



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DE CURTUME
EM DIFERENTES MODELOS ANIMAIS**

FELIPE DOS SANTOS MOYSÉS

Porto Alegre

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DE CURTUME
EM DIFERENTES MODELOS ANIMAIS**

FELIPE DOS SANTOS MOYSÉS

Orientadora: Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Fisiologia.

Porto Alegre

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Professores e Funcionários, assim como à CAPES e CNPq pela bolsa concedida.

À Professora Ionara Rodrigues Siqueira, pela confiança depositada, pelo exemplo profissional e por todos os ensinamentos, que foram essenciais para minha formação tanto de pesquisador como pessoa.

Aos Professores Marco Antônio Siqueira Rodrigues e Léder Leal Xavier, pela disposição e comprometimento.

Às Professoras Ilma Simoni Brum da Silva, Maria Flávia Ribeiro e Iraci da Silva Torres, que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos meus colegas de laboratório Christiano, Karine, Gisele, Viviane, Louisiana, Arthiese, Carla, Laura, Wagner, Gabriel e Bruna, pela parceria, amizade e comprometimento.

Aos meus colegas e parceiros de doutorado Eduardo Sanches, Gustavo, Rafael, Taína, Liciane e Isabel Macedo, pela amizade e parceria.

Aos meus pais, Bady e Patrícia, meus irmãos, Ana Laura e Eduardo, e ao Guilherme “Brae”, assim como meus avós que foram os maiores incentivadores. Devo isto a vocês.

À Érica, pelo carinho, companheirismo e apoio incondicional. Sou muito grato a ti por tudo.

A todos meus amigos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“O conhecimento nos faz responsáveis.”

Ernesto Rafael Guevara de la Serna

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| AGRADECIMENTOS | i |
| LISTA DE FIGURAS | vi |
| LISTA DE TABELAS | vii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | viii |
| RESUMO | x |
| ABSTRACT..... | xii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. EFLUENTES DE CURTUME | 3 |
| 1.2. ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE EFLUENTES DE CURTUME..... | 4 |
| 1.3. TOXICIDADE DE XENOBIÓTICOS E O SISTEMA ENZIMÁTICO | |
| ANTIOXIDANTE..... | 6 |
| 2. OBJETIVOS..... | 9 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 10 |
| 2.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICO SEÇÃO I | 10 |
| 2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICO SEÇÃO II | 10 |
| 3. ABORDAGEM METODOLÓGICA..... | 11 |
| 3.1. EFLUENTE DE CURTUME | 12 |
| 3.2. ABORDAGEM METODOLÓGICA SEÇÃO I | 14 |
| 3.2.1. ANIMAIS | 14 |
| 3.2.2. PREPARAÇÃO DOS TECIDOS E INCUBAÇÃO..... | 14 |
| 3.2.3. DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS | 15 |
| 3.2.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE ... | 15 |
| 3.2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE . | 16 |

| | |
|--|----|
| 3.2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE | 16 |
| 3.2.7. DOSAGEM DE PROTEÍNA..... | 16 |
| 3.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 17 |
| 3.3. ABORDAGEM METODOLÓGICA SEÇÃO II | 17 |
| 3.3.1. DROSOPHILA MELANOGASTER | 17 |
| 3.3.2. EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DE CURTUME | 18 |
| 3.3.3. AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE | 18 |
| 3.3.4. PREPARAÇÃO DOS HOMOGENEIZADOS | 18 |
| 3.3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE ... | 19 |
| 3.3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE . | 19 |
| 3.3.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA S- TRANSFERASE | 19 |
| 3.3.8. DOSAGEM DE PROTEÍNAS | 20 |
| 3.3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 20 |
| 4. RESULTADOS..... | 21 |
| 4.1. RESULTADOS DA SEÇÃO I | 22 |
| 4.1.1. NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS | 22 |
| 4.1.2. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE | 24 |
| 4.1.3. ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE..... | 25 |
| 4.1.4. ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE | 26 |
| 4.2. RESULTADOS DA SEÇÃO II | 28 |
| 4.2.1. MORTALIDADE | 28 |
| 4.2.2. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE | 29 |

| | |
|--|----|
| 4.2.3. ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE | 30 |
| 4.2.4. ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE | 31 |
| 5. DISCUSSÃO | 32 |
| 6. CONCLUSÃO | 41 |
| 7. PERSPECTIVAS..... | 43 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 45 |
| 9. ANEXOS..... | 51 |
| ANEXO 1 – Artigo 1..... | 52 |
| ANEXO 2 – Artigo 2..... | 79 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre os níveis de espécies reativas no fígado de camundongos e ratos.. | 22 |
| Figura 2. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da glutationala peroxidase no fígado de camundongos e ratos. | 25 |
| Figura 3. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da glutationala S-transferase no fígado de camundongos e ratos. | 27 |
| Figura 4. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da superóxido dismutase em machos e fêmeas adultos de <i>Drosophila melanogaster</i> | 29 |
| Figura 5. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da glutationala peroxidase em machos e fêmeas adultos de <i>Drosophila melanogaster</i> | 30 |
| Figura 6. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da glutationala S-transferase em machos e fêmeas adultos de <i>Drosophila melanogaster</i> .. | 31 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Propriedades físico-químicas do efluente de curtume. | 12 |
| Tabela 2. Caracterização dos compostos orgânicos do efluente de curtume através da avaliação qualitativa por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS). | 13 |
| Tabela 3. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre os níveis das espécies reativas em cerebelo, córtex e hipocampo de camundongos e ratos. | 23 |
| Tabela 4. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da superóxido dismutase em cerebelo e hipocampo de ratos e camundongos. | 24 |
| Tabela 5. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da glutationala peroxidase em áreas cerebrais de camundongos e ratos. | 26 |
| Tabela 6. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da glutationala S-transferase em cerebelo e hipocampo de camundongos e ratos. | 28 |
| Tabela 7. Mortalidade <i>Drosophila melanogaster</i> adultas expostos a diferentes concentrações de efluentes de curtume por 72h. | 29 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| AICSUL | Associação da Indústria de Curtumes do Rio Grande do Sul |
| ANOVA | Análise de Variância |
| °C | Grau Célsius |
| CA | Califórnia |
| CDNB | 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno |
| CREAL | Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório |
| <i>D. melanogaster</i> | <i>Drosophila melanogaster</i> |
| DBO5 | Demanda Biológica de Oxigênio. |
| DQO | Demanda Química de Oxigênio |
| GC/MS | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas |
| DCFH | 2'7'-diclorofluoresceína |
| DCFH-DA | 2'7'-diclorofluoresceína diacetato |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| FEEPS | Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde |
| g | Grama |
| GSH | Glutathiona |
| GPx | Glutathiona peroxidase |
| GST | Glutathiona S-transferase |
| h | Hora |
| KW | Kruskal-Wallis |
| L | Litro |
| m | Metro |
| m³ | Metro cúbico |
| M | Molar |
| mg | Miligrama |

| | |
|--------------|---|
| mg/L | Miligramas por litro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| ms | Milissegundo |
| m/z | Massa sobre a carga |
| NADPH | Nicotinamida adenina fosfato-oxidase |
| nm | Nanômetro |
| nmol | Nanomolar |
| ONU | Organização das Nações Unidas |
| pH | Potencial de hidrogênio |
| PMSF | Fluoreto de FenilMetilsulfonila |
| PUCRS | Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul |
| RS | Rio Grande do Sul |
| SH | Tiol |
| SOD | Superóxido dismutase |
| U | Unidade |
| UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul |
| µm | Micrômetro |

RESUMO

Atualmente, o aumento da produção industrial, assim como várias ações humanas, resultam no lançamento de substâncias químicas no meio ambiente. Entre os diversos poluentes, o efluente proveniente da indústria do couro é considerado um dos maiores contaminantes dos recursos hídricos. Neste contexto, o estresse oxidativo é sugerido como um dos mecanismos bioquímicos da toxicidade de vários contaminantes ambientais, e alterações nas atividades de enzimas responsáveis pela detoxificação de xenobióticos podem ser utilizadas no monitoramento dos efeitos nocivos destas substâncias. Assim, este trabalho teve como objetivo central avaliar o efeito da exposição ao efluente de curtume sobre parâmetros oxidativos, principalmente por meio da avaliação das atividades de enzimas antioxidantes em diferentes modelos animais, roedores e insetos.

Na primeira etapa, avaliou-se os efeitos da exposição *in vitro* ao efluente de curtume sobre o estado oxidativo e as atividades da superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase em estruturas cerebrais (córtex, estriado e hipocampo) e fígado de ratos e camundongos. No fígado, observou-se que a exposição ao efluente de curtume induziu um aumento nas atividades das glutathione peroxidase e glutathione S-transferase nos ratos, enquanto que, em camundongos não houve alterações nas atividades destas enzimas. Em relação à formação das espécies reativas, observou-se um aumento no fígado dos camundongos, e o mesmo não foi detectado em ratos. Este resultado pode estar relacionado com o aumento nas atividades da glutathione peroxidase e glutathione S-transferase, já que estas enzimas são relacionadas com detoxificação de xenobióticos. Nas estruturas cerebrais, a exposição ao efluente de curtume induziu efeitos similares em ratos e camundongos, uma vez que houve um aumento nos níveis de espécies reativas no cerebelo, hipocampo e córtex, assim como um perfil semelhante na atividade das enzimas avaliadas nestas estruturas. Estes resultados sugerem que camundongos são mais

suscetíveis já que a exposição não ocasionou um aumento nas atividades das enzimas do sistema glutathiona no fígado, indicando que a biodisponibilidade central dos compostos presentes no efluente de curtume pode ser maior em camundongos.

Na segunda etapa, avaliou-se os efeitos da exposição de *Drosophila melanogaster* adultas por 72 horas ao efluente de curtume. Após a exposição, foi quantificada a mortalidade e as atividades da superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e glutathiona S-transferase. Neste estudo, observou-se um aumento da letalidade. Foi detectado também, um aumento na atividade da glutathiona peroxidase. No entanto, observou-se decréscimo na atividade de glutathiona S-transferase nas moscas expostas ao contaminante. Considerando estes resultados, é possível sugerir que a exposição ao efluente proveniente do curtume pode alterar o sistema antioxidante enzimático, e que *Drosophila melanogaster* parece ser um bom modelo para avaliar a toxicidade induzida pelo efluente de curtume.

Os resultados desta Tese apoiam a ideia de que alterações no sistema antioxidante enzimático podem estar relacionadas com efeitos tóxicos da exposição ao efluente de curtume, e que, em parte, estas alterações podem elucidar o mecanismo pelo qual o contaminante causa resposta divergente em roedores, além de que os compostos deste efluente podem impactar na sobrevivência e no sistema antioxidante de insetos adultos.

