



MARIA VITÓRIA TAKEMURA MARIANO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE INDUZIDA POR SULFATO DE COBRE EM
LARVAS DE PEIXE-ZEBRA**

**São Gabriel
2023**

MARIA VITÓRIA TAKEMURA MARIANO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE INDUZIDA POR SULFATO DE COBRE EM
LARVAS DE PEIXE-ZEBRA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biotecnologia
da Universidade Federal do Pampa,
como requisito parcial para obtenção do
Título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Jeferson Luis Franco

Coorientador: Luana Paganotto Leandro

**São Gabriel
2023**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

M332a Mariano, Maria Vitória Takemura
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE INDUZIDA POR SULFATO DE COBRE EM
LARVAS DE PEIXE-ZEBRA / Maria Vitória Takemura Mariano.
43 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, BIOTECNOLOGIA, 2023.

"Orientação: JEFERSON LUIS FRANCO".

1. METAIS PESADOS. 2. COBRE. 3. ESTRESSE OXIDATIVO. 4.
ECOTOXICOLOGIA. 5. PEIXE-ZEBRA. I. Título.

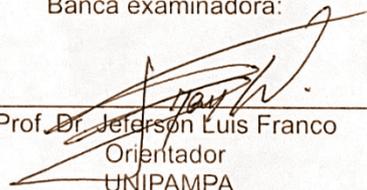
MARIA VITÓRIA TAKEMURA MARIANO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE INDUZIDA POR SULFATO DE COBRE EM
LARVAS DE PEIXE-ZEBRA**

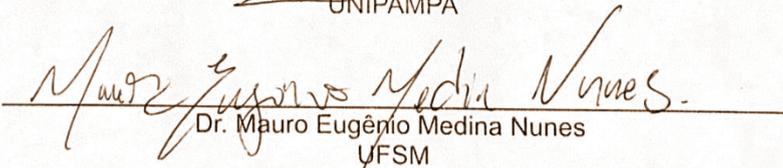
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biotecnologia
da Universidade Federal do Pampa,
como requisito parcial para obtenção do
Título de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 03/02/2023.

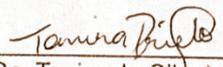
Banca examinadora:



Prof. Dr. Jeferson Luis Franco
Orientador
UNIPAMPA



Dr. Mauro Eugênio Medina Nunes
UFSC



B. Sc. Tanira da Silveira Prieto
UNIPAMPA

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer ao Universo, pelo caminho que a mim estava guardado e que através de diversas escolhas, me fizeram chegar até aqui.

À minha família por compreender minhas ausências e sempre me apoiarem de longe. Obrigada papai, por nunca medir esforços para a minha educação, por entender o quanto isso é importante para mim. Se hoje estou onde estou, tenha certeza que foi por toda sua dedicação a minha formação. Obrigada mamãe, por todos os conselhos e amparos nos momentos mais difíceis no início da faculdade, por cada ligação e por me fazer acreditar mais em mim mesma.

A pessoa que fez meus dias na faculdade serem incríveis, obrigada Susi. Tu não sabe quanto sou grata em ter te conhecido. Obrigada por ser minha irmã de alma, minha parceira, meu maior exemplo de ser humano genuinamente bom. Tenho certeza absoluta de que tu foi uma das melhores pessoas que já conheci nesse mundo. Colher pitangas nunca mais será a mesma coisa sem tua companhia.

Ao Vitor, por sempre me guiar por um caminho de paz e tranquilidade. Por me ensinar o equilíbrio da vida, obrigada por cada abraço em meio às turbulências da vida acadêmica. Obrigada por todos os momentos compartilhados, tu é incrível e essencial para mim, tu foi e é, minha família.

As minhas queridas amigas Aline, Kellyn e Ana pelos momentos bons desfrutados durante esses anos. Sou extremamente grata pelas risadas mais sinceras, vocês são extremamente especiais para mim.

A Sara Bohi, pelo tempo que trabalhamos juntas, jamais esquecerei de tudo o que fez por mim. Obrigada pela tamanha atenção e calma ao me inserir em uma rotina de laboratório e além de tudo, por acreditar no meu potencial e ser minha amiga também. Aos meus colegas de laboratório, Layla, Pedro, Luisa e, especialmente a Jacy, Luana e Karen, obrigada por sempre estarem dispostas a me ajudar além do grande laço de amizade que formamos.

Agradeço principalmente ao meu orientador, Prof. Dr. Jeferson Luis Franco e a Prof^a Dr^a Thaís Posser por me acolherem no GPEOSCEL. Obrigada por me instigarem a ser cientista e por todo conhecimento passado. Obrigada a cada professor que fizeram parte da minha trajetória acadêmica.

A UNIPAMPA pela oportunidade de cursar Biotecnologia, pelo ensino superior de qualidade e à FAPERGS pela bolsa de iniciação científica.

"A vida não é fácil para nenhum de nós, mas isso não importa. O que importa é preservar e, acima de tudo, ter confiança em si mesmo. É preciso sentir confiança para fazer algo e alcançar os objetivos, custe o que custar." Marie Curie

RESUMO

O cobre é um metal naturalmente encontrado em diferentes compartimentos ambientais. Além disso, é um micronutriente importante para o metabolismo dos organismos vivos. Concentrações deste metal são fortemente influenciadas por atividades industriais e agrícolas, em razão das suas propriedades biocidas. No Brasil, a concentração máxima de cobre permitida em água potável é de 2 mg/L. No entanto, a contaminação ambiental por esse metal representa um sério problema ambiental, além de ser um risco à saúde humana. Em razão da sua propriedade química em adotar estados redox distintos, um dos mecanismos de toxicidade propostos é o estresse oxidativo. Organismos aquáticos são mais susceptíveis a contaminação por metais pesados, como o cobre, o qual tem sido associado a danos fisiológicos às espécies expostas. O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um organismo modelo que se destaca em diversos campos da ciência, principalmente na toxicologia de contaminantes ambientais. Nesta perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo investigar a toxicidade induzida por sulfato de cobre (CuSO_4) em larvas de peixe-zebra avaliando concentrações ambientalmente relevantes, para o avanço no conhecimento sobre alvos bioquímicos prejudicados. Larvas de peixe-zebra com 72 horas pós-fertilização (hpf) foram expostas ao CuSO_4 nas concentrações de 1, 2 e 10 μM . A toxicidade do composto foi avaliada em 96 hpf através de parâmetros morfológicos, comportamentais e bioquímicos. Os resultados obtidos demonstraram que o CuSO_4 prejudicou a sobrevivência das larvas de maneira dose-dependente, além de comprometer o desenvolvimento padrão, considerando o comprimento corporal, absorção do saco vitelínico e inflamação da bexiga natatória. Através dos ensaios comportamentais, o CuSO_4 inferiu danos à resposta motora de escape e a capacidade natatória. Além disso, parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo demonstraram que o composto aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) ao mesmo tempo que diminuiu os níveis de tióis não proteicos (NPSH) e comprometeu a viabilidade celular das larvas expostas. Dessa forma, CuSO_4 , ainda que em concentrações permitidas na legislação, foi capaz de alterar parâmetros bioquímicos e comportamentais, além de prejudicar o desenvolvimento larval. Assim, reforçando a hipótese do envolvimento do estresse oxidativo na toxicidade induzida pelo CuSO_4 .

Palavras-chave: *Danio rerio*; estresse oxidativo; metais pesados; desenvolvimento; CuSO_4 .

ABSTRACT

Copper is a metal naturally found in different environmental compartments. Furthermore, it is an important micronutrient for the metabolism of organisms. Concentrations of this metal are strongly influenced by industrial and agricultural activities, due to its biocidal properties. In Brazil, the maximum concentration of copper allowed in potable water is 2 mg/L. However, environmental contamination by this metal represents a serious environmental problem, in addition to being a risk to human health. Due to its chemical property of adopting distinct redox status, one of the proposed toxicity mechanisms is oxidative stress. Aquatic organisms are more susceptible to contamination by heavy metals, such as copper, which has been associated with physiological damage to exposed species. The zebrafish (*Danio rerio*) is a model organism that stands out in several fields of science, mainly in the toxicology of environmental contaminants. In this perspective, the present work aimed to investigate the toxicity induced by copper sulfate (CuSO_4) in zebrafish larvae, evaluating environmentally relevant concentrations, to advance knowledge about impaired biochemical targets. Zebrafish larvae at 72 hours post-fertilization (hpf) were exposed to CuSO_4 at concentrations of 1, 2 and 10 μM . The compound toxicity was evaluated in 96 hpf through morphological, behavioral and biochemical parameters. The results showed that CuSO_4 impaired larval survival in a dose-dependent and compromising standard development, considering body length, yolk sac absorption and swim bladder inflammation. Through behavioral tests, CuSO_4 inferred damage to motor escape response and swimming capacity. Biochemical parameters of oxidative stress showed that the compound increased the levels of reactive oxygen species (ROS) while decreasing the levels of non-protein thiols (NPSH) and compromised the cell viability of the exposed larvae. Thus, CuSO_4 , even in concentrations permitted by law, was able to change biochemical and behavioral parameters, in addition to impairing larval development. Thus, reinforcing the hypothesis of the involvement of oxidative stress in the toxicity induced by CuSO_4 .

Keywords: *Danio rerio*; oxidative stress; heavy metals; development; CuSO_4 .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reações de Fenton e Haber-Weiss para a formação do radical hidroxila.....	15
Figura 2 – Sistema de defesa antioxidante enzimático representada pela superóxido dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPx), Catalase e o ciclo metabólico da glutathione na eliminação de ERO.....	18
Figura 3 – Peixe-zebra adulto.....	19
Figura 4 – Estágios de desenvolvimento do peixe-zebra.....	20
Figura 5 – Delineamento experimental. Períodos de exposição ao CuSO_4	24
Figura 6 – Larva de peixe-zebra (controle) em 96 hpf para análises morfométricas.....	25
Figura 7 – Curva de sobrevivência de larvas de peixe-zebra expostas a diferentes concentrações de CuSO_4 no período de 24 horas.....	28
Figura 8 – Análises morfométricas de larvas expostas ao CuSO_4	29
Figura 9 – Avaliação de parâmetros comportamentais.....	31
Figura 10 – Efeitos do CuSO_4 sobre a produção de ERO em larvas de peixe-zebra.....	31
Figura 11 – Avaliação nos níveis de tióis não proteicos (NPSH) em larvas expostas ao CuSO_4	32
Figura 12 – Avaliação da viabilidade celular <i>in vivo</i> de larvas de peixe-zebra expostas ao CuSO_4	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cu – cobre

Cu⁺ – cobre reduzido, cuproso

Cu⁺² – cobre oxidado, cúprico

CuSO₄ – sulfato de cobre

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

OH[•] – radical hidroxila

NO - óxido nítrico

ONOO⁻ - peroxinitrito

ATP – adenosina trifosfato

O₂ – oxigênio molecular

O₂⁻ – Radical ânion superóxido

ERO – Espécie reativa de oxigênio

DNA – ácido desoxirribonucleico

SOD – superóxido dismutase

H₂O – água

GPx – glutathione peroxidase

GSSG – glutathione oxidada

GSH – glutathione reduzida

GST – glutathione-s-transferase

hpf – horas pós fertilização

dpf – dias pós fertilização

PCA – ácido perclórico

NPSH – tióis não proteicos

μM – micromolar

mM – milimolar

μL – microlitros

ml – mililitros

mm – milímetros

mm² – milímetros ao quadrado

nm – nanômetros

° C – grau celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Metais pesados.....	13
1.2	Cobre e contaminação ambiental.....	13
1.3	Mecanismos de toxicidade.....	14
	1.3.1 Estresse Oxidativo	14
	1.3.2 Inflamação.....	16
1.4	Sistemas Antioxidantes.....	17
1.5	Peixe-zebra como organismo modelo em estudos	18
2	JUSTIFICATIVA.....	22
3	OBJETIVO.....	23
	3.1 Objetivo Geral.....	23
	3.2 Objetivos específicos	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
	4.1 Delineamento experimental.....	24
	4.2 Criação, manutenção de peixe-zebra e obtenção de embriões.....	24
	4.3 Curva de concentração dose-resposta.....	25
	4.4 Exposição aguda ao CuSO₄	25
	4.5 Taxa de mortalidade e avaliações morfológicas.....	25
	4.6 Resposta ao toque e capacidade natatória.....	26
	4.7 Determinação de espécies reativas de oxigênio.....	26
	4.7.1 Preparo do homogenato para determinação de ERO (ex vivo).....	26
	4.7.2 Obtenção das imagens representativas (in vivo).....	26

