbs membrane permeability and fluidity of fish nucleated red blood cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 139, p. 259-266, 2004.

Nakamura, A. J.; Ashutosh Rao, V.; Pommier, Y.; Bonner, W. M. The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, v. 9:2, p. 389-397, 2010.

Nowicka, A.; Sliwinska, E.; Grzebelus, D.; Baranski, R.; Simon, P. W.; Nothnagel, T.; Grzebelus, E. Nuclear DNA content variation within the genus *Daucus* (Apiaceae) determined by flow cytometry. *Scientia Horticulturae*, v. 209, p. 132-138, 2016.

Osman, A.; Ali, E.; Hashem, M.; Mostafa, M.; Mekkawy, I. Genotoxicity of two pathogenic strains of zoosporic fungi (*Achlya klebsiana* and *Aphanomyces laevis*) on erythrocytes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, p. 24-31, 2010.

Pachecco, M.; Santos, M.A. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L., *Ecotoxicology and Environment. Safety*, v. 40, p. 71-76, 1998.

Paull, T. T.; Rogakou, E. P.; Yamazaki, V.; Kirchgessner, C. U.; Gellert, M.; Bonner, W. M. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, v. 10, p. 886-895, 2000.

Paul, S.; Kim, S. J.; Park, H. W.; Lee, S. Y.; An, Y. R.; Oh, M. J.; Jung, J. W.; Ryu, J. C.; Hwang, S. Y. Impact of miRNA deregulation on mRNA expression profiles in response to environmental toxicant, nonylphenol. *Molecular and Cellular Toxicology*, v. 7, p. 259-69, 2011.

Pereira, S.; Cavaliea, I.; Camilleria, V.; Gilbinb, R.; Adam-Guillermina, C. Comparative genotoxicity of aluminium and cadmium in embryonic zebrafish cells. *Mutation Research*, v. 750, p. 19-26, 2013.

Pettersen, E. F.; Jerknes, R. B.; Wergeland, H. I. Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry. *Fish Shellfish Immunology*, v. 10, p. 695-710, 2000.

Phillips, M. C. L.; Moyes, C. D.; Tufts, B. L. The effect of cell aging on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *Journal of Experimental Biology*, v. 203, p. 1039-1045, 2000.

Pietsch, E. C.; Chan, J. Y.; Torti, F. M.; Torti, S. V. Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 278, p 2361-2369, 2003.

Qu, R.; Wang, X.; Wang, Z.; Wei, Z.; Wang, L. Metal accumulation and antioxidant defenses in the freshwater fish *Carassius auratus* in response to single and combined exposure to cadmium and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials*, v. 275, p. 89-98, 2014.

Rani, R.; Li, J.; Pang, Q. S. Differential p53 engagement in response to oxidative and oncogenic stresses in Fanconi anemia mice. *Cancer Research*, v. 68, p. 9693-9702, 2008.

Rocha, P. S.; Luvizotto, G. L.; Kosmehl, T.; Bottcher, M.; Storch, V.; Braunbeck, T.; Hollert, H. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, p. 1842-1848, 2009.

Rothkamm, K.; Lobrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses, *Proceedings of the national Academy of Sciences of United State of America*, v. 100, p. 5057-5062, 2003.

Sadiqul, I. M.; Ferdous, Z.; Nannu, M. T. A.; Mostakim, G. M.; Rahman, M. K. Acute exposure to a quinalphos containing insecticide (convoy) causes genetic damage and nuclear changes in peripheral erythrocytes of silver barb, *Barbonymus gonionotus*. *Environmental Pollution*, v. 16, p. 31403-31408, 2016.

Saha, N. R.; Usami, T.; Suzuki, Y. A double staining flow cytometric assay for the detection of steroid induced apoptotic leucocytes in common carp (*Cyprinus carpio*). *Developmental and Comparative Immunology*, v. 27, p. 351-363, 2003.

Sakai, T.; Murata, H.; Endo, M.; Yamauchi, K.; Tabata, N.; Fukudome, M. 2-Thiobarbituric acid values and contents of a-tocopherol and bile pigments in the liver and muscle of jaundiced yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 53, p. 1739-1740, 1989.

Sandstrom, K.; Hakansson, L.; Lukinius, A.; Vengea, P. A method to study apoptosis in eosinophils by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, v. 240, p. 55-68, 2000.