ABSTRACT

Actually, chemicals have been widely released to the environment. Among the many pollutants emitted into the environment, the effluent from the leather industry is considered one of the greatest contamination of water resources. In this context, the oxidative stress has been suggested as a central biochemical mechanism of toxicity from several environmental toxicants, and changes in the enzymes activities responsible for the detoxification of xenobiotics can be used in monitoring the harmful effects of these substances. Thus, this study aimed to evaluate the effect of exposure to tannery wastewater on oxidative parameters, and mainly studying the enzymatic activities in different animal models.

In the first step of this study, it was evaluated the effects of *in vitro* exposure to tannery wastewater on oxidative status, and activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase in brain structures (cortex, striatum and hippocampus) and liver of the rats and mice. It was observed that exposure to tannery wastewater induced an increase in the activity of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase in the rats liver, whereas no changes were detected in the hepatic enzymes in mice. Regarding the formation of reactive species, there was an increase in the mice liver, and it was not detected any effect in rat liver. This result may be related to the increase in the activity of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase since these enzymes have been related to detoxification of xenobiotics. Exposure to effluent induced similar effects in brain structures from rats and mice, since there was an increased in the free radical levels in the cerebellum, hippocampus and cortex, as well as a similar profile in the activity of the enzymes evaluated in these brain structures from both species. These results suggest that mice are more susceptible since the exposure did not cause an increase in the activity of the enzymes glutathione system in the liver, indicating that the central bioavailability of the compounds in tannery wastewater may be higher in mice.

In the second section, it was evaluated the effects of exposure of adult *Drosophila melanogaster* placed for 72 hours with tannery effluent. After exposure, mortality was quantified, and it was evaluated the activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase. In this work, exposure to tannery effluent induced lethality in flies. We also detected an increase in glutathione peroxidase activity. However, there was a decrease in the glutathione S-transferase activity in flies exposed to contaminant. Considering these results, it is possible to suggest that exposure to tannery effluent can modify the enzymatic antioxidant system in insects, and *Drosophila melanogaster* is a reliable model to evaluate the toxicity induced by tannery wastewater.

The results of this study support the idea that alterations in enzymatic antioxidant system may be associated with toxic effects of exposure to tannery wastewater and, in part, these changes can clarify the mechanism by which the contaminant causes a divergent response in rodents and insects.

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU), a população global, que era de aproximadamente 2,6 bilhões de habitantes na metade do século XX, atualmente é estimada em aproximadamente 7 bilhões habitantes (Organização das Nações Unidas, 2014). Esta explosão populacional ocasiona o aumento da produção de bens de consumo (Chen et al., 2006), gerando, inevitavelmente, uma grande quantidade de resíduos, como efluentes industriais, esgotos cloacais e chorume.

Quando manuseados e depositados de forma inapropriada, os resíduos submetem os recursos naturais a graves pressões comprometendo também os recursos hídricos. Estima-se que um terço da população mundial enfrentará a falta de água até 2025, devido à poluição, à destruição de mananciais e à falta de gerenciamento adequado dos recursos hídricos (Marengo, 2008). Com as perspectivas de escassez de água potável, acredita-se que a água terá um alto valor econômico, já que a carência de um produto é um dos fatores que influencia o valor de mercado.

O monitoramento ambiental é multidisciplinar, agregando diversas áreas do conhecimento, como a química, a biologia molecular, a bioquímica, a toxicologia, a fisiologia, entre outras. No entanto, as ferramentas utilizadas atualmente para monitoramento ambiental estimam apenas pontualmente os níveis de poluição. Assim, analisar a identificação e quantificação de elementos tóxicos em conjunto com uma avaliação dos mecanismos de interação entre os elementos químicos e seus alvos biológicos é considerada uma estratégia essencial (Apostoli, 1998; Łobiński et al., 1998).

O estudo da interação entre xenobióticos e diversos constituintes biológicos, que permita reconhecer alterações moleculares mínimas, é uma alternativa importante para o monitoramento ambiental (Łobiński et al., 1998). Alterações bioquímicas em organismos vivos são sugeridas como indicadores de exposição a contaminantes.

Considerando que a toxicidade é mediada por processos biológicos, a detecção precoce de respostas bioquímicas, pode preceder efeitos em proporções maiores e mais drásticas. Aparece como promissora a avaliação de dano em macromoléculas, tais como DNA, proteínas e lipídeos. Além disso, alterações bioquímicas em moléculas, especialmente enzimas antioxidantes e as responsáveis pela detoxificação de xenobióticos, podem ser utilizadas para o monitoramento dos efeitos tóxicos (Shen et al., 2003).

1.1. EFLUENTES DE CURTUME

A indústria do couro é considerada um dos maiores poluidores na atualidade, principalmente em países em desenvolvimento, como Brasil, China, Paquistão e Índia (Prabakaran et al., 2007; Tare et al., 2003). Buljan (1996) relatou que a quantidade total de produtos químicos utilizados no processamento de couro em todo o mundo foi quase 4 milhões de toneladas, produzindo mais de 300 milhões de toneladas de águas residuais. O Brasil detém o segundo lugar no *ranking* mundial de produtores de peles bovinas, sendo o estado do Rio Grande do Sul um dos principais produtores de couros do País (Aquim, 2009). De acordo com a “Associação da Indústria de Curtumes do Rio Grande do Sul (AICSUL) em 2012, há no Rio Grande do Sul 95 curtumes, que são responsáveis por 30% da exportação do couro brasileiro (Giannetti et al., 2004). Considerando-se um consumo de 1m³ de água residuária por pele processada (Koetz et al., 1995), segundo dados da AICSUL, ter-se-ia um despejo de 10 milhões de m³ de água por ano no estado.

O processamento do couro utiliza uma grande quantidade e variedade de agentes químicos considerados subprodutos do processo de produção. Os principais componentes incluem altas concentrações de substâncias, tais como bactericidas,

taninos (compostos polifenólicos), surfactantes, óleos sulfonados, corantes, biocidas, resinas acrílicas, ácidos orgânicos, bem como sais de amônio, de crómio, de cloreto, e de sulfureto (Bajza e Vrcek, 2001; Prabakaran et al., 2007; Tare et al., 2003). Assim, as águas residuais provenientes dos curtumes são muito complexas, pois estas substâncias potencialmente tóxicas podem induzir um efeito individual e, ainda, podem ocorrer interações, como efeito sinérgico, gerando um risco de magnitude desconhecida para os organismos vivos pertencentes a diferentes níveis tróficos (Siddique et al., 2005; Tigini et al., 2011).

1.2. ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE EFLUENTES DE CURTUME

Estudos ecotoxicológicos que avaliam a toxicidade dos efluentes de curtume, normalmente estão associados ao uso de organismos como algas (ex. *Selenastrum capricornutum*), micro-crustáceos (ex. *Daphnia pulex*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*), crustáceos (ex. *Hyalella azteca*,) e peixes (ex. *Oreochromis mossambicus*, *Gymnogeophagus gymnogeophagus*) (Júnior et al., 2007; Oral et al., 2007; Tagliari et al., 2004). Na maioria dos casos, estes estudos avaliam parâmetros como genotoxicidade e letalidade.

Um estudo realizado na Turquia mostrou que a exposição a efluentes de curtume causou teratogenicidade em espécies de ouriço-do-mar, *Paracentrotus lividus* e *Spharechinus granularis*, além de provocar imobilidade de *Daphnia magna* e redução do crescimento da alga *Selenastrum capricornutum* (Oral et al., 2007). A diminuição no crescimento foi detectada também na alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, sendo esta considerada um bom modelo para avaliar a toxicidade do efluente de curtume (Tigini et al., 2011). Foi demonstrada a genotoxicidade utilizando *Allium cepa* (“cebola”) de amostras de água e de sedimento de rio contaminado com

efluentes de curtume e descargas domésticas em Estância Velha-RS, assim como efeitos tóxicos em organismos bioindicadores como *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* e *Hyalella azteca* (Júnior et al., 2007).

Utilizando o ensaio Salmonella/microsoma, Tagliari e colaboradores (2004) encontraram uma importante atividade mutagênica em amostras coletadas em pontos de deposição de efluentes urbanos e coureiro-calçadista dos rios Cadeia e Feitoria, que são formadores da bacia hidrográfica do Lago Guaíba no Rio Grande do Sul, Brasil. Corroborando estes dados, outro estudo semelhante constatou citotoxicidade e potencial mutagênico em amostras de água e extratos orgânicos de sedimento coletados nos rios Cadeia e Feitoria, associando estes resultados à complexidade das interações dos diferentes grupos de compostos presentes nas amostras testadas (Vargas et al., 2007).

Alguns estudos com peixes expostos ao efluente de curtume, como o *Etroplus suratensis* mostraram um aumento na mortalidade e ação citotóxica (Taju et al., 2012), enquanto que em espécies de tilápia, *Oreochromis mossambicus*, ocorreu uma drástica redução na resposta imune (Tagliari et al., 2004), bem como genotoxicidade em *Oreochromis niloticus* (Matsumoto et al., 2006).

Apesar de considerados bons marcadores de toxicidade, há poucos estudos com efluente de curtume utilizando insetos como modelo. Estudos com *Drosophila melanogaster* demonstraram que a exposição a lixiviados provenientes dos curtumes causou genotoxicidade nos organismos expostos (Chandra et al., 2006; Siddique et al., 2005), e isso pode ter ocorrido devido a presença de metais carcinógenos/mutagênico, não sendo descartado também o efeito sinérgico de outras substâncias potencialmente tóxicas (Siddique et al., 2005).

Estudos ecotoxicológicos utilizando mamíferos como animais de experimentação são raros, assim os dados de toxicidade de efluentes nesta classe são escassos. No trabalho de Kumar e colaboradores (2008), a exposição crônica de

ratos ao efluente de curtume aumentou o peso de todos os órgãos andrógeno-dependentes avaliados, como a próstata e vesícula seminal, e ocasionou deformações nos túbulos seminíferos com sinais de hiperplasia testicular. Associado a isso, houve um aumento na produção diária de espermatozoides e nos níveis séricos de testosterona nas concentrações mais altas, sendo todos os resultados atribuídos aos efeitos androgênicos de um ou mais xenobióticos presentes neste contaminante.

Estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que a exposição crônica ao efluente de curtume foi ansiogênica para camundongos (Siqueira et al., 2011), enquanto que em ratos não alterou nenhum dos parâmetros comportamentais em modelos animais de locomoção, ansiedade, memória e preditivo de depressão (Moysés et al., 2014). Apesar destes achados, ao nosso conhecimento não existem estudos que relatam os mecanismos bioquímicos envolvidos nesta diferença de resposta a exposição ao efluente de curtume. É essencial ponderar que estes estudos podem ter aplicação tanto em seres humanos quanto em outras espécies da classe Mammalia que utilizam corpos d'água com despejo de efluentes como fonte de água de consumo.