4.8	Determinação dos níveis de tióis não proteicos (NPSH).....	27
4.9	Determinação da viabilidade celular <i>in vivo</i>	27
4.10	Quantificação de proteínas.....	26
4.11	Análise estatística.....	28
5	RESULTADOS.....	28
5.1	Efeito da exposição aguda ao CuSO ₄ na sobrevivência larval	28
5.2	Exposição ao CuSO ₄ prejudica o desenvolvimento larval.....	29
5.3	Exposição ao CuSO ₄ induz alterações comportamentais.....	30
5.4	Exposição ao CuSO ₄ alterou parâmetros oxidativos.....	31
5.5	Exposição ao CuSO ₄ prejudicou a viabilidade celular das larvas.....	33
6	DISCUSSÃO.....	33
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
8	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	37
9	REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metais pesados

Atividades antrópicas liberam grandes quantidades de metais pesados no ambiente, despertando preocupações de um ponto de vista ecotoxicológico. Metais pesados são classificados como severos poluentes ambientais, uma vez liberados em altas concentrações no ambiente, exercem efeitos negativos em ecossistemas aquáticos e terrestres. Consequentemente, perturbando a biota presente, além de causarem impactos na saúde humana (CASTELHANO GEBARA et al., 2021; YANG et al., 2021; TASLIMA et al.).

A maioria dos estudos ecotoxicológicos, focam na toxicidade de metais pesados não essenciais, como arsênico, cádmio e mercúrio, explicitamente tóxicos em baixas concentrações (FU; XI, 2020; YANG et al., 2021; FASAE; ABOLAJI, 2022). Entretanto, metais essenciais, como ferro, cobre, manganês e zinco também podem exercer ação tóxica quando presentes em altas concentrações em sistemas biológicos (BALACHANDRAN et al., 2020; TSANG et al., 2020; JOMOVA et al., 2022).

Estudos a respeito da toxicidade do cobre, demonstraram sua ação tóxica sobre parâmetros metabólicos, fisiológicos e estruturais, sendo esses efeitos observados através espécies vegetais (MIR; PICHTEL; HAYAT, 2021; PEREA-GARCÍA et al., 2020) e animais (OLIVARI; HERNÁNDEZ; ALLENDE, 2008; SCHEIBER; DRINGEN; MERCER, 2013; BRIX et al., 2022).

1.2 Cobre e contaminação ambiental

O cobre (Cu) é um elemento químico classificado como metal de transição, listado no período 4 e grupo IB da tabela periódica com número atômico 29. Este metal pode ocorrer sob a forma elementar, sais inorgânicos na forma de íons (Cu^+ , Cu^{+2}) ou como compostos orgânicos (PEDROZO; LIMA, 2001; PUBCHEM, 2023).

Entre as fontes naturais de exposição ao cobre incluem o intemperismo e atividades vulcânicas, enquanto emissões antrópicas destacam-se nas atividades industriais e agrícolas, as quais influenciam diretamente a concentração deste metal no ambiente (SAMPAIO, 2013; SILVA et al., 2020).

Devido suas propriedades biocidas, compostos de cobre são frequentemente utilizados para o tratamento de água, evitando crescimento de algas (SHEN et al., 2019) e na agricultura, atuando como fungicida (GOBBI et al., 2020). Tendo como exemplo, o sulfato de cobre (CuSO_4), primeiro fungicida desenvolvido pelo homem, que, quando misturado com hidróxido cálcio, é conhecido como calda bordalesa. A descoberta acidental da eficiência do sulfato de cobre sob controle do míldio da videira (*Plasmopora viticola*) foi decisivo para o início do manejo químico de doenças de plantas (MICHEREFF, 2001).

No Brasil, a concentração máxima permitida em água potável é de 2 mg/L (BRASIL, 2021), no entanto, a contaminação ambiental por cobre representa potencial risco em diferentes ecossistemas, bem como à saúde humana (CHOO et al., 2013; SCHEIBER; DRINGEN; MERCER, 2013; TAO et al., 2022). Em ambientes aquáticos, metais tendem a se acumular no sedimento. Com isso, o cobre, dependendo das condições físico-químicas ambientais, pode alcançar colunas d'água (BABCSÁNYI et al., 2014).

Uma vez presente no ambiente aquático, o cobre é incorporado em organismos, como por exemplo em peixes (ZHANG et al., 2022), altamente sensíveis a poluição ambiental por metais pesados (KADIM; RISJANI, 2022). Em resposta a contaminação, peixes podem bioacumular altas quantidades de cobre em vários órgãos, causando severos danos fisiológicos às espécies expostas (JOHNSON; CAREW; SLOMAN, 2007; BRIX et al., 2022). Assim, através da biomagnificação, este metal atinge diferentes níveis tróficos até chegar aos humanos, despertando preocupações quanto seu potencial tóxico (YANG et al., 2021; KADIM; RISJANI, 2022).

1.3 Mecanismos de toxicidade do cobre

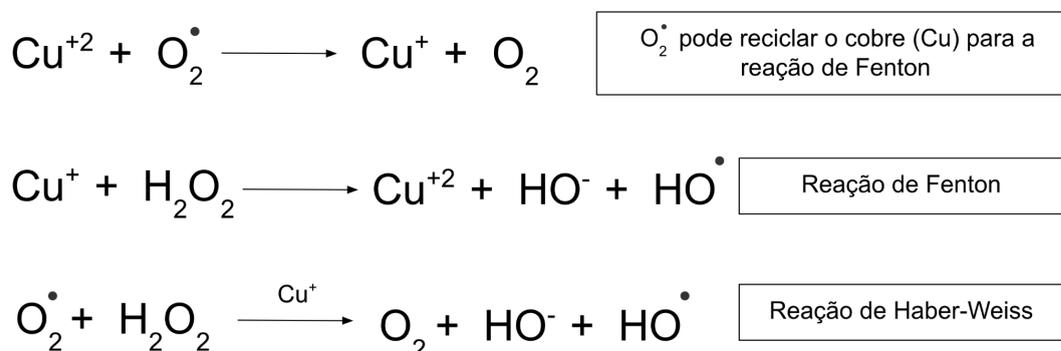
1.3.1 Estresse oxidativo

Estudos têm demonstrado a toxicologia do cobre, sendo um dos mecanismos propostos, a indução de estresse oxidativo (GAEDTKE; CHOW, 2003; YANG et al., 2019; KWOK; CHAN, 2020; ZHANG et al., 2022). O estresse oxidativo é determinado pelo desequilíbrio favorecendo as moléculas pró-oxidantes o qual compromete a capacidade antioxidante do organismo (LUSHCHAK, 2014).

Oxidantes são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais incluem radical ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\bullet) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SALVADOR; HENRIQUES, 2004; LUSHCHAK, 2014). Além das espécies reativas de nitrogênio (ERN), principalmente óxido nítrico (NO) e o radical peroxinitrito, resultante da interação entre o O_2^- e NO (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; PIZZINO et al., 2017). Devido à grande capacidade reativa, estas moléculas podem causar danos em estruturas essenciais para a sobrevivência celular, de modo que as EROs/ERNs podem oxidar lipídios de membranas e proteínas, além de causar lesões ao DNA (COOKE et al., 2003; LUSHCHAK, 2014; ISLAM et al., 2015; MENG et al., 2020).

Em sistemas biológicos, os íons de cobre estão principalmente sob os estados Cu^+ (cuproso, reduzido) ou Cu^{+2} (cúprico, oxidado). No entanto, alternância entre estes estados podem modificar a homeostase redox, com o aumento na formação de espécies reativas via reação de Fenton e Haber-Weiss (JOMOVA; VALKO, 2011). O Cu^{+2} é reduzido a Cu^+ , capaz de decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), liberando radicais hidroxila (OH) altamente reativos, danosos às macromoléculas biológicas e assim, o cobre pode exercer ação tóxica via estresse oxidativo (HAYASHI et al., 2000; CECCONI et al., 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; TISATO et al., 2009; PEREIRA; CAMPOS; BOGO, 2016).

Figura 1 – Reações de Fenton e Haber-Weiss para a formação do radical hidroxila (OH^\bullet) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007)



1.3.2 Inflamação

Outro mecanismo proposto na toxicidade do cobre é a inflamação, definida como a primeira resposta de defesa do organismo frente a estímulos nocivos (CHEN; MIN; WANG, 2022). Embora seja um processo fisiológico, o qual visa manter a homeostase do organismo, a inflamação pode se tornar crônica, gerando condições adversas ao organismo e estados disfuncionais aos tecidos (MEDZHITOV, 2008).

Como parte da resposta inflamatória aguda, espécies reativas produzidas por células fagocíticas auxiliam na degradação do lesivo, além de estimular vias de sinalização intracelular para expressão gênica pró-inflamatória (FLOHÉ et al., 1997; KUMAR; PERKINS, 2010; CHATTERJEE, 2016). No entanto, se ocorrer a geração excessiva de oxidantes, eles podem ser difundidos para fora das células fagocíticas e induzir estresse oxidativo. Ao mesmo tempo, o estresse oxidativo pode induzir inflamação, uma vez que as ERO podem ativar respostas inflamatórias por múltiplas vias, assim, promovendo ciclo autoperpetuante entre os mesmos (VAZIRI; RODRÍGUEZ-ITURBE, 2006; KUMAR; PERKINS, 2010; BISWAS, 2016).

O cobre exerce ação pró-inflamatória pelo seu potencial de induzir estresse oxidativo, catalisando a produção de ERO via reações de Fenton e Haber-Weiss (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; JOMOVA; VALKO, 2011). A resposta aumentada do estresse oxidativo pela ativação de respostas inflamatórias e a sobrecarga do cobre foram documentados em condições patológica em modelos animais (LEITE et al., 2013; NGUYEN et al., 2020; AROWOOGUN et al., 2021) e humanos (BO et al., 2008; JOMOVA; VALKO, 2011; CHEN; MIN; WANG, 2022).

A síntese de óxido nítrico (NO) pelas células é um potente biomarcador, especialmente para avaliação da inflamação (KUMAR; PERKINS, 2010; LEITE et al., 2012). Durante a inflamação, o NO pode desempenhar papéis importantes como mediador inflamatório (CHA et al., 2018; PANDA et al., 2022). No entanto, outra característica atribuída a esta molécula é seu potencial de reagir com o superóxido (O_2^-), gerando o peroxinitrito ($ONOO^-$) altamente reativo, o qual compromete biomoléculas essenciais (ISLAM et al., 2015; AHMAD; HUSSAIN; AHSAN, 2019).