Sayed, A. E-D. H.; Oda, S.; Mitani, H. Nuclear and cytoplasmic changes in erythrocytes of p53-deficient medaka fish (*Oryzias latipes*) after exposure to gamma-radiation. *Mutation Research*, v. 771, p. 64-70, 2014.

Sayed, A. E. H.; Watanabe-Asaka, T.; Oda, S.; Mitani, H. Apoptosis and morphological alterations after UVA irradiation in red blood cells of p53 deficient Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, v. 161, p. 1-8, 2016.

Schalie, W. H.; Gardner Jr, H. S.; Bantle, J. A.; De Rosa, C. T.; Finch, R. A.; Reif, J. S.; Reuter, R. H.; Backer, L. C.; Burger, J.; Folmar, L. C.; Stokes, W. S. Animals

as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives*, v. 107, p. 309-315, 1999.

Schroeder, T. M. *Investigation of bone marrow smears*, in: Vogel, F.; Rhrborn, G. (Eds.) *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*, Springer, Freiburg, p. 214-219, 1970.

Slater, T. F. Lipid peroxidation. *Biochemical Society Transection*, v. 10, p. 70-71, 1982.

Souza T. S.; Fontanetti, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research*, v. 605, p. 87-93, 2006.

Summak, S.; Aydemir, N. C.; Vatan, O.; Yilmaz, D.; Zorlu, T.; Bilaloğlu, R. Evaluation of genotoxicity from Nilufer Stream (Bursa/Turkey) water using piscine micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 2443-2447, 2010.

Suzuki, M.; Otsuki, A.; Keleku-Lukwete, N.; Yamamoto, M. Overview of redox regulation by Keap1-Nrf2 system in toxicology and cancer. *Current Opinion in Toxicology*, v.1, p. 29-36, 2016.

Talapatra, S. N.; Dasgupta, S.; Guha, G.; Auddy, M.; Mukhopadhyay, A. Therapeutic efficacies of *Coriandrum sativum* aqueous extract against metronidazole-induced genotoxicity in *Channa punctatus* peripheral erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 3458-3461, 2010.

Thirman, M. J.; Gill, H. J.; Burnett, R. C.; Mbangkollo, D.; McCabe, N. R.; Kobayashi, H.; Poel, S. Z.; Kanero, Y.; Morgan, R.; Sandberg, A. A.; Chaganti, R. S. K.; Larson, R. A.; Beau, M. M. L.; Diaz, M. O.; Rowley, J. D. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *The New England Journal of Medicine*, v. 329, p. 909-914, 1993.

Tiano, L.; Ballarini, P.; Santoni, G.; Wozniak, M.; Falcioni, G. Morphological and functional changes in mitochondria from density separated trout erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1457, p. 118-128, 2000.

Tiano, L.; Fedeli, D.; Ballarini, P.; Santoni, G.; Falcioni, G. Mitochondrial membrane potential in density-separated trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1505, p. 226-237, 2001.

Tolbert, P. E.; Shy, C. M.; Allen, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuffs users. *American Journal Epidemiology*, v. 134, p. 840-850, 1991.

Traver, D.; Paw, B. H.; Poss, K. D.; Penberthy, T. W.; Lin, S.; Zon, L. I. Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nature Immunology*, v. 4, p. 1238-1246, 2003.

Uchida, M.; Teranishi, H.; Aoshima, K.; Katoh, T.; Kasuya, M.; Inadera, H. Reduction of erythrocyte catalase and superoxide dismutase activities in male inhabitants of a cadmium-polluted area in Jinzu river basin, Japan. *Toxicology Letters*, v. 151, p. 451-457, 2004.

Utani, K.; Okamoto, A.; Shimizu, N. Generation of micronuclei during interphase by coupling between cytoplasmic membrane blebbing and nuclear budding. *PlosOne*, v. 6, e27233, 2011.

Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *Journal of Immunology Methods*, v. 184, p. 39-51, 1995.

Vijayan, M. M.; Morgan, J. D.; Sakamoto, T.; Grau, E. G.; Iwama, G. K. Food deprivation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. *Journal of Experimental Biology*, v. 199, p. 2467-2475, 1996.

Waisberg, M.; Joseph, P.; Hale, B.; Beyersmann, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, v. 192, p. 95-117, 2003.

Wang, I.; Gallagher, E. P. Role of Nrf2 antioxidant defense in mitigating cadmium-induced oxidative stress in the olfactory system of zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 266, p. 177-186, 2013.

Wright, D. A.; Welbourn, P. M. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environmental*, v. 2, p.187-214, 1994.