1.3. TOXICIDADE DE XENOBIÓTICOS E O SISTEMA ENZIMÁTICO ANTIOXIDANTE

Muitos estudos têm sugerido o estresse oxidativo como mecanismo bioquímico central na toxicidade de diversos agentes tóxicos ambientais (El-Demerdash, 2011; Franco et al., 2009). Alguns contaminantes podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, assim como, modificar a capacidade antioxidante (Brocardo (Brocardo et al., 2005; Franco et al., 2009). Este desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e as defesas pode danificar fosfolípidios na membrana plasmática, DNA e proteína (Bergamini et al., 2004; Dean et al., 1997; Muthuswamy et al., 2006).

As células possuem um sistema antioxidante, enzimático e não-enzimático, que interagem e se regeneram em um complexo sistema de ciclos. O sistema antioxidante não-enzimático conta com a vitamina E (tocoferol), a vitamina C (ascorbato ou ácido ascórbico), a glutathiona (GSH) e o ubiquinol, entre outros. O sistema enzimático contém proteínas evolutivamente conservadas, tais como a superóxido dismutase (SOD), que converte $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 , a catalase, relacionada com a remoção de H_2O_2 , e a glutathiona peroxidase (GPx), envolvida na remoção de peróxidos (Halliwell e Chirico, 1993). Além disso, a glutathiona S-transferase (GST) pode contribuir como antioxidante (Board e Menon, 2013), e desempenha um papel importante na detoxificação de xenobióticos através da conjugação do grupo tiol (SH) da GSH, produzindo formas menos tóxicas e facilitando sua excreção pelo organismo (Habig et al., 1974; Pickett e Lu, 1989).

Alguns trabalhos relacionam alterações do sistema enzimático com a exposição ao efluente de curtume, como no estudo de Tagliari e colaboradores (2004), em que houve aumento da atividade da SOD e do dano lipídico em células hepáticas, assim como diminuição da concentração de citocromos P450 e b5 em uma espécie de peixe ósseo, *Gymnogeophagus gymnogenys*, coletado em um local contaminado por despejos provenientes da indústria do couro. Já a exposição crônica de alevinos de *Labeo rohita* ao efluente de curtume causou um aumento das atividades de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase em diferentes tecidos avaliados (Dhanapakiam et al., 2006).

Estudos prévios do nosso laboratório demonstram que a exposição crônica de ratos Wistar ao efluente de curtume, não alterou o conteúdo de espécies reativas, as medidas de lipoperoxidação, assim como as atividades da SOD e acetilcolinesterase nas estruturas cerebrais avaliadas, corroborando dados comportamentais encontrados (Moysés et al., 2014). Também não houve indícios de hepatotoxicidade, avaliada através do conteúdo de espécies reativas, medidas de lipoperoxidação e atividade da

enzima catalase no fígado de ratos, assim como não houve alterações dos níveis séricos de albumina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase nestes animais (Moyses, 2010).

Nossa hipótese de trabalho é de que a exposição ao efluente de curtume *in vitro* em ratos e camundongos possa diferentemente alterar parâmetros oxidativos, o que poderá auxiliar na elucidação das diferenças comportamentais encontradas em estudos anteriores em roedores, bem como melhor compreender os mecanismos de toxicidade deste xenobiótico.

Além de que, o efeito da exposição deste efluente sobre insetos foi pouco estudado. Do nosso conhecimento, somente a exposição de larvas de *Drosophila melanogaster* à lixiviados preparados a partir do efluente de curtume foi estudada, sendo que, este tratamento induziu estresse oxidativo nesta fase do desenvolvimento das moscas (Siddique et al., 2008). Assim, nossa hipótese é que o efluente de curtume altere parâmetros oxidativos em machos e fêmeas adultas destes insetos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta Tese foi avaliar o efeito da exposição ao efluente de curtume sobre o estado oxidativo em diferentes espécies.

2.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICO SEÇÃO I

- I. Avaliar o efeito *in vitro* do efluente de curtume sobre o conteúdo de espécies reativas em cerebelo, córtex, estriado, hipocampo e fígado de ratos e camundongos.
- II. Investigar o efeito *in vitro* do efluente de curtume sobre a atividade da enzima superóxido dismutase em cerebelo, córtex, estriado, hipocampo e fígado de ratos e camundongos.
- III. Estudar o efeito *in vitro* do efluente de curtume sobre a atividade da enzima glutaciona peroxidase em cerebelo, córtex, estriado, hipocampo e fígado de ratos e camundongos.
- IV. Avaliar o efeito *in vitro* do efluente de curtume sobre a atividade da enzima glutaciona S-transferase em cerebelo, córtex, estriado, hipocampo e fígado de ratos e camundongos.

2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICO SEÇÃO II

- I. Avaliar o efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a mortalidade de *Drosophila melanogaster*
- II. Estudar o efeito da exposição *in vivo* ao efluente de curtume sobre a atividade da enzima superóxido dismutase de *Drosophila melanogaster*.
- III. Investigar o efeito da exposição *in vivo* ao efluente de curtume sobre a atividade da enzima glutaciona peroxidase de *Drosophila melanogaster*..
- IV. Avaliar o efeito da exposição *in vivo* ao efluente de curtume sobre a atividade da enzima glutaciona S-transferase de *Drosophila melanogaster*.

3. ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1. EFLUENTE DE CURTUME

O efluente utilizado no estudo foi disponibilizado pelo Professor Dr. Marco Antônio Siqueira Rodrigues do Centro Universitário Feevale, sendo coletado após o seu tratamento convencional em um curtume localizado na região do Vale dos Sinos, Rio Grande do Sul, Brasil. Após a coleta, foram determinadas as caracterizações físico-químicas (Tabela 1) e a determinação dos compostos orgânicos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS; Clarus 680; Perkin Elmer), em que os estratos foram evaporados com um fluxo de nitrogênio até a secura, e foram reconstituídos no volume final de 1mL de solventes ou mistura de solventes das devidas frações. A avaliação qualitativa foi feita nas seguintes condições: modo *scan* com faixa de varredura (m/z) de 30 a 400 μ e coluna RTX 5ms 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Tabela 2).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do efluente de curtume.

| Parâmetro | Água Potável | Efluente de Curtume |
|--|--------------|---------------------|
| DQO (mgO ₂ /L) | 8 | 320 |
| DBO ₅ (mgO ₂ /L) | 6 | 240 |
| pH | 7,8 | 7 |
| Sólido Total (mg/L) | 142 | 10469 |
| Nitrogênio Total (mg/L) | 3,3 | 180 |
| Nitrogênio Amoniacal (mg/L) | 5,4 | 90 |
| Cloretos (mg/L) | 10,4 | 3650 |
| Fósforo (mg/L) | 0,04 | 0,9 |
| Cromo Total (mg/L) | < 0,01 | 0,3 |
| Cálcio Total (mg/L) | 9,8 | 218 |
| Magnésio Total (mg/L) | 5,4 | 198 |
| Sódio Total (mg/L) | 8,7 | 2800 |

DQO: Demanda Química de Oxigênio; DBO₅: Demanda Biológica de Oxigênio.

Tabela 2. Caracterização dos compostos orgânicos do efluente de curtume através da avaliação qualitativa por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS).

| Solvente de Extração | Tempo de Retenção (min) | Efluente de Curtume |
|------------------------------|--------------------------------|--|
| Hexano | | Fração A |
| | 18,08 | Tetrametil decano |
| | 19,76 | Hexadeceno |
| | 19,86 | Hexadecano |
| | 20,19 | Metil tiobenzotiazolo |
| | 21,87 | Metil isopropilheptano |
| | 22,54 | Octadeceno |
| | 22,64 | Octadecano |
| | 23,66 | Diisobutilftalato |
| | 24,62 | Hexiltetradecil éster do ácido sulfuroso |
| | 27 | Ácido Octadecanóico |
| | 28,52 | Tricosano |
| | 29,55 | Tetracosano |
| | 30,54 | Pentacosano |
| | 31,14 | Diocetilftalato |
| | 31,5 | Hexacosano |
| | 32,43 | Heptacosano |
| 33,32 | Octacosano | |
| 34,19 | Nonacosano | |
| 36 | Triacontano | |
| 37,08 | Entriacontano | |
| Diclorometano/hexano | | Fração B |
| | 22,95 | Heptasiloxano |
| | 24,09 | Ftalato |
| | 26,64 | Ciclooctasiloxano |
| | 28,52 | Octadecilpropilester do ácido sulfuroso |
| | 30,05 | Octacosano |
| | 31,51 | Nonacosano |
| Metanol/diclorometano | | Fração C |
| | 20,2 | Nitroanilina |
| | 31,14 | Diisooctilftalato |
| | 33,67 | Squaleno |
| | 33,76 e 33,99 | Ftalatos |

Extrações com diferentes solventes (hexano, diclorometano/hexano e metanol/diclorometano) foram realizadas. As análises de MS foram conduzidas nas seguintes condições: modo scan com faixa de varredura de 30 a 400 u e coluna RTX 5ms 30m x 0,25mm x 0,25µm. A identificação dos compostos foi baseada na comparação da massa espectral com a massa espectral do banco de dados (NIST Mass Spectral Library MS-2008).

3.2. ABORDAGEM METODOLÓGICA SEÇÃO I

3.2.1. ANIMAIS

Camundongos Swiss albino (linhagem CF1) machos adultos com 3-5 meses de idade, foram fornecidos pela Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde (FEPPS), em Porto Alegre - RS, e ratos Wistar machos adultos com idades entre 3-5 meses foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram colocados em caixas (cinco por caixa) com alimento e água *ad libitum*, e mantidos em condições padrão (ciclo claro/escuro de 12h de luz, 22 ± 2 °C). Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa local Institucional (Comissão de Ética no Uso de Animais / UFRGS # 21234). O máximo de precaução foi tomado com o intuito de minimizar o sofrimento e de reduzir o número de animais utilizados, sendo que todos os experimentos estiveram de acordo com os critérios estabelecidos na Lei Arouca (11.794) e com as recomendações do "Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório" (publicação NIH No. 80-23, revista em 2011).

3.2.2. PREPARAÇÃO DOS TECIDOS E INCUBAÇÃO

Os animais foram decapitados, e os cérebros e fígados foram imediatamente removidos e colocados em solução fisiológica gelada. O córtex, corpo estriado, hipocampo e fígado foram rapidamente dissecados e colocados em nitrogênio líquido, e posteriormente armazenados a -80°C até a realização dos ensaios. Para o ensaio da atividade da glutathione-S-transferase, as amostras foram homogeneizadas em um volume de 1:10 em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Para os demais ensaios, as estruturas cerebrais e o fígado foram homogeneizadas em um volume de 1:10 em

tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4) contendo 140 mM KCl e 1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As estruturas encefálicas foram agrupadas em “pool” de duas amostras na homogeneização. Os homogeneizados foram centrifugados a 1000xg durante 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios.