Estudos têm buscado conhecimentos acerca da ação tóxica exercida pelo cobre e, mais recentemente, a exposição a este metal tem sido facilmente modelada em peixe-zebra (KWOK; CHAN, 2020; BOYLE; CLARK; HANDY, 2020; CHAO et al., 2021). Consequentemente, a exposição ao cobre em peixe-zebra larvais demonstrou efeitos pró-oxidativo e pró-inflamatório, incluindo morte celular em células ciliadas (OLIVARI; HERNÁNDEZ; ALLENDE, 2008), além do comprometimento em células retiniais (ZHAO et al., 2020), entre outros.

De acordo com a literatura, a homeostase do cobre desempenha papel fundamental na etiologia de distúrbios neurológicos, onde níveis elevados deste metal são associados a doença de Alzheimer e Parkinson (CHOO et al., 2013; BELARBI et al., 2020; SYNHAIVSKA et al., 2022). Em vista disso, a exposição a este poluente ambiental representa potenciais riscos a espécies não-alvo, bem como à saúde humana devido aos seus mecanismos de toxicidade (SCHEIBER; DRINGEN; MERCER, 2013; BRIX et al., 2022; CHEN; MIN; WANG, 2022; ZHANG et al., 2022).

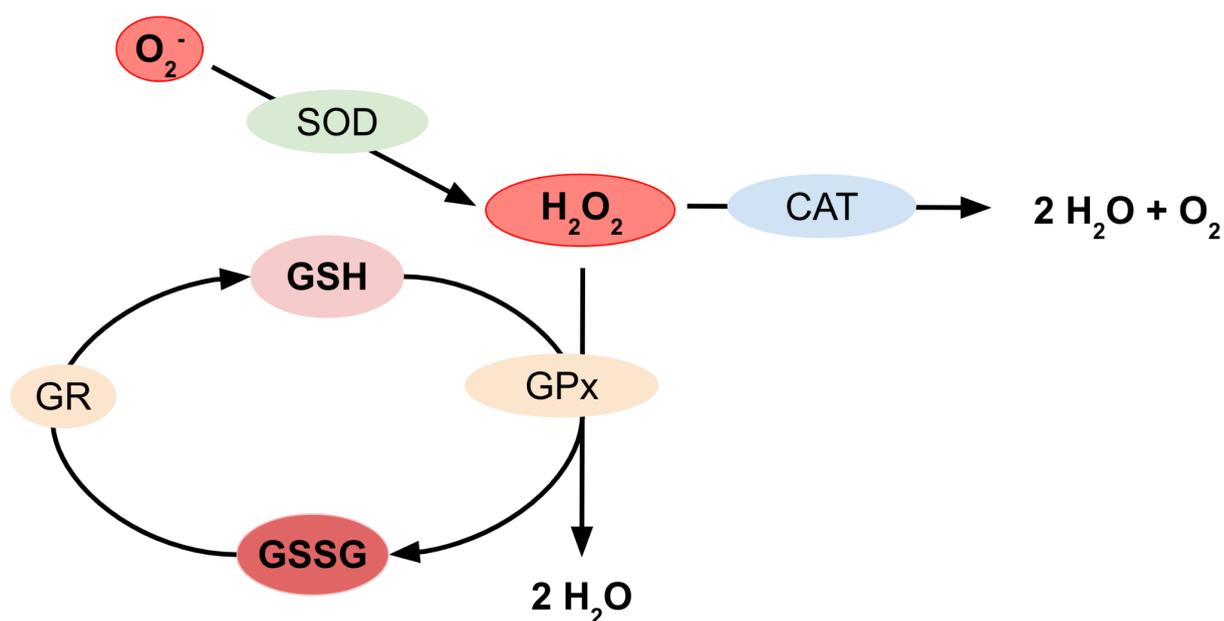
1.4 Sistemas Antioxidantes

Sistemas de defesa antioxidantes capacitaram a coexistência em relação à exposição às espécies reativas, ao neutralizar e detoxificar as mesmas, diminuindo os danos causados pelo estresse oxidativo (ALI et al., 2020).

Halliwell e Gutteridge definiram os antioxidantes como qualquer substância que inibe, previne e remove danos oxidativos de moléculas alvo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Essa definição incluem os sistemas antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), responsável por catalisar a conversão do radical ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que posteriormente é decomposto em oxigênio (O_2) e água (H_2O) pela ação enzimática da catalase (CAT) ou ainda, pode ser removido através da glutatona peroxidase (GPx). Como também os sistemas antioxidantes não enzimáticos, o qual envolve essencialmente o ciclo metabólico da glutatona, definido por reações redox entre suas formas oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) (SALVADOR; HENRIQUES, 2004; VIVES-BAUZA; STARKOV; GARCIA-ARUMI, 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

A glutatona é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glutamato, glicina e cisteína. A grande relevância deste antioxidante está relacionada ao seu papel como cofator da glutatona peroxidase (GPx) e glutatona-s-transferase (GST) e sua alta capacidade quelante, atuando diretamente na neutralização de oxidantes (DAVIES, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). No ciclo metabólico da glutatona, GPx utiliza a GSH como doador de elétrons, que possui o grupamento sulfidríla (SH) em seu sítio ativo, sendo este constantemente oxidado e reduzido durante o ciclo catalítico. A glutatona na sua forma oxidada (GSSG) é reciclada de volta a forma reduzida pela ação da glutatona redutase e assim, regenerando o ciclo da GSH (MORRIS et al., 2014).

Figura 2 – Sistema de defesa antioxidante enzimático: superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e o ciclo metabólico da glutatona na eliminação de ERO. Adaptado (PENG et al., 2014).



1.5 Peixe-zebra como organismo modelo em estudos

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno teleóstero pertencente à família *Cyprinidae*, nativo do sudeste asiático (PARICHY, 2015) (Fig 3). Sua utilização em estudos de genética molecular despertou interesses quanto seu potencial em diversos campos da ciência (STREISINGER et al., 1981; QIAO et al., 2019;

BAILONE et al., 2019). Desde então, este organismo vem se destacando no ponto de vista científico, principalmente por ser um vertebrado diploide com alta complexidade, em equilíbrio com sua facilidade de criação em condições laboratoriais (STREISINGER et al., 1981; PARNG et al., 2002; DAMMSKI et al., 2011; BAMBINO; CHU, 2017).

Figura 3 – Peixe-zebra adulto.



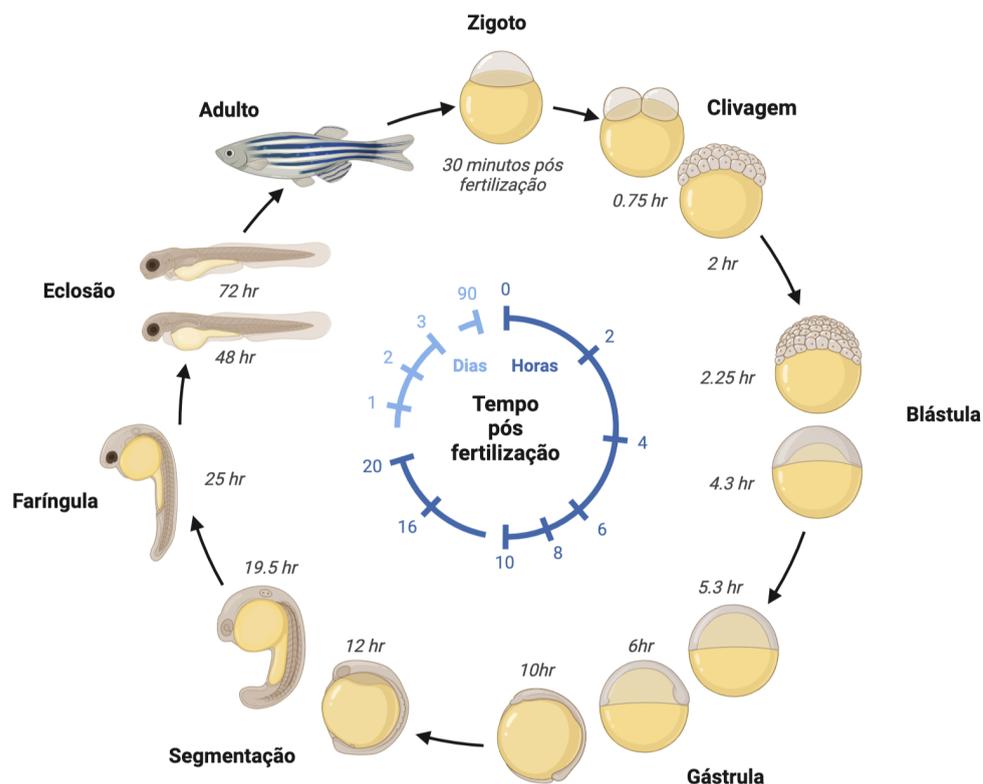
Fonte:<https://bityli.com/Nd3SL>

O projeto de sequenciamento genômico demonstrou alta similaridade genética com o genoma humano. Aproximadamente 70% dos genes humanos possuem um ortólogo no peixe-zebra, sendo que 84% destes genes, são conhecidos por serem associados a doenças humanas (HOWE et al., 2013). Fato este que contribui para o emprego deste modelo alternativo em pesquisas biomédicas, toxicológicas e comportamentais, tendo em vista preocupações por parte de organizações governamentais o uso de vertebrados maiores na biologia experimental (OLSON et al., 2000).

O peixe-zebra apresenta diversas características relevantes que o tornam organismo emergente na ciência. Possui pequenas dimensões medindo de 4 a 5 centímetros na vida adulta, facilitando o manejo e manutenção (DAMMSKI et al., 2011). Apresenta alta taxa reprodutiva, considerando que uma fêmea pode desovar cerca de 200 embriões, que contém desenvolvimento embrionário rápido e externo (SIMONETTI et al., 2015). Além disso, a transparência do embrião e da larva permite a visualização de cada estágio do desenvolvimento desde as primeiras horas pós fertilização (hpf) (KIMMEL et al., 1995).

A morfogênese do peixe-zebra é dividida com base nas principais mudanças que ocorrem durante cada estágio. Período de Segmentação (10 - 24 hpf): Início do desenvolvimento dos órgãos; diferenciação celular; desprendimento da cauda; formação de somitos; aumento do tamanho corporal. Período de Faríngula (24 - 48 hpf): Organização bilateral; diferenciação das células ciliadas; notocorda desenvolvida; faixa dorsal dos melanóforos bem definida; desenvolvimento do cérebro, sistema nervoso e circulatório. Período de eclosão: eclosão do córion; morfogênese completa; desenvolvimento das nadadeiras peitorais, brânquias e mandíbulas; pequena abertura da boca; nado ativo. É importante ressaltar que a partir do período de eclosão, a larva já apresenta características comportamentais independentes como atividade natatória, estímulos sensoriais e comportamento predatório (KIMMEL et al., 1995).

Figura 4 – Estágios de desenvolvimento do peixe-zebra.



Fonte: biorender.

Estudos recentes têm reforçado o uso desta espécie durante o estágio larval, uma vez que o modelo exibe uma extensa gama de fenótipos comportamentais e

bioquímicos os quais podem ser quantificados e servir como potenciais biomarcadores (NUNES et al., 2019; ZHU et al., 2020; PAGANOTTO LEANDRO et al., 2021; KEIJ et al., 2021). Neste contexto, o uso desta espécie se torna atrativo, ao complementar diferentes campos de pesquisa, principalmente na toxicologia de contaminantes ambientais, modelo de doenças humanas, biologia do comportamento e desenvolvimento de fármacos (PARNG et al., 2002; BARENYS et al., 2019; COLWILL; CRETON, 2011; NGUYEN-CHI et al., 2014; GOESSLING; SADLER, 2015; BAMBINO; CHU, 2017; PARK et al., 2021).