Wu, S. M.; Shih, M. J.; Ho, Y. C. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 145, p. 218-226, 2007.

Xi, X.; Zhi-ying, H.; Ying-xu, C.; Xin-qiang, L.; Hua, L.; Yi-chao, Q. Optimization of FDA-PI method using flow cytometry to measure metabolic activity of the cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa*. *Physics and Chemistry of the Earth*, v. 36, p. 424-429, 2011.

Xie, J.; Shaikh, Z. A. Cadmium induces cell cycle arrest in rat kidney epithelial cells in G2/M phase. *Toxicology*, v. 224, p. 56-65, 2006.

Xu, B.; Sun, Z.; Liu, Z.; Guo, H.; Liu, Q.; Jiang, H.; Zou, Y.; Gong, Y.; Tischfield, J. A.; Shao, C. Replication stress induces micronuclei comprising of aggregated DNA double-strand breaks. *Plos One*, v. 6, e18618, 2011.

Yang, P. M.; Chiu, S. J.; Lin, K. A.; Lina, L. Y. Effect of cadmium on cell cycle progression in Chinese hamster ovary cells. *Chemico-Biological Interactions*, v. 149, p. 125-136, 2004.

Yano, C. L.; Marcondes, M. C. Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro. *Free Radical Biological & Medicine*, v. 39, p. 1378-1384, 2005.

Zakaria, Y.; Rahmat, A.; Pihie, A. H. L.; Abdullah, N. R.; Houghton, P. J. Eurycomanone induce apoptosis in HepG2 cells via up-regulation of p53. *Cancer Cell International*, v. 9, p. 9-16, 2009.

Zheng, J. L.; Yuan, S. S.; Wu, C. W.; Ming Lv, Z. Acute exposure to waterborne cadmium induced oxidative stress and immunotoxicity in the brain, ovary and liver of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, v. 180, p. 36-44, 2016.

ANEXO 1 – Artigo submetido

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of
Hazardous Materials
Manuscript Draft

Manuscript Number: HAZMAT-D-16-04972

Title: A recently development of new powerful solubilizing agent:
application to the determination of cadmium in aquarium water, blood and
head kidney of fishes by GF AAS

Article Type: Research Paper

Keywords: Powerful solubilizing agent, Universol, cadmium, GF AAS, blood
fish

Corresponding Author: Professor. JOSE BENTO BORBA SILVA, Ph.D

Corresponding Author's Institution: FEDERAL UNIVERSITY OF MINAS GERAIS

First Author: JOSE BENTO BORBA SILVA, Ph.D

Order of Authors: JOSE BENTO BORBA SILVA, Ph.D; JULIANA MOREIRA M GOMES,
MsC; Mark A Beinner, Ph.D; Cláudio L Donnici, Ph.D; José D Correa Júnior,
Ph.D

Abstract: In this work, whole blood fish (60µL) and head kidney fish (2.0 mg) were solubilized immediately with 60µL of benzyltrimethylammonium hydroxide (40 wt. % solution in water) (called Universol®) and 200 µL of Universol®, respectively. The solubilization is immediately without any other treatment. After this, an indefinitely stable and homogeneous solution is formed. Aquarium water "in natura", whole blood and head kidney fish, were analyzed for its Cd content. The characteristic masses were 1.2 ± 0.2 ; 1.2 ± 0.6 and 1.4 ± 0.5 pg for aquarium water, whole blood and head kidney fish (1.0 pg is recommended for Cd standard solution), respectively. For water, no matrix effect was observed. Therefore, calibration can be accomplished with external calibration. As a result of the matrix effect for whole blood and head kidney, the calibration was made by matrix matching. Analyzing eight certified reference materials, the results were in good agreement for all materials (95 % confidence level). Universol® is a promising reagent as it allows very quickly solubilization of a large and varied number of samples as cranial kidney and blood without any other treatment.

ANEXO 2 – Certificado CEUA**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 39 / 2016, relativo ao projeto intitulado “Estudo do estresse oxidativo e das expressões de p21 e p53 na genotoxicidade induzidos por cádmio em tilápias”, que tem como responsável JOSE DIAS CORREA JR, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 17/05/2016. Este certificado espira-se em 17/05/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 39 / 2016, related to the Project entitled “Study of oxidative stress and the expression of p21 and p53 in the genotoxicity induced by cadmium in Tilapia”, under the supervision of JOSE DIAS CORREA JR, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 17/05/2016. This certificates expires in 17/05/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 17/05/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br