Os sobrenadantes foram incubados com diferentes concentrações de efluente de curtume (0, 3, 10, 30 e 50%) a 37°C durante 30 minutos (glutathione S-transferase) ou 60 minutos (demais parâmetros oxidativos). A mistura incubada (n = 6-9 por grupo) foi utilizada para avaliar os níveis de espécies reativas e as atividades das enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase. A concentração do efluente de curtume, o tempo de incubação e o volume utilizado para cada ensaio foi baseado em curvas de tempo e volume previamente realizadas.

3.2.3. DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS

Determinado através da formação de produtos da modificação oxidativa do “probe” exógeno, 2’7’-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (LeBel et al., 1990). As amostras foram incubadas com DCFH-DA (100 µM) a 37°C durante 30 minutos. A formação do derivativo fluorescente oxidado (DCF) foi monitorada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de fluorescência (EnVision® Multilabel Reader; Perkin Elmer, USA).

3.2.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

Foi utilizado o kit RANSOD (Randox Labs. San Diego, CA, USA), que emprega o sistema xantina e xantina oxidase na geração de radical superóxido, que reage com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenoltetrazolium para formar o corante vermelho de

formazan, cuja medição é captada a 505 nm a 37°C (EnVision® Multilabel Reader; Perkin Elmer, USA) (Moysés et al., 2014).

3.2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE

A atividade da GPx foi determinada de acordo com Wende (1981). A reação foi realizada a 37 °C em solução tampão contendo 20 mM de fosfato de potássio (pH 7,7), EDTA 1,1 mM, azidasódica 0,44 mM, NADPH 0,5 mM, glutaciona 2 mM e 0,4 U de glutaciona redutase. A atividade da GPx foi medida utilizando tert-butil hidroperóxido como substrato a 340 nm. Atividade da GPx foi expressa em nmol de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína (Marcolin et al., 2012).

3.2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A atividade da GST foi baseada no método de Habig (1974). A mistura de reação continha uma alíquota, de fosfato de potássio pH 7,4, glutaciona (1 mM) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (1 mM), utilizado como substrato. A reação foi avaliada espectrofotometricamente a 340 nm durante 5 minutos (EnVision® Multilabel Reader; Perkin Elmer, USA).

3.2.7. DOSAGEM DE PROTEÍNA

A concentração de proteínas totais, nas estruturas cerebrais e no fígado, foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão.

3.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados em planilhas (Microsoft Excel). Os resultados foram apresentados como percentagem de controle, em que o homogeneizado sem efluente (0% de curtume efluente) foi tomado como 100%, e expressos como mediana e intervalo interquartil (25/75%). Inicialmente, foi empregado o teste Kolmogorov-Smirnov, com intuito de verificar a normalidade. Foi empregado o teste Kruskal-Wallis seguido de Dunn's. Para a interação entre os fatores "espécie" e "tratamento" (efluente), os valores de controle individual foram convertido para dados paramétricos, utilizando a média do grupo controle (0% de curtume de efluentes) e o teste ANOVA de duas vias foi usado. Em todos os testes, $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.3. ABORDAGEM METODOLÓGICA SEÇÃO II

3.3.1. DROSOPHILA MELANOGASTER

Foram utilizadas *Drosophila melanogaster* tipo selvagem (cepa Canton-S) provenientes da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Os animais foram adquiridos do Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana University, EUA). Machos e fêmeas foram mantidos em local controlado a 25°C, ciclo claro/escuro de 12h de luz, com 60-70% de humidade, em frascos contendo meio padrão preparada com 10g de ágar, 50g de açúcar mascavo, 10g metilparabeno, 100g de farinha de centeio, 1L de água e levedura seca. Este estudo foi realizado em parceria com o Professor Dr. Léder Leal Xavier da PUCRS.

3.3.2. EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DE CURTUME

Os experimentos (cinco replicações) foram realizados com *Drosophila melanogaster* de ambos os sexos com 19 dias de idade. As moscas foram expostas ao efluente de curtume durante 72h em diferentes concentrações (0, 5, 10, 30 e 50%) que foram adicionadas ao meio padrão preparado. A exposição ao efluente de curtume e a avaliação da mortalidade foram realizadas no Laboratório de Biologia Tecidual da PUCRS.

3.3.3. AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE

A mortalidade foi determinada de acordo com Reveillaud e colegas (1991), com modificações. Ao final das 72 horas de exposição ao efluente de curtume, o número total de moscas (mortas e vivas) foi contabilizado. As moscas vivas foram congeladas a -20°C durante 20 minutos, e após foram separados por sexo em placa de Petri, em gelo, e transferido imediatamente para -20°C.

3.3.4. PREPARAÇÃO DOS HOMOGENEIZADOS

Para a determinação das atividades enzimáticas, por meio de “pool” (n = 7-11 por grupo), as moscas foram homogeneizadas em uma proporção de 1g de tecido para 10 mL de tampão fosfato (1:10; 66 mM, pH 7,4), contendo 1mM de PMSF e 0,1% de triton. Os homogeneizados foram centrifugados a 3000×g durante 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi centrifugado novamente a 50000×g por 30 minutos. Após, o sobrenadante foi coletado e utilizado nos ensaios bioquímicos (Sohal et al., 1990). Para padronização dos métodos a seguir descritos, foram realizadas curvas de volumes com amostras previamente homogeneizadas.

3.3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

Neste ensaio foi avaliada a atividade da enzima SOD utilizando o kit RANSOD (RandoxLabs., San Diego, CA, USA), que emprega o sistema xantina e xantina oxidase na geração de radical superóxido, que reage com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenoltetrazolium para formar o corante vermelho de formazan, cuja medição é captada a 505 nm a 37°C (EnVision® Multilabel Reader; Perkin Elmer, USA).

3.3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE

A atividade foi determinada de acordo com método adaptado de Sohal e colaboradores (1990). Uma solução contendo de fosfato de potássio (100 mM; pH 7,7), EDTA 1.1 mM, azida sódica 0,44 mM, NADPH 0.5 mM, 2 mM de glutaciona (GSH) e 0,62U de glutaciona redutase. A atividade foi medida a 37°C utilizando tert-butilhidroperóxido como substrato a 340 nm.

3.3.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A atividade da GST foi baseada no método de Habig (1974). A mistura de reação continha uma alíquota, de fosfato de potássio pH 7,4, glutaciona (1 mM) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (1 mM), utilizado como substrato. A reação foi monitorizada espectrofotometricamente a 340 nm durante 5 minutos (EnVision® Multilabel Reader; Perkin Elmer, USA) (Sharma et al., 2012).

3.3.8. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão (Shen et al., 2003).

3.3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da avaliação da mortalidade foram expressos como número de moscas mortas. Para avaliar a mortalidade das moscas, o teste do qui-quadrado foi utilizado com o ajuste de Bonferroni para múltiplas comparações. As atividades da GPx, GST e SOD foram expressas como percentagem de controle, em que o homogeneizado sem efluente (0% efluente de curtume, do sexo masculino ou feminino) foi considerado 100%. Os resultados foram expressos como média \pm SEM. Os dados foram analisados quanto à normalidade da distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov de normalidade. Foi empregado o teste Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Duncan. O ANOVA de duas vias foi utilizado para avaliar a interação entre os fatores “sexo” e “tratamento” (efluente) usando a média do grupo controle masculino (0% de curtume de efluentes). O $p < 0,05$ foi considerado significativo, exceto no ajuste de Bonferroni ($p < 0,01$).

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DA SEÇÃO I

O primeiro artigo desta Tese (Anexo 1) avaliou parâmetros oxidativos após a exposição *in vitro* ao efluente de curtume em estruturas cerebrais (cerebelo, córtex, estriado e hipocampo) e fígado de ratos e camundongos .

4.1.1. NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS

Os níveis de espécies reativas foram quantificados nas estruturas cerebrais, cerebelo, córtex, estriado e hipocampo, e no fígado de ratos e camundongos após a incubação com diferentes concentrações do efluente de curtume. A exposição ao efluente aumentou os níveis de espécies reativas no fígado dos camundongos (KW = 33,60; $p < 0,0001$; Figura 1). O mesmo não foi observado em ratos, uma vez que estes parâmetros estavam inalterados nestes animais (Figura 1). No fígado, o ANOVA de duas vias indicou efeito dos fatores, “espécie” e “tratamento”, além de uma interação significativa entre estes mesmos fatores [$F(1, 80) = 2,95$; $p = 0,025$].

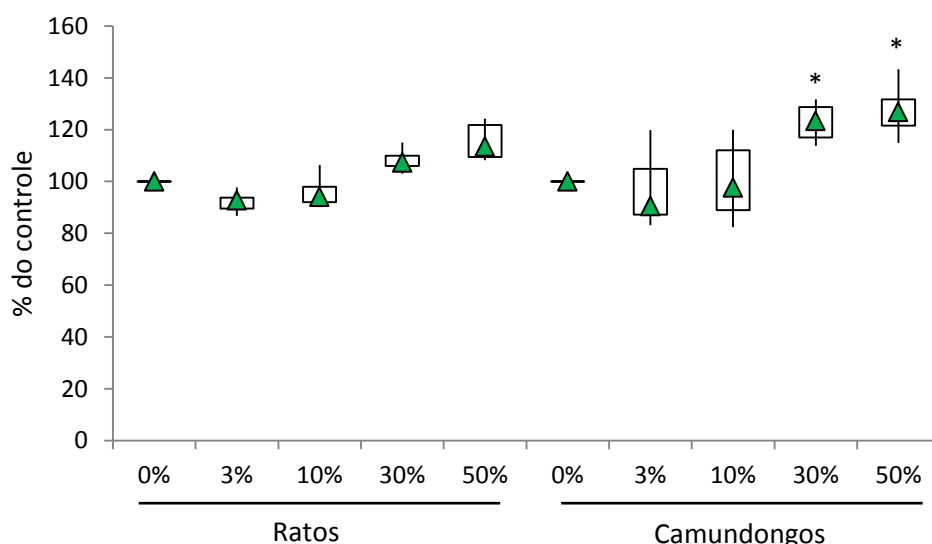


Figura 1. Efeito da exposição ao efluente de curtume (0, 3, 10, 30 e 50%) sobre os níveis de espécies reativas no fígado de camundongos e ratos (n = 8-9 por grupo). Os resultados, calculados em pmol DCF formado por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (os valores de 0% do efluente de curtume foram considerados 100% de DCF formado). Os dados foram expressos como mediana e intervalo interquartil (25/75%), Kruskal-Wallis seguido de Dunn's. *Valores significativamente diferentes de 0% (grupo controle), $p < 0,0001$.