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o envolvimento do estresse oxidativo como mecanismo de toxicidade do cobre, torna-se importante a avaliação dos alvos celulares e bioquímicos prejudicados frente a exposição a este metal. Estudos relacionados aos efeitos do cobre sobre o desenvolvimento em organismos aquáticos ainda são escassos. Assim, faz-se necessário investigar e aprofundar conhecimentos principalmente quanto à toxicidade do cobre em concentrações subletais e de relevância ambiental, as quais não são totalmente descritas no organismo modelo peixe-zebra. Neste sentido, o peixe-zebra é um organismo promissor com grande potencial para investigação da toxicidade do cobre e seus impactos no desenvolvimento, que reflete diretamente nos riscos ambientais deste metal em ecossistemas aquáticos.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade do sulfato de cobre CuSO_4 em larvas de peixe-zebra.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a sobrevivência em larvas de peixe-zebra expostos a diferentes concentrações de CuSO_4 ;

Avaliar os efeitos do CuSO_4 sobre parâmetros morfológicos, comportamentais e bioquímicos em larvas de peixe-zebra expostos ao CuSO_4 ;

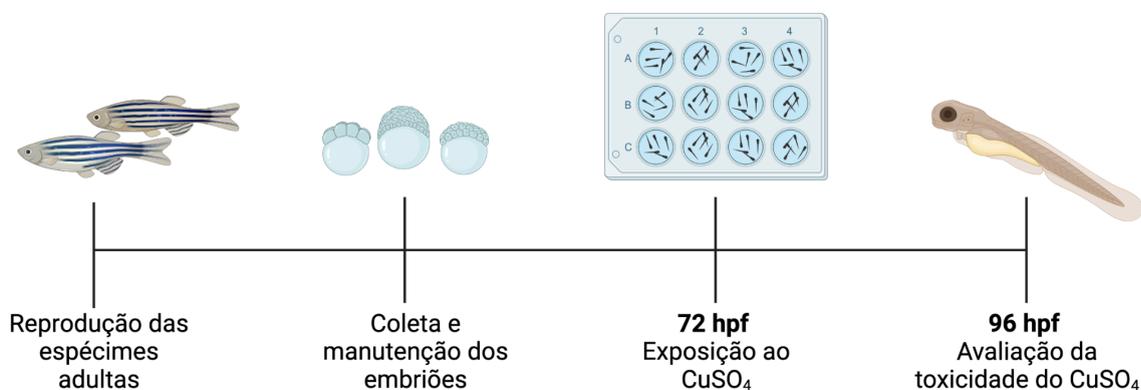
Avaliar marcadores de estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra expostos ao CuSO_4 .

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

A figura abaixo demonstra a elaboração do delineamento experimental. Após a reprodução das espécimes, os embriões foram coletados e após três dias, no estágio larval de 72 hpf, as larvas de peixe-zebra foram expostas a diferentes concentrações de CuSO_4 e a avaliação da toxicidade foi realizada no estágio de 96 hpf.

Figura 5 – Delineamento experimental. Período de exposição ao CuSO_4 .



4.2 Criação, manutenção de peixe-zebra e obtenção de embriões

Espécimes adultas de peixe-zebra (*Danio rerio*) selvagem foram mantidos sob condições controladas de água em pH 7, condutividade 400 μS e temperatura na faixa de 26 a 28 °C em sistema de recirculação ZebTec[®], sendo estes parâmetros essenciais para a criação em biotério. Assim como, o fotoperíodo garantindo um ciclo claro e escuro de 14/10 horas e a suplementação nutricional com ração comercial e alimentos biológicos como *Artemia sp.* quatro vezes ao dia. Após a reprodução dos espécimes adultos e manutenção dos embriões, os mesmos foram mantidos em uma incubadora BOD a 28 °C em meio E3 (KCl 170 μM , MgCl_2 330 μM , NaCl 5 mM e azul de metileno 0,6 μM) até o estágio larval de 3 dias pós fertilização (dpf). Todos os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados e regulamentados pelo comitê de ética local (CEUA/UNIPAMPA protocolo n° 2022.PE.S.1007).

4.3 Curva de concentração dose-resposta

Para a determinação da curva dose-resposta, 72 larvas de peixe-zebra com 72 hpf foram expostas ao CuSO_4 nas concentrações de 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 200 e 300 μM ($n=2$). Como grupo controle, larvas no mesmo estágio foram expostas apenas com a água do sistema Zebtec®.

A fim de obter concentrações mínimas de CuSO_4 a qual induz toxicidade do composto, baixa taxa de mortalidade e ambientalmente relevantes, as concentrações de 1, 2 e 10 μM foram escolhidas para as análises posteriores.

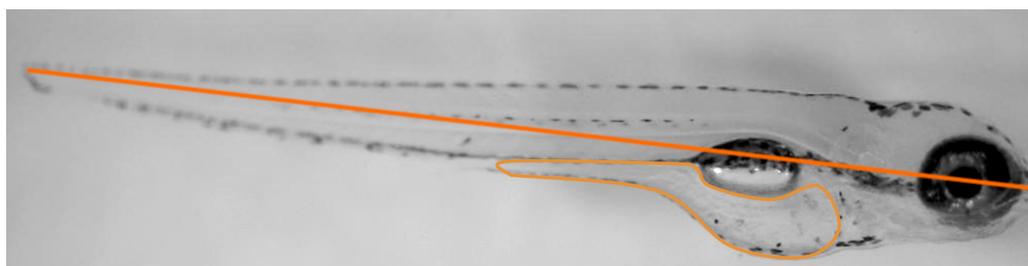
4.4 Exposição aguda ao CuSO_4

Larvas de peixe-zebra com 72 hpf foram expostas durante 24 horas ao CuSO_4 , nas concentrações de 1, 2 e 10 μM , em placas de 12 poços em um volume final de 3 mL. As diluições foram preparadas com água do sistema Zebtec® e as larvas foram mantidas em incubadora BOD durante a exposição.

4.5 Taxa de sobrevivência e alterações morfológicas

A taxa de sobrevivência foi analisada através de fatores como batimento cardíaco e ausência de necrose através do estereomicroscópio Carl ZeissStemi 2000C acoplado a câmera digital Moticam 2000. As alterações morfológicas foram avaliadas através de 10 larvas por concentração, considerando características como área do saco vitelínico, tamanho corporal e inflação da bexiga natatória ($n= 3$). Para obtenção das imagens, as larvas foram insensibilizadas temporariamente por frio, fixadas com metilcelulose 3% em lâminas de microscopia para serem analisadas através do software Image J (AGUILAR, 2014).

Figura 6 – Larva de peixe-zebra (controle) em 96 hpf. Medições realizadas pelo software Image J: Laranja escuro - Comprimento do corpo (mm; Laranja claro - área do saco vitelínico (mm^2).



4.6 Resposta ao Toque e capacidade Natatória

Após o término da exposição, 15 larvas de peixe-zebra com 96 hpf de cada concentração foram submetidas ao teste comportamental de resposta ao toque e capacidade natatória (n=4). De forma randomizada, uma larva de cada vez foi posicionada suavemente no centro de uma placa de Petri contendo água do sistema Zebtec®. As larvas foram aclimatadas durante 2 minutos e foi realizado o toque na região caudal com auxílio de uma seringa BD Ultrafine™ com agulha de 6mm (estímulo). O número de estímulos necessários para o primeiro deslocamento foi registrado como também a capacidade da larva em realizar um escape resposta de natação em direção a periferia (COLWILL; CRETON, 2011).

4.7 Determinação de espécies reativas de oxigênio

A oxidação do diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína foi usada para determinar os níveis de espécies reativas (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992), obtida através de duas metodologias: Preparo do homogenato *ex vivo* e imagens representativas *in vivo*.

4.7.1 Preparo do homogenato para determinação de ERO (*ex vivo*)

Para esse ensaio, 15 larvas foram homogeneizadas em HEPES 20 mM pH 7 no *PowerLyzer* durante 30 segundos a 2000 rpm e depois, centrifugadas por 10 minutos a 1000 g e 4 ° C (n=10). O sobrenadante foi isolado e incubado nas placas Elisa com HEPES 20 mM pH 7, reagente DCF 10 mM, obtendo concentração final de 0,2 mM do reagente na placa. A emissão de fluorescência do DCF foi monitorada após 40 minutos em um comprimento de onda de excitação/emissão 488 e 530 nm. Os valores foram normalizados pela concentração de proteína nas amostras e o resultado foi expresso pela porcentagem do controle.

4.7.2 Obtenção das imagens representativas (*in vivo*)

Seis larvas de cada concentração foram incubadas por uma hora com água do Sistema ZebTec® e DCF 1 mM, obtendo concentração final de 10 µM do reagente. Posteriormente, as larvas foram anestesiadas no gelo e fixadas em

lâminas de microscopia com metilcelulose 3%. As imagens foram adquiridas pelo microscópio Axioscópico ZEISS 5 acoplado à câmera digital Axiocam.

4.8 Determinação dos níveis de tióis não proteicos (NPSH)

Para a dosagem de NPSH, 30 larvas foram homogeneizadas manualmente com pistilo em TrisHCl pH 8 (n=5). Os homogenatos foram submetidos à precipitação de proteína por adição de PCA 0,5 M, mantidos no gelo e depois, centrifugadas por 5 minutos a 10000 g a 4° C. O sobrenadante foi isolado e incubado por 15 minutos no escuro, nas placas Elisa com TrisHCl pH 8 e ácido ditionitrobenzólico (DTNB) 5 mM, obtendo concentração final de 0,1 mM do reagente na placa. Posteriormente, a absorbância foi lida a 412 nm usando leitor de placas multimodo EnsPire® Perkin Elmer (Waltham,MA). Os resultados foram expressos nmol de NPSH/mg de proteína pela porcentagem do controle.

4.9 Determinação da viabilidade celular *in vivo*

A viabilidade celular foi medida pelo ensaio da Resazurina, de acordo com procedimentos estabelecidos com modificações (WILLIAMS; RENQUIST, 2016). Para esse ensaio, 10 larvas por poço de cada concentração foram colocadas na placa Elisa com água do sistema Zebtec® e o reagente CellTiter-Blue® Cell Viability Assay 0,2 mg/L, obtendo concentração final de 0,08 µM do reagente na placa (n=3). A capacidade de mitocôndrias viáveis de reduzir a resazurina em um produto fluorescente (resorufina) pode ser quantificado por fluorescência (O'BRIEN et al., 2000). A emissão de fluorescência da resorufina foi monitorada após 20 horas em comprimento de onda de excitação/emissão 530 e 600 nm. Os valores foram normalizados pela concentração de proteína nas amostras e o resultado foi expresso pela porcentagem do controle.

4.10 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi determinada pelo método de Coomassie Blue, utilizando albumina de soro bovino como padrão. A absorbância das amostras foi medida em 565 nm em leitora de placa multimodo EnsPire® Perkin Elmer (Waltham,MA) (KRUGER, 1994).

4.11 Análise estatística

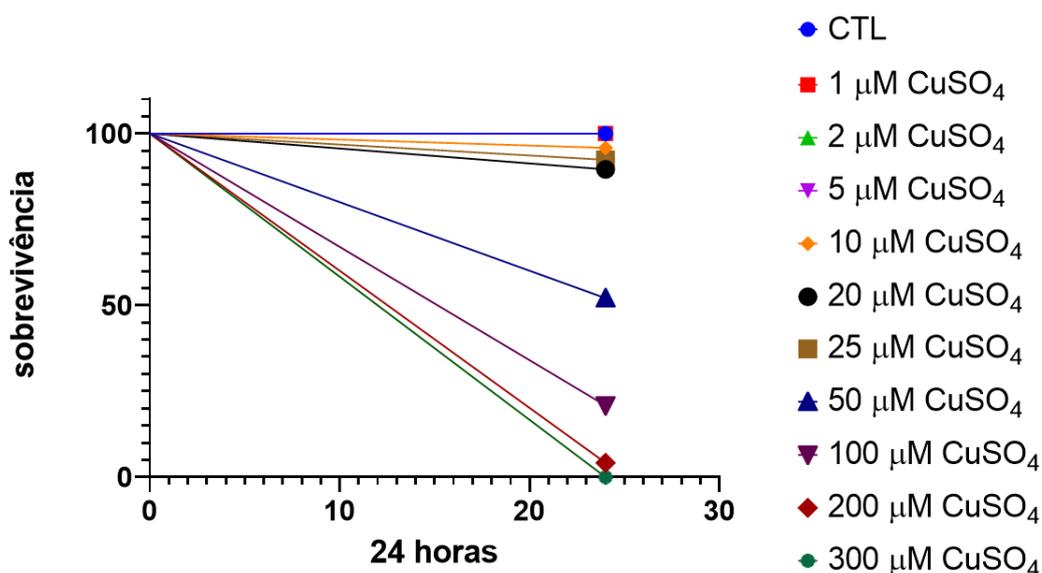
Para as análises estatísticas dos resultados, os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Kolmogorov Smirnov, Shapiro-Wilk, D'Agostino e Pearson. Dados paramétricos foram analisados pelo teste unidirecional (one-way ANOVA) e pós teste de Dunnett de múltiplas comparações. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (S.E.M) representados na forma de barras, considerando-os significativos quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da exposição aguda ao CuSO_4 na sobrevivência larval

A curva de sobrevivência das larvas de peixe-zebra expostas a concentrações de CuSO_4 (1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 200 e 300 μM) demonstrou que as concentrações de 1, 2, 5 e 10 μM não compromete a sobrevivência das larvas, quando comparadas com o controle. No entanto, larvas expostas a concentrações a partir de 20 apresentaram diminuição na taxa de sobrevivência (Fig 7). A partir da curva de mortalidade, foi determinada a concentração letal (CL50) das larvas, a qual pôde ser observada na concentração de 60 μM de CuSO_4 .

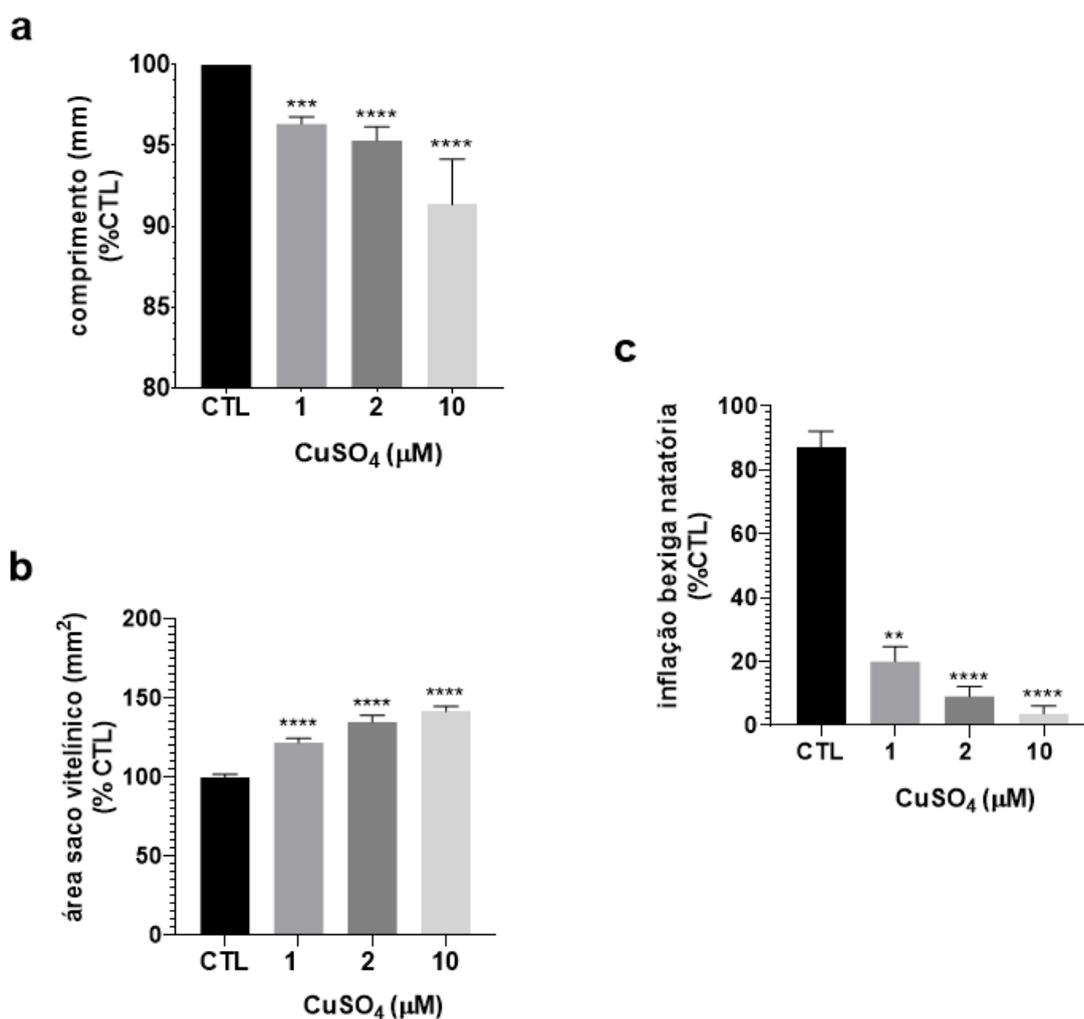
Figura 7 – Curva de sobrevivência de larvas de peixe-zebra expostas a diferentes concentrações de CuSO_4 no período de 24 horas.



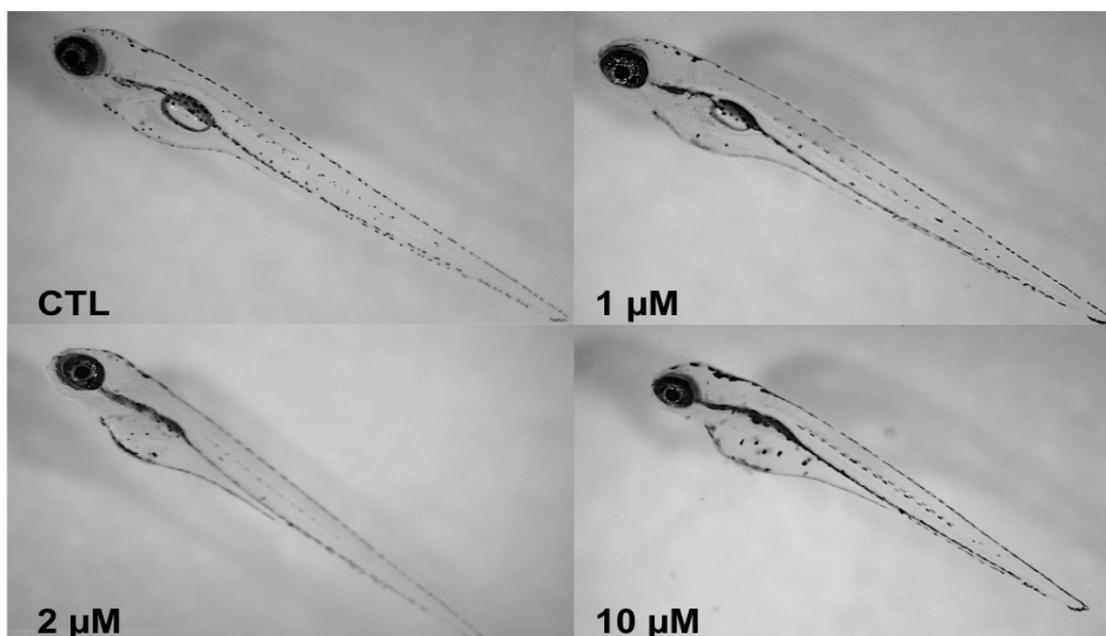
5.2 Exposição ao CuSO₄ prejudica o desenvolvimento larval

A exposição ao CuSO₄ exerceu efeitos negativos no desenvolvimento larval em todas as concentrações testadas, ao apresentarem diminuição significativa no comprimento corporal quando comparado com o controle (Fig. 8a). Assim como, aumento significativo na área do saco vitelínico (Fig. 8b) e comprometimento na inflação da bexiga natatória (Fig. 8c)

Figura 8 – Análises morfométricas de larvas expostas ao CuSO₄. (a) comprimento (mm); (b) área do saco vitelínico; (c) inflação da bexiga natatória; (d) imagem representativa de larvas em 96 hpf. Os grupos foram submetidos ao teste unidirecional (one-way ANOVA). Dados foram expressos pela porcentagem do controle e média ± SEM, considerados estatísticos quando **p<0,05; ***p<0,0009; ****p<0,0001.



d

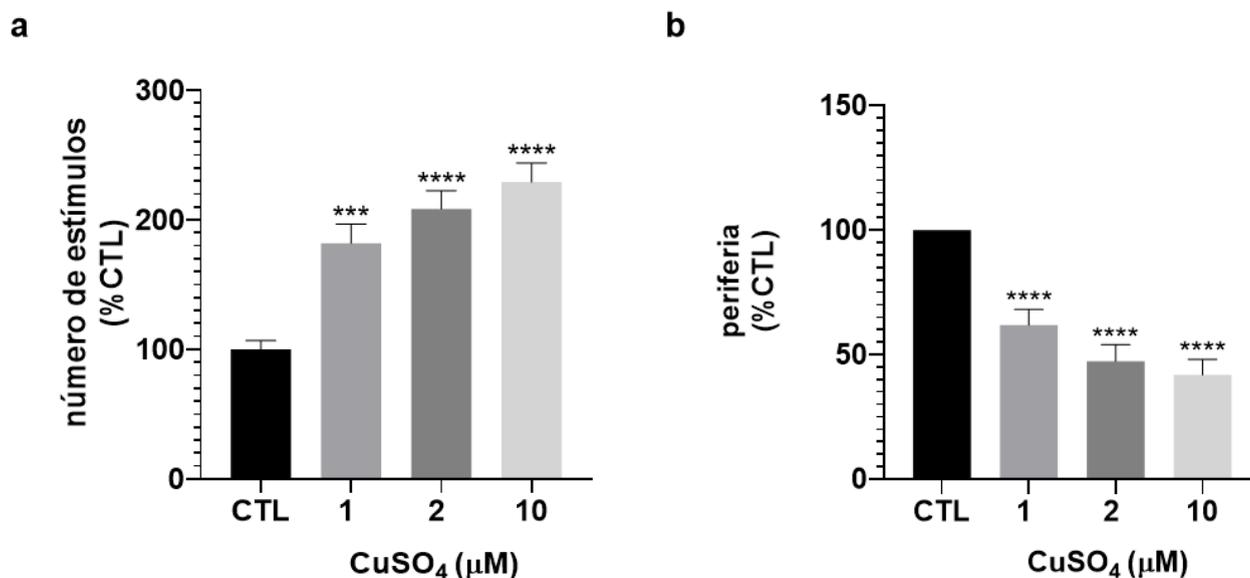


5.3 Exposição ao CuSO₄ induz alterações comportamentais

Em todas as concentrações testadas, a exposição ao CuSO₄ demonstrou que as larvas de peixe-zebra necessitaram de um número maior de estímulos táteis para apresentar a resposta de escape (Fig 10a).