Em relação às estruturas cerebrais, observou-se que a exposição *in vitro* ao efluente de curtume alterou o conteúdo de espécies reativas no cerebelo, córtex e hipocampo de ratos e camundongos (Tabela 3). No córtex houve um aumento significativo nos níveis de espécies reativas em ratos e camundongos (respectivamente, KW = 32,93; p < 0,0001; KW = 15,86; p < 0,0032). Foi observado que o conteúdo de espécies reativas estava aumentado no hipocampo de ratos e camundongos incubados com o contaminante (respectivamente, KW = 13,66; p = 0,0085; KW = 12,67; p = 0,013). Evidenciou-se também, o aumento do DCF formado no cerebelo de ratos e camundongos (respectivamente, KW = 13,66; p = 0,0085; KW = 20,66; p = 0,0004). No entanto, a exposição *in vitro* ao efluente de curtume não alterou esse parâmetro no estriado de ambas as espécies (dados não mostrados).

Tabela 3. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre os níveis de espécies reativas em cerebelo, córtex e hipocampo de camundongos e ratos.

| Efluente de curtume (%) | Ratos | | | Camundongos | | |
|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Cerebelo | Córtex | Hipocampo | Cerebelo | Córtex | Hipocampo |
| | 0 | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) |
| 3 | 104 (99,8; 110,6) | 113,4 (102,6; 115,6) | 99,6 (93,3; 102,4) | 97,8 (95,3; 103,8) | 100,8 (97,4; 115,5) | 104,3 (101,6; 110,8) |
| 10 | 109,4 (96,9; 111,8) | 119,8 (114; 124,4) | 102,9 (99; 112,3) | 103,3 (91,1; 105,7) | 117,9 (108,4; 138,4)* | 101,3 (97,4; 110,9) |
| 30 | 117,4 (107,1; 129)* | 134,9 (134; 136,4)* | 106,5 (102,7; 115) | 108,2 (105,2; 112,8) | 128,3 (128,3; 130,6)* | 111,8 (83,9; 120,6) |
| 50 | 109,8 (104,1; 128,7) | 140,5 (137,7; 144,7)* | 112,2 (103,1; 115)* | 120,6 (112; 126,4) * | 118,6 (107; 133,1) | 120,1 (107,6; 130,6)* |

Os resultados, calculados em pmol DCF formado por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (valores 0% de efluente de curtume foram considerados 100% de DCF formado; n = 7-9 por grupo). Os dados foram expressos como mediana e intervalo interquartil (25/75%), Kruskal-Wallis seguido de Dunn's.* Valores significativamente diferentes de 0% (grupo controle), p < 0,05.

4.1.2. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

Foram avaliados os efeitos da exposição *in vitro* ao efluente de curtume em estruturas cerebrais (cerebelo, córtex, estriado e hipocampo) de camundongos e ratos, sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD).

Após a incubação com o efluente, observou-se uma diminuição na atividade da SOD no hipocampo de ratos e camundongos (respectivamente, KW = 15,37; $p = 0,004$; KW = 20,58; $p = 0,004$), conforme demonstrado na tabela 4. Um resultado semelhante foi encontrado no cerebelo de camundongos em que houve diminuição na atividade da enzima (KW = 15,88; $p = 0,0032$; Tabela 4). No entanto, o mesmo não foi observado no cerebelo dos ratos (Tabela 4), bem como no córtex e estriado de ambas as espécies de roedores, uma vez que não houve diferenças significativas entre os grupos testados (dados não mostrados).

Tabela 4. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da superóxido dismutase em cerebelo e hipocampo de ratos e camundongos.

| Efluente de Curtume (%) | Ratos | | Camundongos | |
|-------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Cerebelo | Hipocampo | Cerebelo | Hipocampo |
| | 0 | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) |
| 3 | 79,4 (41,5; 95) | 95,6 (64,6; 115,5) | 69,9 (51,8; 111) | 92 (78,4; 100,4) |
| 10 | 45,8 (26,5; 116,2) | 56,8 (45,6; 98,2) | 64,1 (57,3; 92) | 78,1 (71,4; 102,9) |
| 30 | 115,9 (33,4; 147,1) | 53,6 (27; 87,4) | 50 (42,3; 50)* | 74,7 (56,3; 92,9)* |
| 50 | 65,4 (28,3; 111) | 54,1 (38,8; 74,4)* | 54,9 (35,4; 66,7)* | 72,6 (57,5; 81,8)* |

Os resultados, calculados em U por mg de proteína, estão expressos como porcentagem de controle (valores 0% de efluente de curtume foram considerados 100% de atividade da superóxido dismutase; $n = 7-8$ por grupo). Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (25/75%), Kruskal–Wallis seguido de Dunn's. *Valores significativamente diferentes de 0% (grupo controle); $p < 0,004$.

4.1.3. ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE

A exposição ao efluente de curtume aumentou significativamente a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) no fígado de ratos (KW = 17,13; $p < 0,0018$; Figura 2). No entanto, não foi observado alterações na atividade da enzima em camundongos (Figura 2). O ANOVA de duas vias encontrou diferenças significativas nos parâmetros “espécie” e “tratamento”, bem como interação entre estes mesmos fatores na atividade da GPx hepática [$F(1; 80) = 2,870$; $p = 0,029$], uma vez que houve aumento da atividade apenas nos ratos.

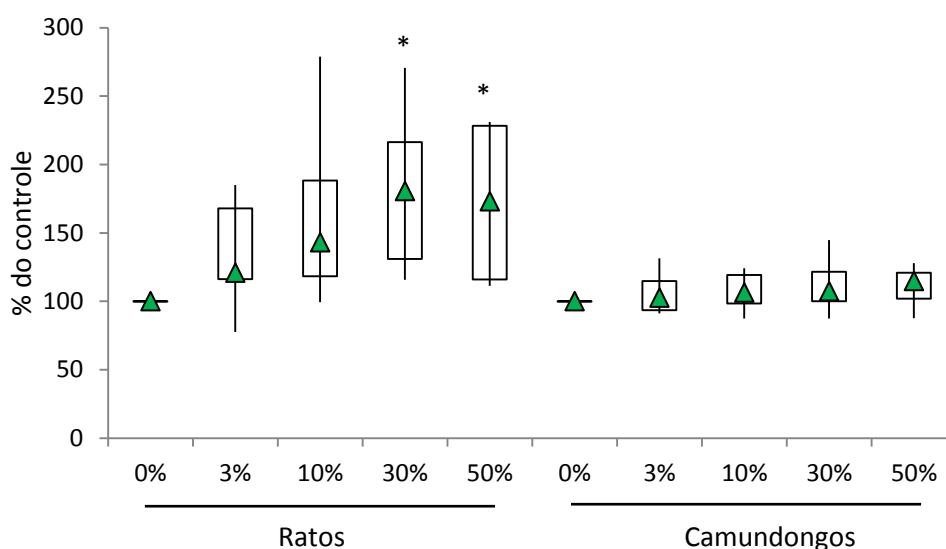


Figura 2. Efeito da exposição ao efluente de curtume (0, 3, 10, 30 e 50%) sobre a atividade da glutathiona peroxidase no fígado de camundongos e ratos ($n = 8-9$ por grupo). Os resultados, calculados por nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (valores de 0% do efluente de curtume foi considerado 100% da atividade da glutathiona peroxidase). Os dados foram expressos como mediana e intervalo interquartil (25/75%), Kruskal-Wallis seguido de Dunn's. * Valores significativamente diferentes de 0% (grupo controle), $p < 0,01$.

Foi observado que a exposição *in vitro* ao efluente aumentou a atividade da GPx em todas as estruturas cerebrais de ratos: cerebelo, córtex, estriado e hipocampo (respectivamente, KW = 9,66; p = 0,0466; KW = 20,15; p < 0,0005; KW = 21,68; p < 0,0002; KW = 18,42; p = 0,001; Tabela 5). Entretanto, em camundongos a incubação aumentou a atividade da GPx no cerebelo e córtex (respectivamente, KW = 14,29; p = 0,0064; KW = 12,85; p < 0,012), conforme apresentado na tabela 5. O ANOVA de duas vias indicou uma tendência na interação entre os fatores “espécie” e “tratamento”, uma vez que a atividade da GPx foi maior no estriado e hipocampo dos ratos [respectivamente, F (1; 74) = 2,21; p = 0,078; F (1; 78) = 2,220; p = 0,076].

Tabela 5. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da glutatona peroxidase em áreas cerebrais de camundongos e ratos.

| Efluente de Curtume (%) | Ratos | | | | Camundongos | | | |
|-------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| | Cerebelo | Córtex | Estriado | Hipocampo | Cerebelo | Córtex | Estriado | Hipocampo |
| 0 | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) |
| 3 | 101 (95,1; 103,6) | 106 (102,7; 107,6) | 182,8 (102,9; 286,5) | 106,5 (102,1; 112,1) | 106 (101,2; 115,4) | 102,1 (89,5; 111,4) | 114,4 (84; 213,3) | 96 (93,7; 106) |
| 10 | 105,9 (101,4; 108,6) | 113,7 (106,6; 133,1)* | 454,6 (194,4; 697,1)* | 109,4 (100,1; 113,7) | 110,3 (103; 129,8) | 110,1 (103,2; 118,3) | 134,1 (79,5; 241,8) | 91,3 (76,2; 97,9) |
| 30 | 101 (89,3; 108,1) | 114,7 (110,8; 126,4)* | 452,7 (245; 639,7)* | 113,9 (109; 116,9)* | 113,5 (107,9; 119,1)* | 111,7 (104,2; 119,6)* | 174,2 (89,9; 293,9) | 95,7 (83,5; 100,3) |
| 50 | 109,2 (101; 117,4)* | 123,9 (109,9; 140,5)* | 370,4 (263,4; 720,3)* | 113,5 (108,9; 120,9)* | 119,7 (104,6; 142,7)* | 111,4 (103,8; 119,8) | 163,7 (129; 261,1) | 99,9 (88,1; 114,9) |

Os resultados, calculados por nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína, estão expressos como porcentagem de controle (valores 0% de efluente de curtume foram considerados 100% de atividade da glutatona peroxidase; n = 6-9 por grupo). Os dados, foram expressos como mediana e intervalo interquartil (25/75%), Kruskal–Wallis seguido de Dunn's.* Valores significativamente diferentes de 0% (grupo controle), p < 0.05.

4.1.4. ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi avaliada nas estruturas cerebrais (cerebelo, córtex, estriado e hipocampo) e fígado de ratos e camundongos incubados com diferentes concentrações do efluente de curtume. A exposição *in vitro* ao efluente induziu um aumento na atividade da GST no fígado de ratos (KW = 16,44, $p < 0,0025$), enquanto que em camundongos não houve alterações na atividade hepática da enzima (Figura 3).