Em relação ao comportamento motor, o CuSO₄ diminuiu a capacidade natatória das larvas, uma vez que não exibiram o nado padrão de fuga em direção à periferia quando comparado com o controle (Fig. 10b). Ademais, larvas expostas às menores concentrações apresentaram nado irregular, enquanto a maior concentração as larvas exibiam contrações consecutivas na cauda e permaneciam reclinadas durante o ensaio.

Figura 9 – Ensaio comportamentais (a) Resposta ao toque (análise sensorial) (b) Capacidade natatória (comportamento motor). Os grupos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e o teste comparativo de Dunn's. Dados foram expressos pela porcentagem do controle e média \pm SEM. Os resultados foram considerados significativos quando *** $p < 0,0009$; **** $p < 0,0001$.



5.4 Exposição ao CuSO₄ alterou parâmetros oxidativos

Para determinar se um dos mecanismos de toxicidade do cobre é através do estresse oxidativo, a oxidação do diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína foi usada para avaliar os níveis de espécies reativas. As imagens são unicamente representativas da fluorescência do DCFDA das larvas incubadas *in vivo* com o reagente após o término da exposição (Fig. 10a). Enquanto os níveis de ERO foram determinados somente pelo preparo do homogenato incubado, o qual foi incubado com o reagente (Fig 10b).

Como resultado, a exposição aguda ao CuSO₄ resultou em alterações na homeostase redox, com o aumento significativo nos níveis de espécies reativas de oxigênio em comparação com o controle, de maneira dose-dependente ente (Fig 10a-10b). Ao mesmo tempo que os níveis de tióis não proteicos diminuíram principalmente nas concentrações de 1 e 10 μM (Fig .11).

Figura 10 – Efeitos do CuSO₄ sobre a produção de ERO (a) Representação da fluorescência do DCFDA em larvas *in vivo*; (b) Quantificação de ERO através do preparo do homogenato incubado com DCFDA. As análises estatísticas foram realizadas através do teste unidirecional (one-way ANOVA) seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnett. Dados foram expressos pela porcentagem do controle e média ± SEM, considerados estatísticos quando *p<0,05; **p<0,002;****p<0,0001.

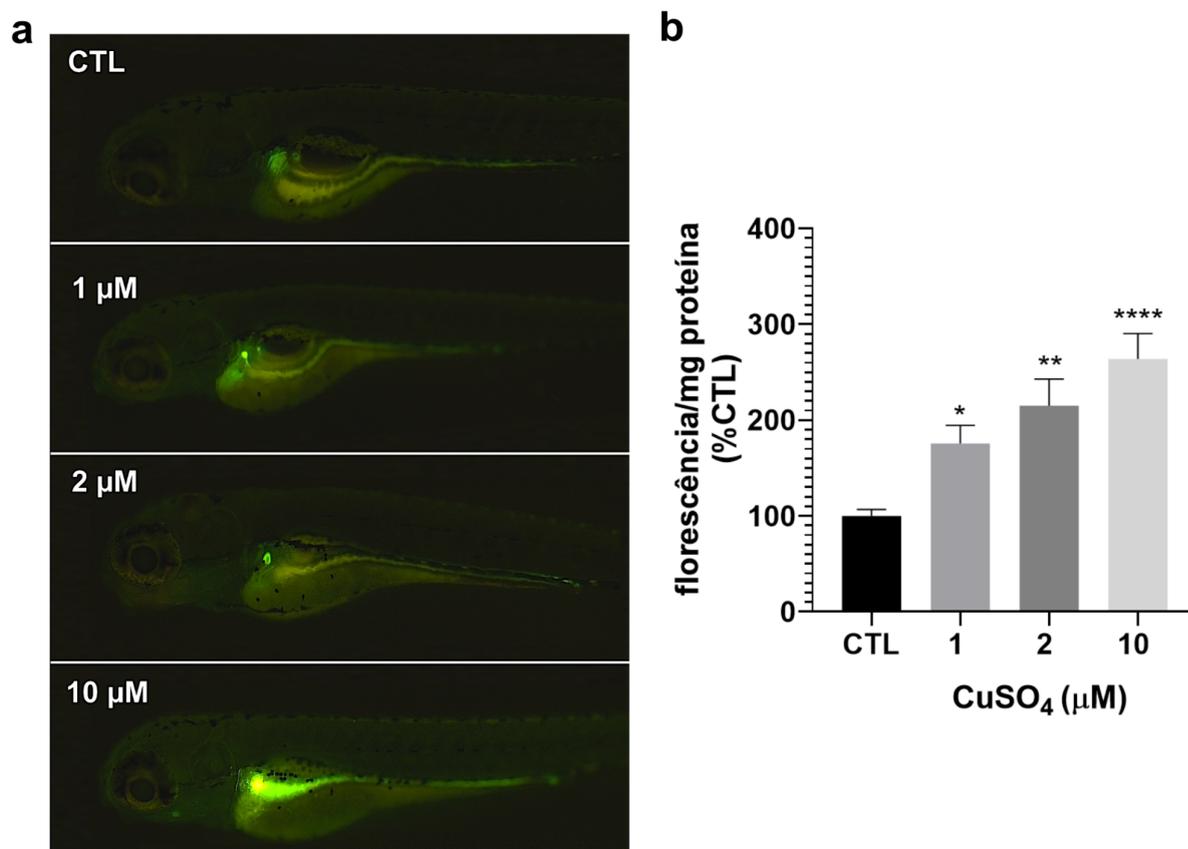
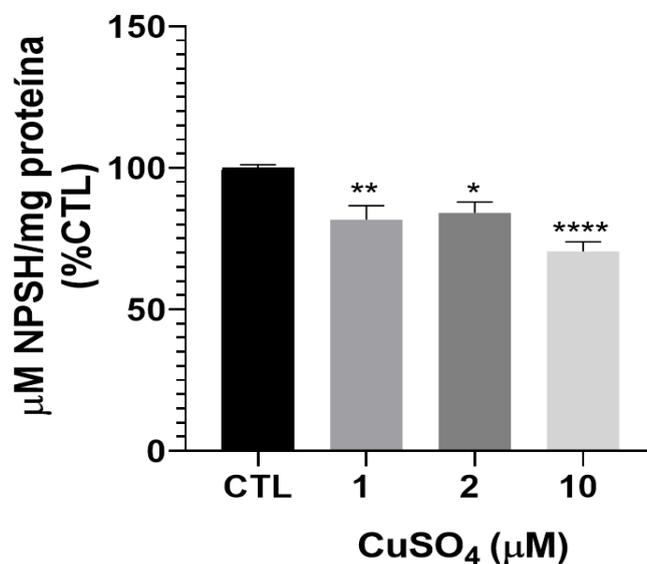


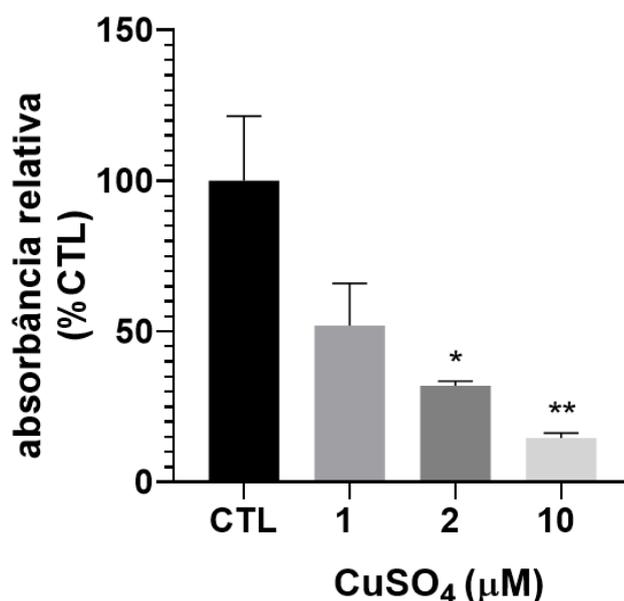
Figura 11 – Avaliação nos níveis de NPSH em larvas expostas ao CuSO_4 . A análise estatística foi realizada através do teste unidirecional (one-way ANOVA) seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnett. Dados foram expressos por μM NPSH/mg proteína pela porcentagem do controle e média \pm SEM, considerados estatísticos quando * $p < 0,05$; ** $p < 0,002$; **** $p < 0,0001$.



5.5 Exposição ao CuSO₄ prejudicou a viabilidade celular das larvas

A avaliação da viabilidade celular foi determinada a partir do ensaio de Resazurina. Larvas de peixe-zebra expostas ao CuSO₄ apresentaram diminuição significativa na viabilidade celular, com exceção da menor concentração testada (Fig. 13).

Figura 13 - Avaliação da viabilidade celular *in vivo* de larvas de peixe-zebra a. A análise estatística foi realizada através do teste unidirecional (one-way ANOVA) seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet. Dados foram expressos pela porcentagem do controle e média ± SEM, considerados estatísticos quando *p<0,05; **p<0,004.



6 DISCUSSÃO

A concentração de cobre permitida em água potável no Brasil é de 2 mg/L (BRASIL, 2021) e no presente trabalho, investigamos a toxicidade do CuSO₄ em larvas de peixe-zebra, avaliando concentrações permitidas dentro da legislação brasileira. Ferramentas sensíveis para o biomonitoramento do cobre em ambientes aquáticos é necessária, tendo em vista que a toxicidade do cobre afeta negativamente o desenvolvimento de organismos aquáticos (JOHNSON; CAREW; SLOMAN, 2007a; WEIR et al., 2019; BRIX et al., 2022).

Observamos que a exposição aguda ao CuSO₄ diminui a sobrevivência das larvas à medida que a concentração aumenta. Concentrações de 1 até 10 μM não

comprometem significativamente a sobrevivência, sendo semelhantes com o controle, consideradas concentrações subletais. No entanto, concentrações superiores a 20 μM prejudicaram a sobrevivência das larvas.

Os cálculos do valor de CL50 demonstraram nitidamente dependência logarítmica com o tempo de exposição no valor de 60 μM . Assim, suportando a hipótese de que o cobre gera resposta dependente da dose, corroborando com dados disponíveis na literatura que relacionam o tempo de exposição e a concentração de CuSO_4 (D'ALENÇON et al., 2010; NGUYEN et al., 2020).

O desenvolvimento embrionário do peixe-zebra é descrito com base na morfogênese particular de cada estágio, resumidamente, dividido em período de segmentação, farínghula e eclosão, sendo o último estágio caracterizado pelo início da atividade natatória (KIMMEL et al., 1995). Durante esse estágio a principal fonte de nutrição das larvas são fornecidas pelo saco vitelínico e sua absorção reflete no ótimo desenvolvimento e quaisquer alterações podem comprometê-lo (WILSON, 2012; SCHWARTZ et al., 2021).

A avaliação morfométrica considerando comprimento corporal (mm), área do saco vitelínico (mm^2) e aparecimento da bexiga natatória foi prejudicado pelo CuSO_4 em todas as concentrações testadas. Frequentemente, peixes embrionários e larvas após a exposição a toxicantes apresentam deformações estruturais no saco vitelínico, patologia denominada como edema de saco vitelínico, o que não foi observado nos organismos analisados (AGUILAR, 2014; WITESKA et al., 2014; SANT; TIMME-LARAGY, 2018; TASLIMA et al., 2022).

Nossos resultados sugerem que o aumento da área do saco vitelínico com a diminuição do tamanho corporal de maneira dose-dependente é devido a baixo consumo do saco vitelínico e conseqüentemente, perturbação da nutrição adequada para o crescimento dinâmico durante este estágio. Logo, podendo indicar atraso no desenvolvimento larval, tendo em vista que o comprimento padrão de larvas em 96 hpf é de 3.5 ± 4 mm (JOHNSON; CAREW; SLOMAN, 2007b; WILSON, 2012). Resultados semelhantes foram demonstrados por JOHNSON et al. 2007, em que peixe-zebra durante a fase embrio-larval expostos a concentrações de CuSO_4 também apresentaram atraso no desenvolvimento.