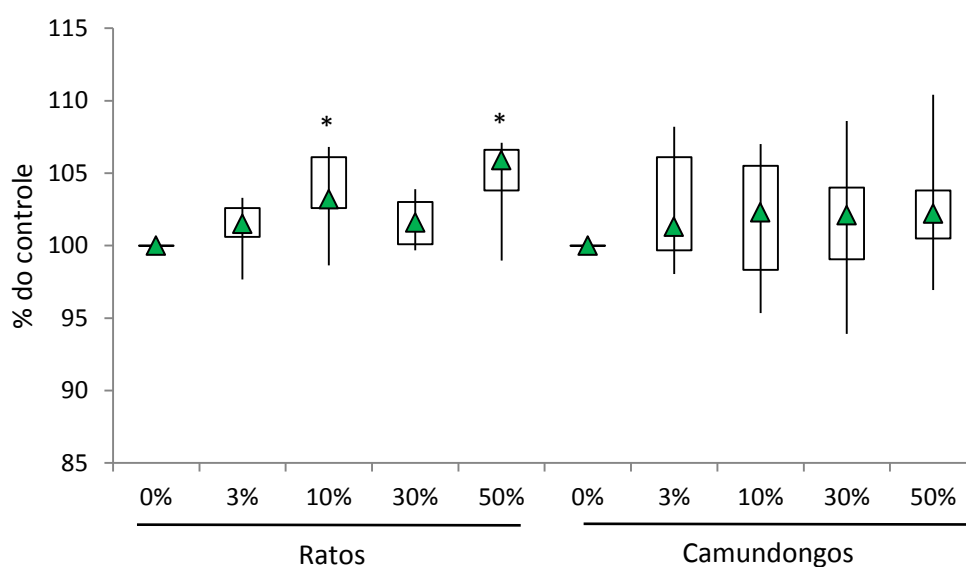


Figura 3. Efeito da exposição ao efluente de curtume (0, 3, 10, 30 e 50%) sobre a atividade da glutathione S-transferase no fígado de camundongos e ratos (n = 7-8 por grupo). Os resultados, calculados por mmoles/min/mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (valores de 0% do efluente de curtume foi considerado 100% da atividade da glutathione S-transferase). Os dados foram expressos como mediana e intervalo interquartil (25/75%), Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's. *Valores significativamente diferentes de 0% (grupo controle), $p < 0,01$.

Em relação aos efeitos da exposição ao efluente sobre a enzima GST nas estruturas cerebrais, observou-se que a incubação *in vitro* diminuiu a atividade no cerebelo (ratos, KW = 25,08, $p < 0,0001$; camundongos KW = 12,86, $p = 0,012$) e hipocampo (ratos, KW = 24,67, $p < 0,0001$; camundongos, KW = 14,1, $p = 0,007$),

conforme demonstrado na tabela 6. No entanto, a incubação com efluente não alterou este parâmetro no estriado e córtex de ambas as espécies de roedores estudadas (dados não mostrados).

Tabela 6. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da glutatona S-transferase em cerebelo e hipocampo de camundongos e ratos.

| Efluente de Curtume (%) | Ratos | | Camundongos | |
|-------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| | Cerebelo | Hipocampo | Cerebelo | Hipocampo |
| 0 | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) | 100 (0; 0) |
| 3 | 84,3 (82; 86,3) | 109,2 (102,9; 113,3) | 91,7 (82,3; 96,8) | 100 (89,7; 106,2) |
| 10 | 74,5 (70,9; 80,8) | 90 (75,1; 95,6) | 91,1 (77,2; 94,9) | 92,6 (82,7; 94) |
| 30 | 63,3 (59,2; 71,7)* | 72 (67; 81,1) | 82,4 (71; 87)* | 93,1 (87,8; 97,6) |
| 50 | 55 (52,7; 65,3)* | 69,2 (56,9; 75,5)* | 77,2 (74,2; 86,7)* | 80,7 (70,4; 82,6)* |

Os resultados, calculados por mmoles/min/mg de proteína, estão expressos como porcentagem de controle (valores 0% de efluente de curtume considerados 100% de atividade da glutatona S-transferase; n = 8-9 por grupo). Os dados foram expressos como mediana e intervalo interquartil (25/75%), Kruskal–Wallis seguido de Dunn's. *Valores significativamente diferentes de 0% (grupo controle), p < 0.01.

4.2. RESULTADOS DA SEÇÃO II

4.2.1. MORTALIDADE

Conforme demonstrado a baixo na tabela 7, a exposição ao efluente de curtume aumentou a mortalidade de *Drosophila melanogaster* [χ^2 (4) = 165,1; p < 0,0001] nas concentrações 10% [χ^2 (1) = 31,51; p < 0,0001], 30% [χ^2 (1) = 69,79; p < 0,0001] e 50% [χ^2 (1) = 133,0; p < 0.0001].

Tabela 7. Mortalidade *Drosophila melanogaster* adultas expostas a diferentes concentrações de efluentes de curtume por 72h.

| Concentrações de efluente de curtume (%) | No. de animais expostos | No. De animais mortos | Mortalidade Cumulativa (%) [†] | P |
|--|-------------------------|-----------------------|---|---------|
| 0 | 1041 | 234 | 24,1 ± 9,4 | |
| 5 | 596 | 92 | 16 ± 8,7 | 0,571 |
| 10 | 1015 | 342 | 34,8 ± 5,1 | < 0,001 |
| 30 | 816 | 330 | 44,1 ± 15,5 | < 0,001 |
| 50 | 1014 | 473 | 56,3 ± 23,1 | < 0,001 |

[†]Os dados são a média de cinco replicações; O teste de qui-quadrado foi usado para comparação estatística, usando correção de Bonferroni para múltiplas comparações ($p < 0,01$).

4.2.2. ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

A exposição ao efluente de curtume não alterou significativamente a atividade da SOD entre os grupos testados (Figura 4).

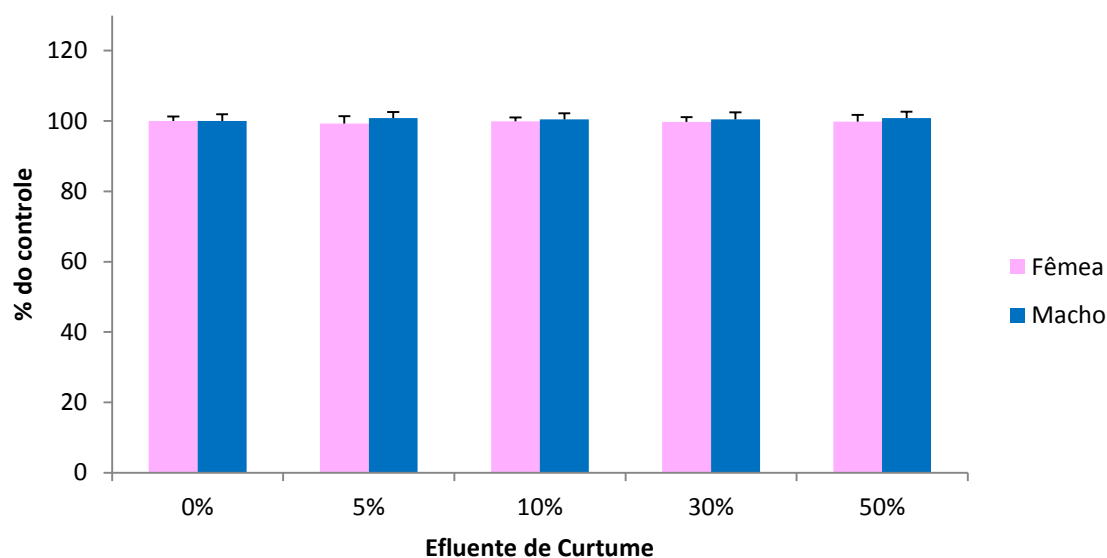


Figura 4. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da superóxido dismutase em machos ($n=7-8$ por grupo) e fêmeas ($n = 9-11$ por grupo) adultos de *Drosophila melanogaster*. Os resultados, calculados em U por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (machos ou fêmeas; valores de 0% do efluente de curtume foi considerado 100% da atividade da superóxido dismutase). Dados expressos como mediana \pm desvio padrão, ANOVA de uma via ($p > 0,05$).

4.2.3. ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE

Neste estudo, foi observado que após a exposição por 72h ao efluente de curtume, houve um aumento significativo na atividade da GPx nos machos ($F_{(4,38)} = 6,229$; $p = 0,001$; Figura 5) e fêmeas ($F_{(4, 54)} = 3,400$; $p = 0,012$; Figura 4) de *D. melanogaster*. O ANOVA de duas vias encontrou diferenças significativas no parâmetro “tratamento” na atividade da GPx ($F_{(4, 125)} = 2,506$; $p = 0,046$), bem como interação entre os fatores, “sexo” e “tratamento” ($F_{(4, 125)} = 3,765$; $p = 0,006$).

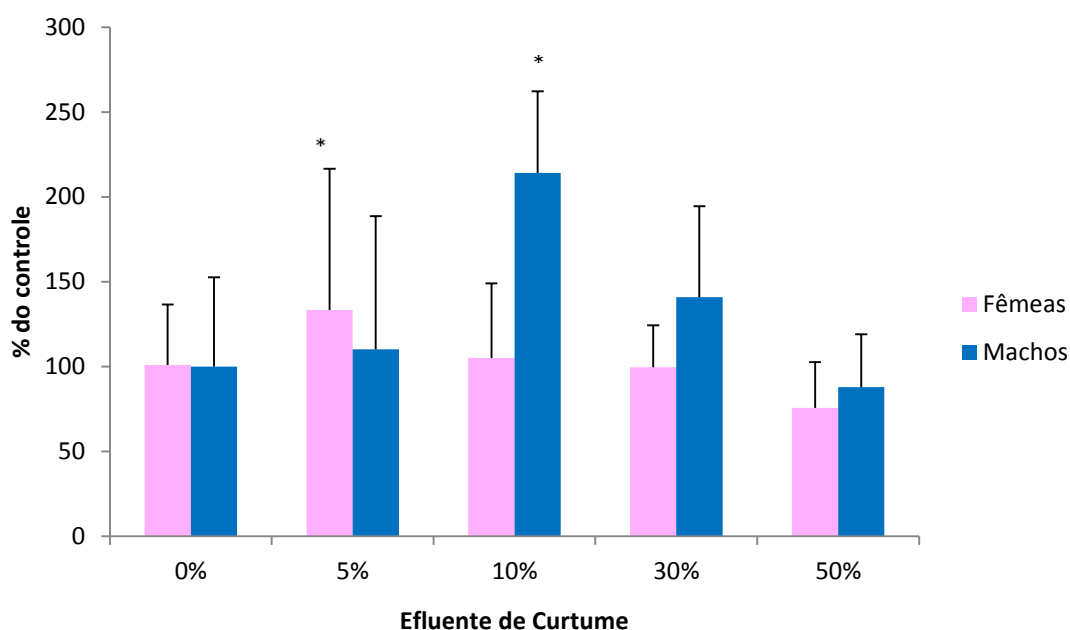


Figura 5. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da glutatona peroxidase em machos (n=7-9 por grupo) e fêmeas (n = 9-11 por grupo) adultos de *Drosophila melanogaster*. Os resultados, calculados por nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (machos ou fêmeas; valores de 0% do efluente de curtume foi considerado 100% da atividade da glutatona peroxidase). Dados expressos como média \pm desvio padrão.*Valores significantemente diferentes do grupo controle do respectivo sexo, ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan, $p < 0,05$.

4.2.4. ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A atividade da GST foi alterada após a exposição ao efluente de curtume ($F_{(4,58)} = 5,967$; $p < 0,001$), uma vez que as concentrações 30 e 50% reduziram a atividade da enzima nos machos de *D. melanogaster*, conforme apresentado na figura 6.

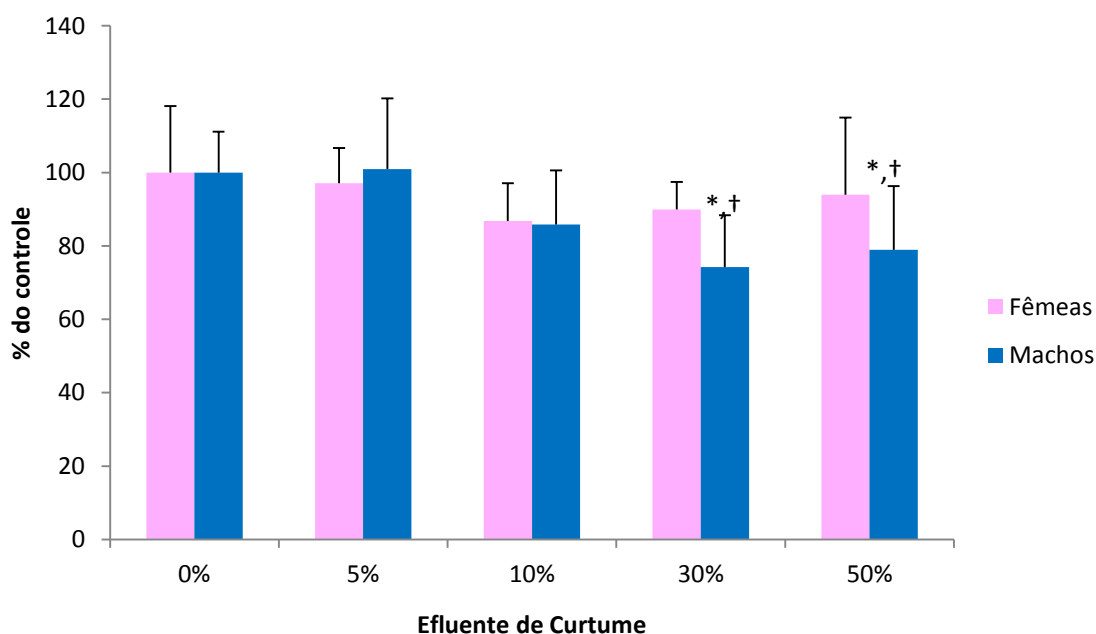


Figura 6. Efeito da exposição ao efluente de curtume sobre a atividade da glutatona S-transferase em machos ($n = 7-9$ por grupo) e fêmeas ($n = 8-10$ por grupo) adultos de *Drosophila melanogaster*. Os resultados, calculados por $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (machos ou fêmeas; valores de 0% do efluente de curtume foram considerados 100% da atividade da glutatona S-transferase). Dados expressos como média \pm desvio padrão. *Valores significativamente diferentes do grupo controle do respectivo sexo; †Valores significativamente diferentes do grupo 5% do respectivo sexo, ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan, $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A primeira etapa deste estudo teve como objetivo avaliar hepatotoxicidade e neurotoxicidade *in vitro* em ratos e camundongos. Até o presente momento, estudos que relatam os efeitos da exposição de efluentes de curtume sobre o estado oxidativo em estruturas cerebrais são raros. A vulnerabilidade do encéfalo à lesão oxidativa induzida por xenobióticos é amplamente descrita na literatura (Franco et al., 2009; Li et al., 2006), uma vez que o encéfalo é particularmente sensível ao ataque de espécies reativas (Halliwell, 2007).

Neste estudo, a exposição *in vitro* de estruturas cerebrais ao efluente de curtume induziu um perfil de resposta semelhante no ensaio que avaliou o conteúdo de espécies reativas em ratos e camundongos, visto que, houve um aumento na formação de DCF em cerebelos, córtices e hipocampos de ambas as espécies de roedores (Tabela 3). O aumento de espécies reativas pode causar o estresse oxidativo e consecutivamente causar dano em macromoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Floyd, 1999). É importante ressaltar que o dano oxidativo induzido pelas espécies reativas está envolvido na fisiopatologia de inúmeras doenças, como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Bergamini et al., 2004; Dean et al., 1997; Muthuswamy et al., 2006)

Em relação às enzimas SOD e GST nas estruturas encefálicas, houve uma diminuição de suas atividades em hipocampos de ambas as espécies de roedores. A redução destas defesas antioxidantes no sistema nervoso pode facilitar o acúmulo de espécies reativas, o que pode causar dano celulares, bem como contribuir para a neurotoxicidade central dos efluentes de curtume (Board e Menon, 2013; Franco et al., 2009).

Pode-se sugerir que o estado oxidativo em cerebelo, córtex e hipocampo pode estar, pelo menos em parte, relacionado ao perfil de ansiedade encontrado em camundongos (Siqueira et al., 2011). Alguns estudos indicaram uma correlação positiva entre o estado oxidativo e o nível de ansiedade em camundongos (Bouayed et

al., 2007; Hovatta et al., 2005). Neste contexto, é importante ressaltar que o hipocampo e o córtex são regiões do encéfalo associadas à ansiedade (Bannerman et al., 2004; Davidson, 2002).

É interessante ressaltar que a exposição *in vitro* ao efluente de curtume não alterou os níveis de espécies reativas no estriado dos roedores. Considerando que, o estriado está associado com a atividade motora (Avila-Costa et al., 2001), este resultado pode estar relacionado aos achados dos estudos comportamentais, uma vez que a exposição ao efluente de curtume não causa alterações motoras (Moysés et al., 2014; Siqueira et al., 2011).

Apesar das respostas similares nos encéfalos das espécies de roedores testadas (acima descritas), foram observadas algumas diferenças nas atividades de enzimas antioxidantes. A exposição *in vitro* ao efluente de curtume aumentou a atividade da GPx em todas as estruturas cerebrais avaliadas em ratos, enquanto que, em camundongos só houve aumento da atividade no cerebelo e córtex (Tabela 5). Isto é relevante, já que a GPx desempenha um papel importante na defesa antioxidante celular através da redução de hidroperóxidos utilizando glutathiona reduzida como um doador de elétrons (Margis et al., 2008). Estes peróxidos podem ser substratos para a reação de Fenton, gerando o radical hidroxila que é altamente reativo (Su et al., 2008). É interessante ressaltar que Gromadzińska e colaboradores (1996) demonstraram que trabalhadores de curtume apresentaram maior atividade da GPx em eritrócitos e no plasma, bem como níveis elevados de peroxidação lipídica plasmática.

Observando os resultados das atividades das enzimas avaliadas nos diferentes tecidos cerebrais, percebe-se que houve uma variação nas atividades em diferentes estruturas encefálicas. As razões e as consequências fisiológicas e toxicológicas possíveis de tal aumento são desconhecidas, mas podem representar adaptação ao estresse oxidativo (Freitas et al., 2009). Podemos sugerir que esta heterogeneidade

neurotóxica regional pode estar relacionada com a diferente capacidade antioxidante em áreas.

No fígado, a exposição ao efluente de curtume induziu um aumento nas atividades das enzimas GST e GPx em ratos (Figura 2 e 3), enquanto que, em camundongos, não observamos alterações nas atividades dessas enzimas hepáticas. Foi detectado também, um aumento das espécies reativas no fígado dos camundongos, e o mesmo não foi observado em ratos (Figura 1). Isso pode estar relacionado com o aumento nas atividades da GST e GPx, uma vez que estas enzimas são diretamente relacionadas com toxicidade de contaminantes (Chan et al., 2004; Wang et al., 2007; Yang et al., 2001).

Além da exposição ao efluente de curtume, estudos prévios do nosso laboratório mostraram que a exposição *in vitro* a outro efluente, o chorume, aumentou os níveis de espécies reativas no fígado de camundongos, enquanto que este parâmetro estava inalterado no fígado de ratos (Bertoldi et al., 2012). Corroborando dados desta Tese a exposição *in vivo* ao efluente de curtume em ratos não teve efeito hepatotóxico, uma vez que não houve aumento nos parâmetros oxidativos que avaliaram as espécies reativas, o dano lipídico e a atividade da catalase, bem como nos parâmetros associados a danos na integridade estrutural do fígado, mensurados através dos níveis plasmáticos de albumina, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase (Moyses, 2010).

Considerando que a GST está envolvida na detoxificação de xenobióticos (Franco et al., 2009; Hayes e McLellan, 1999) e que o fígado é um dos determinantes críticos para a biodisponibilidade de xenobióticos no organismo (Chan et al., 2004), pode-se supor que a elevação da atividade da GST hepática aumenta a eficácia de detoxificação dos efluentes de curtume em ratos. Ressaltando a importância destes achados, estudos indicam que a exposição *in vitro* pode evidenciar as diferenças entre as espécies e as distinções na metabolização de xenobióticos (Nabb et al., 2006;

Steward et al., 1995; Ulrich et al., 2002; Weisbrod et al., 2009), do mesmo modo que, o perfil metabólico obtido em células hepáticas isoladas por cultura pode corresponder ao perfil metabólico *in vivo* de xenobióticos (Cravedi et al., 2001; Nishimoto et al., 1991; Weisbrod et al., 2009).

O papel da GST na eliminação de xenobióticos é amplamente descrito. O estudo de Ramos-Gomez e colaboradores (2001) observou que camundongos *knockout* para o gene da Nrf-2 são mais suscetíveis ao benzo [a] pireno que camundongos selvagens, uma vez que os animais *knockout* apresentaram maior resposta ao carcinógeno relacionada a uma redução de 50% na atividade da GST hepática.