Além disso, outro parâmetro importante durante este estágio é a inflação da bexiga natatória para que a larva inicie gradualmente seu nado ativo (KIMMEL et al.,

1995). Observamos diminuição significativa quanto ao desenvolvimento da bexiga natatória de todas as larvas expostas ao CuSO_4 quando comparado com o controle, também podendo estar relacionado ao comprometimento do desenvolvimento.

Parâmetros comportamentais são extensivamente estudados em peixe-zebra durante a fase embrio-larval, considerados ferramentas sensíveis e essenciais para o estudo de respostas biológicas em toxicologia (COLWILL; CRETON, 2011; PAGANOTTO LEANDRO et al., 2021). Em relação às respostas mediadas por parâmetros sensorio-motores, o CuSO_4 prejudicou o comportamento das larvas em 96 hpf. Neste estágio de desenvolvimento, larvas de peixe-zebra respondem a estímulos táteis na cauda ou cabeça, desenvolvido nas primeiras 24-27 hpf. Como também, exibem comportamentos de fuga característicos tendo preferência pela periferia (tigmotaxia) (RICHENDRFER; CRÉTON, 2013).

Observamos que larvas expostas ao CuSO_4 necessitam de um número maior de estímulos para apresentar resposta de escape. Ao mesmo tempo que apresentaram diminuição na capacidade natatória em não exibir nado padrão de fuga em direção à periferia, quando comparados com o controle. Este déficit locomotor pode estar relacionado a toxicidade do CuSO_4 , que possui como alvo sistemas sensoriais. A interrupção das células que compõe este sistema, tendo como exemplo, os neuromastos, tem implicações comportamentais como já descritos em diferentes espécies de peixes e anfíbios (HERNÁNDEZ et al., 2006; LINBO et al., 2006; OLIVARI; HERNÁNDEZ; ALLENDE, 2008; BRIX et al., 2022). Além disso, outro estudo revelou que o cobre induz a disfunção de locomoção em peixe-zebra na fase embrio-larval (ZHANG et al., 2015), o que poderia explicar em nosso trabalho, movimentos disfuncionais observados na atividade natatória em larvas expostas ao CuSO_4 .

A evolução do metabolismo oxidativo conferiu que mecanismos de defesa garantissem o balanço redox das células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Em condições fisiológicas, moléculas oxidantes participam de processos biológicos essenciais, principalmente, no desenvolvimento embrionário, caracterizado por uma alta taxa de diferenciação. Porém, o desequilíbrio favorecendo moléculas pró-oxidantes, causa distúrbios no desenvolvimento (JOHNSON; CAREW; SLOMAN, 2007).

Avaliando marcadores bioquímicos de estresse oxidativo, a exposição ao

CuSO₄ conduziu ao aumento na geração de ERO, concomitantemente, à redução dos níveis de tióis não proteicos (NPSH), em comparação com o controle. Possíveis mecanismos têm sido propostos para explicar a toxicidade induzida pelo cobre.

Estudos associam seu caráter pró-oxidante em razão da particularidade em adotar status redox distintos, participando de reações redox para formar ERO, além de possuir alta afinidade por grupamentos tiol (SH), em particular a GSH (GAETKE; CHOW, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; BRIX et al., 2022). À vista disso, estudos têm caracterizado o modelo de inflamação induzida por CuSO₄ em larvas de peixe-zebra, dada a capacidade de gerar respostas inflamatórias via estresse oxidativo (PEREIRA; CAMPOS; BOGO, 2016; NGUYEN et al., 2020)

A GSH é um tripeptídeo intracelular ubíquo essencial na defesa antioxidante, caracterizado pela presença do grupamento tiol em sua estrutura (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Nossos resultados demonstraram que a exposição de 2 µM CuSO₄ levou ao aumento de NPSH em comparação com 1 e 10 µM, mas não quando comparado com o controle. Esse resultado pode ser sugestivo de uma possível tentativa de reverter o desequilíbrio na homeostase redox causado pela exposição ao metal ou pelo envolvimento de outros componentes do sistema de defesa antioxidante (FREEDMAN; CIRIOLO; PEISACH, 1989; RAY et al., 2020).

Quanto à avaliação da viabilidade celular, verificamos efeito dose-dependente com o aumento da concentração do CuSO₄, determinada através do ensaio da resazurina. Larvas de peixe-zebra apresentaram diminuição significativa na viabilidade celular, com exceção da menor concentração. O comprometimento das células sugere que a exposição ao cobre prejudica o metabolismo de mitocôndrias viáveis em reduzir a resazurina via NADH (O'BRIEN et al., 2000; PRÄBST et al., 2017). Esse resultado, pode sugerir o envolvimento do estresse oxidativo no metabolismo de mitocôndrias viáveis, tendo em vista que as ERO são danosas ao funcionamento da mitocôndria e, conseqüentemente, prejudiciais ao organismos (PAN et al., 2018; TIRICHEN et al., 2021 CHEN et al., 2022).

O envolvimento do estresse oxidativo na toxicidade do cobre em larvas de peixe-zebra foi constatado em nossos estudos. Vale ressaltar que o cobre, mesmo em concentrações incapazes de induzir altas taxas de mortalidade, é capaz de comprometer parâmetros bioquímicos e comportamentais, além de prejudicar o desenvolvimento dos organismos expostos (HERNÁNDEZ et al., 2006; JOHNSON;

CAREW; SLOMAN, 2007a; WEIR et al., 2019). Assim, torna-se evidente a relevância de monitoramentos ambientais, visto que a presença do cobre no ambiente prejudicou severamente parâmetros essenciais do desenvolvimento do peixe-zebra. Portanto, o cobre pode representar ameaças às demais espécies presentes na biota, principalmente organismos aquáticos, os quais são mais sensíveis à poluição por metais pesados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Demonstramos no presente trabalho, que o peixe-zebra é um ótimo modelo para o estudo da toxicidade do cobre. Nossos resultados mostraram que concentrações menores do que a permitida em água potável no Brasil prejudicou parâmetros comportamentais e bioquímicos em larvas de peixe-zebra. Assim como, reforçou a hipótese do envolvimento do estresse oxidativo como mecanismos de toxicidade do cobre. Além de correlacionar o prejuízo deste metal sobre o desenvolvimento em larvas de peixe-zebra e déficits locomotores e sensoriais. Desse modo, este organismo se mostra promissor em estudos ecotoxicológicos, visto que exhibe alta sensibilidade a menores concentrações, auxiliando na detecção de possíveis riscos relacionados à contaminação ambiental por metais. Porém, mais estudos são necessários para a compreensão de vias bioquímicas envolvidas na toxicidade deste metal.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar dos resultados terem demonstrado de modo eficiente a toxicidade do cobre em concentrações menores que as permitidas pela legislação brasileira, estudos adicionais são necessários. Principalmente na investigação desse metal na modulação de respostas inflamatórias, tendo em vista a relevância do papel da inflamação sob condições patológicas e a relação com doenças crônicas e degenerativas.

9 REFERÊNCIAS

AGUILAR, S. **Effect of Methylmercury Exposure on Heart and Skeletal Muscle Development in Zebrafish Embryos (Danio Rerio)**. Thesis—[s.l: s.n.].

AHMAD, R.; HUSSAIN, A.; AHSAN, H. Peroxynitrite: cellular pathology and implications in autoimmunity. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 40, n. 2, p. 123–138, 4 mar. 2019.

ALI, S. S. et al. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. e13145, 2020.

AROWOOGUN, J. et al. Rutin ameliorates copper sulfate-induced brain damage via antioxidative and anti-inflammatory activities in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 1, p. e22623, 2021.

BABCSÁNYI, I. et al. Copper Stable Isotopes To Trace Copper Behavior in Wetland Systems. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 10, p. 5520–5529, 20 maio 2014.

BAILONE, R. L. et al. “Zebrafish as an animal model for food safety research: trends in the animal research”. **Food Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 283–302, 2 out. 2019.

BALACHANDRAN, R. C. et al. Brain manganese and the balance between essential roles and neurotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 19, p. 6312–6329, 8 maio 2020.

BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. **Current topics in developmental biology**, v. 124, p. 331–367, 2017.

BARENYS, M. et al. Implementation of a functional endpoint to the zebrafish embryotoxicity test to evaluate craniofacial abnormalities. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 61, p. 104638, dez. 2019.

BELARBI, K. et al. Glycosphingolipids and neuroinflammation in Parkinson’s disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 15, p. 59, 17 out. 2020.

BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

BO, S. et al. Associations of Dietary and Serum Copper with Inflammation, Oxidative Stress, and Metabolic Variables in Adults. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 2, p. 305–310, 1 fev. 2008.

BOYLE, D.; CLARK, N. J.; HANDY, R. D. Toxicities of copper oxide nanomaterial and copper sulphate in early life stage zebrafish: Effects of pH and intermittent pulse exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, p. 109985, mar. 2020.

BRASIL. **PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021 - DOU - Imprensa Nacional**. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou>>. Acesso em: 22 jan. 2023.

BRIX, K. V. et al. Adverse Outcome Pathways for Chronic Copper Toxicity to Fish and Amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 2911–2927, 2022.

CASTELHANO GEBARA, R. et al. Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). **Environmental Toxicology and**

Chemistry, v. 40, n. 10, p. 2912–2922, out. 2021.

CECCONI, I. et al. Oxidative Modification of Aldose Reductase Induced by Copper Ion: DEFINITION OF THE METAL-PROTEIN INTERACTION MECHANISM *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 44, p. 42017–42027, 1 nov. 2002.

CHA, S.-H. et al. Palmitate induces nitric oxide production and inflammatory cytokine expression in zebrafish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 79, p. 163–167, ago. 2018.

CHAO, S.-J. et al. Transformation of copper oxide nanoparticles as affected by ionic strength and its effects on the toxicity and bioaccumulation of copper in zebrafish embryo. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 225, p. 112759, 1 dez. 2021.

CHATTERJEE, S. Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. Em: **Oxidative Stress and Biomaterials**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 35–58.

CHEN, G. et al. Adverse effects of SYP-3343 on zebrafish development via ROS-mediated mitochondrial dysfunction. **Journal of Hazardous Materials**, v. 437, p. 129382, 5 set. 2022.

CHEN, L.; MIN, J.; WANG, F. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 378, 23 nov. 2022.

CHOO, X. Y. et al. Neuroinflammation and Copper in Alzheimer's Disease. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2013, p. e145345, 28 nov. 2013.

COLWILL, R. M.; CRETON, R. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Behavioural processes**, v. 86, n. 2, p. 222–229, fev. 2011.

COOKE, M. S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 10, p. 1195–1214, 2003.

D'ALENÇON, C. A. et al. A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. **BMC Biology**, v. 8, n. 1, p. 151, 22 dez. 2010.

DAMMSKI, A. P. et al. **Zebrafish: Manual de Criação em Biotério**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná: [s.n.].

DAVIES, K. J. A. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. **IUBMB Life**, v. 50, n. 4–5, p. 279–289, 2000.

FASAE, K. D.; ABOLAJI, A. O. Interactions and toxicity of non-essential heavy metals (Cd, Pb and Hg): lessons from *Drosophila melanogaster*. **Current Opinion in Insect Science**, v. 51, p. 100900, 1 jun. 2022.

FLOHÉ, L. et al. Redox Regulation of NF-kappa B Activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 6, p. 1115–1126, 1997.

FREEDMAN, J. H.; CIRIOLO, M. R.; PEISACH, J. The Role of Glutathione in Copper Metabolism and Toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 10, p. 5598–5605, abr. 1989.

FU, Z.; XI, S. The effects of heavy metals on human metabolism. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 30, n. 3, p. 167–176, mar. 2020.

GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology, Environmental and Nutritional Interactions Antioxidant Nutrients and Environmental Health, Part C**. v. 189, n. 1, p. 147–163, 15 jul. 2003.

GOBBI, A. et al. Seasonal epiphytic microbial dynamics on grapevine leaves under biocontrol and copper fungicide treatments. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 681, 20 jan. 2020.

GOESSLING, W.; SADLER, K. C. Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1361–1377, 1 nov. 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [s.l.] Oxford University Press, 2007.

HAYASHI, M. et al. Hepatic Copper Accumulation Induces DNA Strand Breaks in the Liver Cells of Long-Evans Cinnamon Strain Rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, n. 1, p. 174–178, 16 set. 2000.

HERNÁNDEZ, P. P. et al. Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). **Hearing Research**, v. 213, n. 1–2, p. 1–10, mar. 2006.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, abr. 2013.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. DE. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170–1179, 2008.

ISLAM, B. UL et al. Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP). **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 4, p. 368–385, out. 2015.

JOHNSON, A.; CAREW, E.; SLOMAN, K. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 431–438, 30 out. 2007a.

JOHNSON, A.; CAREW, E.; SLOMAN, K. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 431–438, 30 out. 2007b.

JOMOVA, K. et al. Essential metals in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 367, p. 110173, 1 nov. 2022.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2–3, p. 65–87, maio 2011.

KADIM, M. K.; RISJANI, Y. Biomarker for monitoring heavy metal pollution in aquatic environment: An overview toward molecular perspectives. **Emerging Contaminants**, v. 8, p. 195–205, 1 jan. 2022.

KEIJ, F. M. et al. Zebrafish larvae as experimental model to expedite the search for new biomarkers and treatments for neonatal sepsis. **Journal of Clinical and Translational Science**, v. 5, n. 1, p. e140, 2021.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, jul. 1995.

KRUGER, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. Em: WALKER, J. M. (Ed.). **Basic Protein and Peptide Protocols**. Methods in Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, 1994. p. 9–15.

KUMAR, V.; PERKINS, J. A. **Robbins & Cotran Patologia: Bases Patológica das Doenças**. [s.l: s.n.].

KWOK, M. L.; CHAN, K. M. Oxidative stress and apoptotic effects of copper and cadmium in the zebrafish liver cell line ZFL. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 822–835, 2020.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227–231, abr. 1992.

LEITE, C. E. et al. Analytical method for determination of nitric oxide in zebrafish larvae: Toxicological and pharmacological applications. **Analytical Biochemistry**, v. 421, n. 2, p. 534–540, 15 fev. 2012.

LEITE, C. E. et al. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 3, p. 681–689, 1 nov. 2013.

LINBO, T. L. et al. Dissolved copper triggers cell death in the peripheral mechanosensory system of larval fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 597–603, 2006.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 5 dez. 2014.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, jul. 2008.

MENG, S. et al. Hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish following sub-chronic exposure to BDE-47 and BDE-153. **Environmental Toxicology**, v. 35, n. 11, p. 1202–1211, 2020.

MICHEREFF, S. J. **FUNDAMENTOS de Fitopatologia**. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/27103413-Fundamentos-de-fitopatologia.html>>. Acesso em: 21 jan. 2023.

MIR, A. R.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil. **Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine**, v. 34, n. 4, p. 737–759, ago. 2021.

NGUYEN, T. H. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of the Ethanol Extract of Clerodendrum Cyrtophyllum Turcz in Copper Sulfate-Induced Inflammation in Zebrafish. **Antioxidants**, v. 9, n. 3, p. 192, mar. 2020.

NGUYEN-CHI, M. et al. Transient infection of the zebrafish notochord with E. coli induces chronic inflammation. **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 7, p. 871–882, jul. 2014.

NUNES, M. E. M. et al. Acute Exposure to Permethrin Modulates Behavioral Functions, Redox, and Bioenergetics Parameters and Induces DNA Damage and Cell Death in Larval Zebrafish. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 9149203, 2019.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

OLIVARI, F. A.; HERNÁNDEZ, P. P.; ALLENDE, M. L. Acute copper exposure induces

oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. **Brain Research**, v. 1244, p. 1–12, 9 dez. 2008.

OLSON, H. et al. Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 56–67, 1 ago. 2000.

PAGANOTTO LEANDRO, L. et al. Behavioral changes occur earlier than redox alterations in developing zebrafish exposed to Mancozeb. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115783, jan. 2021.

PAN, Y.-X. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated Cd-induced hepatic lipid accumulation in zebrafish *Danio rerio*. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 199, p. 12–20, jun. 2018.

PANDA, P. et al. Biomarkers of Oxidative Stress Tethered to Cardiovascular Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. e9154295, 24 jun. 2022.

PARICHY, D. M. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. **eLife**, v. 4, 25 mar. 2015.

PARK, H. et al. Dinitramine induces cardiotoxicity and morphological alterations on zebrafish embryo development. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 240, p. 105982, nov. 2021.

PARNG, C. et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 1, n. 1 Pt 1, p. 41–48, nov. 2002.

PEDROZO, M. DE F. M.; LIMA, I. V. **Ecotoxicologia do cobre e seus compostos**. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/4336100-Ecotoxicologia-do-cobre-e-seus-compostos.html>>. Acesso em: 20 jan. 2023.

PENG, C. et al. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 831841, 2014.

PEREA-GARCÍA, A. et al. Deregulated High Affinity Copper Transport Alters Iron Homeostasis in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1106, 2020.

PEREIRA, T. C. B.; CAMPOS, M. M.; BOGO, M. R. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model: Copper-induced inflammation in zebrafish. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 7, p. 876–885, jul. 2016.

PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 8416763, 2017.

PRÄBST, K. et al. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. Em: GILBERT, D. F.; FRIEDRICH, O. (Eds.). **Cell Viability Assays**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2017. v. 1601p. 1–17.

PUBCHEM. **Copper**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23978>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

QIAO, R. et al. Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. **Science of The Total Environment**, v. 662, p. 246–253, 20 abr. 2019.

RAY, A. et al. Arsenic induced alteration in Mrp-1 like activity leads to zebrafish hepatocyte apoptosis: The cellular GSH connection. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 79, p. 103427, out. 2020.

RICHESTRFER, H.; CRÉTON, R. Automated high-throughput behavioral analyses in zebrafish larvae. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 77, p. e50622, 4 jul. 2013.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. **Radicais Livres E A Resposta Celular Ao Estresse Oxidativo**. 1ª edição ed. [s.l.] ULBRA, 2004.

SAMPAIO, F. G. **O uso do sulfato de cobre em ecossistemas aquáticos: fatores que afetam sua toxicidade em peixes de água doce**. - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/963179/o-uso-do-sulfato-de-cobre-em-ecossistemas-aquaticos-fatores-que-afetam-sua-toxicidade-em-peixes-de-agua-do-ce>>. Acesso em: 20 jan. 2023.

SANT, K. E.; TIMME-LARAGY, A. R. Zebrafish as a Model for Toxicological Perturbation of Yolk and Nutrition in the Early Embryo. **Current environmental health reports**, v. 5, n. 1, p. 125–133, mar. 2018.

SCHEIBER, I.; DRINGEN, R.; MERCER, J. F. B. Copper: Effects of Deficiency and Overload. Em: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O. (Eds.). **Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases**. Metal Ions in Life Sciences. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. v. 13p. 359–387.

SCHWARTZ, A. V. et al. Mathematical modeling of the interaction between yolk utilization and fish growth in zebrafish, *Danio rerio*. **Development**, v. 148, n. 9, p. dev193508, 7 maio 2021.

SHEN, X. et al. Evaluating the treatment effectiveness of copper-based algacides on toxic algae *Microcystis aeruginosa* using single cell-inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 21, p. 5531–5543, 1 ago. 2019.

SILVA, L. A. et al. COBRE: PRODUÇÃO INDUSTRIAL E APLICAÇÕES. **Química Nova**, v. 42, p. 1154–1161, 14 fev. 2020.

SIMONETTI, R. et al. **ZEBRAFISH (Danio rerio): THE FUTURE OF ANIMAL MODEL IN BIOMEDICAL RESEARCH**. [s.l.: s.n.].

STREISINGER, G. et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, v. 291, n. 5813, p. 293–296, maio 1981.

SYNHAIVSKA, O. et al. Single-Particle Resolution of Copper-Associated Annular α -Synuclein Oligomers Reveals Potential Therapeutic Targets of Neurodegeneration. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 1410–1421, 4 maio 2022.

TAO, M. et al. Environmental impact of mining and beneficiation of copper sulphate mine based on life cycle assessment. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 29, n. 58, p. 87613–87627, dez. 2022.

TASLIMA, K. et al. Impacts of heavy metals on early development, growth and reproduction of fish – A review. **Toxicology Reports**, v. 9, p. 858–868, 1 jan. 2022.

TIRICHEN, H. et al. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress. **Frontiers in Physiology**, v.

12, 2021.

TISATO, F. et al. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. **Medicinal Research Reviews**, p. n/a-n/a, 2009.

TSANG, T. et al. Copper is an essential regulator of the autophagic kinases ULK1/2 to drive lung adenocarcinoma. **Nature Cell Biology**, v. 22, n. 4, p. 412–424, abr. 2020.

VAZIRI, N. D.; RODRÍGUEZ-ITURBE, B. Mechanisms of Disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 2, n. 10, p. 582–593, out. 2006.

VIVES-BAUZA, C.; STARKOV, A.; GARCIA-ARUMI, E. Measurements of the Antioxidant Enzyme Activities of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase. Em: **Methods in Cell Biology**. [s.l.] Elsevier, 2007. v. 80p. 379–393.

WEIR, S. M. et al. Acute toxicity of copper to the larval stage of three species of ambystomatid salamanders. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 28, n. 9, p. 1023–1031, nov. 2019.

WILLIAMS, S. Y.; RENQUIST, B. J. High Throughput Danio Rerio Energy Expenditure Assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 107, p. 53297, 27 jan. 2016.

WILSON, C. Aspects of Larval Rearing. **ILAR Journal**, v. 53, n. 2, p. 169–178, 1 jun. 2012.

WITESKA, M. et al. The effects of cadmium and copper on embryonic and larval development of the *Leuciscus idus* L. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 151–163, fev. 2014.

YANG, F. et al. Copper induces oxidative stress and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in chicken hepatocytes. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 54, p. 310–316, fev. 2019.

YANG, F. et al. Heavy metals in soil from gangue stacking areas increases children health risk and causes developmental neurotoxicity in zebrafish larvae. **The Science of the Total Environment**, v. 794, p. 148629, 10 nov. 2021.

ZHANG, L. et al. Copper-induced oxidative stress, transcriptome changes, intestinal microbiota, and histopathology of common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 246, p. 114136, 1 nov. 2022.

ZHANG, T. et al. Transcriptional Responses and Mechanisms of Copper-Induced Dysfunctional Locomotor Behavior in Zebrafish Embryos. **Toxicological Sciences**, v. 148, n. 1, p. 299–310, 1 nov. 2015.

ZHAO, G. et al. Copper induce zebrafish retinal developmental defects via triggering stresses and apoptosis. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, p. 45, 14 mar. 2020.

ZHU, X.-Y. et al. Fenobucarb-induced developmental neurotoxicity and mechanisms in zebrafish. **Neurotoxicology**, v. 79, p. 11–19, jul. 2020.