Alguns trabalhos sugerem diferenças na atividade da GST entre espécies de mamíferos, por exemplo, a atividade da GST é maior em ratos quando comparado com hamsters (Åström et al., 1987; Igarashi et al., 1983). Fatores como a densidade das classes de GSTs e suas distribuições nos tecidos podem divergir entre espécies, estando isto relacionado com diferenças na metabolização de xenobióticos observadas em mamíferos (Landi, 2000; Sheehan et al., 2001). Por exemplo, o diclorometano, um substrato da GST teta (θ), induz tumores no fígado e no pulmão de camundongos, sem apresentar qualquer efeito em ratos e hamsters (Green, 1997). Pode-se inferir que a biotransformação de diclorometano, bem como o efluente de curtume, é superior em ratos em comparação com camundongos (Landi, 2000). Desta forma, adaptações enzimáticas espécie-dependentes podem explicar divergentes impactos de compostos tóxicos, tanto em alterações no estado oxidativo, quanto na biodisponibilidade destes compostos.

Os resultados bioquímicos do fígado, que sugerem diferenças na biotransformação entre as espécies, podem estar relacionados com as nossas descobertas comportamentais induzidas pela exposição ao efluente de curtume. Camundongos expostos cronicamente ao efluente de curtume permaneceram mais

tempo no braço fechado no teste do labirinto em cruz elevado, o que pode ser caracterizado como ansiogênico (Siqueira et al., 2011), ao passo que em ratos a exposição crônica não alterou nenhum parâmetro nos testes comportamentais que avaliaram ansiedade, memória, atividade locomotora e preditivo de depressão (Moysés et al., 2014). Os dados desta Tese demonstram que a biodisponibilidade central dos compostos presentes no efluente de curtume pode ser maior em camundongos, corroborando a hipótese de que camundongo é uma espécie responsiva aos componentes presentes neste xenobiótico, enquanto rato uma espécie não-responsiva ao efluente de curtume.

A segunda etapa deste trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da exposição de *Drosophila melanogaster* adultas por 72 horas ao efluente de curtume. Foram avaliadas a letalidade e as atividades de enzimas antioxidantes, uma vez que o sistema enzimático antioxidante contém proteínas evolutivamente conservadas, tais como a SOD, catalase, GPx (Halliwell e Chirico, 1993) e GST (Board e Menon, 2013). Neste estudo, a exposição ao efluente de curtume aumentou a letalidade (Tabela 7) e alterou as atividades das enzimas GST e GPx.

No estudo de Taju e colaboradores (2012), foi avaliada a taxa sobrevivência em peixes (*Etroplus suratensis*) expostos ao efluente de curtume, e foi constatado que a mortalidade foi dependente da concentração e do tempo de exposição ao contaminante. Em nosso estudo, a exposição ao efluente de curtume ocasionou um aumento significativo da letalidade em *D. melanogaster*. Sugerimos que a mortalidade pode estar relacionada com os achados bioquímicos observados, uma vez que houve diminuição na atividade da GST (Figura 4).

Como mencionado acima sobre a importância em mamíferos, as enzimas GST de insetos desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa contra xenobióticos, como por exemplo, inseticidas, recebendo dessa forma uma atenção

especial, uma vez que o aumento da sua atividade pode ser um mecanismo de resistência (Chien e Dauterman, 1991; Shen et al., 2003; Tang et al., 2011; Yu, 1986).

A redução na atividade da GST em *D. melanogaster* exposta ao efluente de curtume pode ser um indicativo de toxicidade, uma vez que a GST está envolvida na detoxificação de xenobióticos (Hayes e McLellan, 1999; Landi, 2000). Os dados encontrados neste estudo corroboram os resultados da seção I, em que houve uma diminuição da atividade da GST no hipocampo e cerebelo dos roedores. Com isso, poderíamos sugerir que a GST pode ser um indicador bioquímico sensível aos efluentes de curtume, uma vez que a diminuição na atividade da GST pode ser considerada um bioindicador da exposição a contaminantes (Gül et al., 2004), bem como marcador de estresse oxidativo em uma ampla variedade de organismos, incluindo mamíferos e invertebrados (Han et al., 2013; Hearne e Colman, 2006; Yamamoto et al., 2005).

Do nosso conhecimento, este estudo avaliou pela primeira vez os efeitos da exposição ao efluente de curtume na atividade da GPx em moscas adultas. Siddique e colegas (2008) mostraram que a exposição de larvas de *D. melanogaster* a lixiviados de curtume aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, e isso foi associado a uma adaptação ao aumento das espécies reativas de oxigênio e dos níveis de peroxidação lipídica. Em conformidade, os nossos resultados mostraram que a exposição ao efluente de curtume também pode aumentar a atividade da GPx em *D. melanogaster* adultas (Figura 5).

Siddique e colegas (2005) demonstraram que lixiviados de resíduos sólidos de curtumes possuem atividade genotóxica em larvas de *D. melanogaster*, associando este efeito a concentrações relativamente elevadas de metais carcinogênicos e/ou mutagênicos. Cabe ressaltar, que a contaminação por estas substâncias pode ocorrer em diferentes níveis da cadeia alimentar, desde os produtores (ou seja, algas e plantas) para consumidores secundários (ou seja, insetos, crustáceos e peixes)

(Gómez et al., 2008; Sharma et al., 2007; Tigini et al., 2011), o que pode representar um risco de grande magnitude.

Muitos estudos relatam diferenças na resposta entre machos e fêmeas, quando expostos a contaminantes. No estudo de Nadda et al. (2005), machos de *Drosophila melanogaster* são mais susceptíveis ao beta-ciflutrina, em comparação com as fêmeas. Em outro trabalho, a exposição de machos e fêmeas de *Drosophila melanogaster* ao fenobarbital e atrazina induziu diferentemente entre os sexos a transcrição dos genes citocromos (CYP) P450 e GST. Nesta Tese, os dados indicaram diminuição na atividade da GST em machos exposto ao efluente de curtume, mas o mesmo não foi observado em fêmeas. No entanto, não sabemos os mecanismos que causaram essa diferença encontrada entre os gêneros.

Considerando os resultados obtidos nesta seção, *D. melanogaster* parece ser um bom modelo para avaliar a toxicidade de efluentes de curtume. Isto é relevante, uma vez que a *D. melanogaster* é amplamente utilizada em pesquisas toxicológicas (Chahine e O'Donnell, 2010).

Até o presente momento, não se sabe exatamente qual ou quais moléculas são responsáveis pela toxicidade do efluente de curtume. Conforme demonstrado no estudo cromatográfico, há uma grande complexidade nos compostos presentes no efluente. Muitos destes compostos são altamente tóxicos e mutagênicos (por exemplo a nitroanilina). Os ftalatos são compostos com características lipofílicas e, por conseguinte, tendem a acumular-se em tecidos adiposos (Keller et al., 2009), causando posteriormente efeitos tóxicos no fígado, aparelho reprodutor, rins, pulmões e coração, além de teratogenicidade em pontos críticos do desenvolvimento (Tickner et al., 2001). No entanto, os efluentes industriais contêm vários compostos desconhecidos, o que pode representar um risco de proporções não identificadas, uma vez que seus efeitos sinérgicos ou antagonistas podem alterar a resposta à exposição (Siddique et al., 2005).

Assim, a toxicidade de águas residuárias e o seu impacto sobre o meio ambiente não podem ser avaliados apenas por um constituinte único, pois esta abordagem não detecta os efeitos combinados de todas as espécies químicas assim como seus potenciais efeitos sinérgicos (Daniel et al., 2004; Siddique et al., 2005; Siddique et al., 2008). Além de que, ensaios que detectem diferentes mecanismos bioquímicos e fisiológicos em diferentes organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos podem ser úteis para uma compreensão do impacto destes resíduos no ambiente (Tigini et al., 2011).

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesta Tese nos permitem concluir que:

- O diferente impacto induzido pela exposição ao efluente de curtume no sistema antioxidante hepático de ratos e camundongos, especificamente nas enzimas glutathione peroxidase e glutathione S-transferase, podem estar relacionadas às respostas comportamentais divergentes, uma vez que isto pode influenciar na biodisponibilidade sistêmica e no dano celular induzido pelos compostos presentes nesse efluente.
- Nossos dados reforçam a hipótese de que os camundongos são bons modelos animais.
- O perfil oxidativo induzido pela incubação com efluente de curtume foi similar nas estruturas cerebrais de ratos e camundongos.
- Nossos dados apoiam a ideia de que a alteração no sistema enzimático antioxidante pode estar relacionada aos efeitos tóxicos da exposição a efluentes de curtume em insetos, já que a exposição ao efluente de curtume alterou a atividade das enzimas antioxidantes, bem como aumentou a mortalidade em *Drosophila melanogaster* adultas.
- O presente estudo sugere que *Drosophila melanogaster* parece ser um bom modelo para avaliar a toxicidade dos efluentes de curtume.
- Os resultados sugerem que o sistema glutathione constitui um indicador bioquímico sensível da toxicidade induzida pelo efluente de curtume

7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos nesta Tese, pretende-se investigar outros aspectos. Dentre as propostas, pode-se destacar:

- Avaliação do efeito da exposição crônica ao efluente de curtume sobre as atividades das enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase, e glutathione S-transferase em estruturas cerebrais (córtex e hipocampo) e fígados de camundongos CF1.
- Determinação da expressão proteica da superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione S-transferase em estruturas encefálicas (córtex e hipocampo) bem como no fígado de camundongos CF1 expostos cronicamente ao efluente de curtume.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apostoli, P., (1998). La speciazione dei metalli in medicina del lavoro. *Occup. Health. Ind. Med.* 35 (1), 9-10.
- Aquim, P. M., (2009). *Gestão em Curtumes: Uso Integrado e Eficiente da Água*. PPG: Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009, 144.
- Åström, A., Månér, S., DePierre, J., (1987). Induction of liver microsomal epoxide hydrolase, UDP-glucuronyl transferase and cytosolic glutathione transferase in different rodent species by 2-acetylaminofluorene or 3-methylcholanthrene. *Xenobiotica*. 17 (2), 155-163.
- Avila-Costa, M. R., Colín-Barenque, L., Fortoul, T. I., Machado-Salas, J. P., Espinosa-Villanueva, J., et al., (2001). Motor impairments in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat striatum and prefrontal cortex. *Int. J. Neurosci.* 108 (3-4), 193-200.
- Bajza, Z., Vrcek, I., (2001). Water quality analysis of mixtures obtained from tannery waste effluents. *Ecotox. Environ. Safe.* 50 (1), 15.
- Bannerman, D., Rawlins, J., McHugh, S., Deacon, R., Yee, B., et al., (2004). Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. R.* 28 (3), 273-283.
- Bergamini, C. M., Gambetti, S., Dondi, A., Cervellati, C., (2004). Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr. Pharm. Design.* 10 (14), 1611-1626.
- Bertoldi, K., Spindler, C., Moysés, F. d. S., Vanzella, C., Lovatel, G. A., et al., (2012). Effect of landfill leachate on oxidative stress of brain structures and liver from rodents: Modulation by photoelectrooxidation process. *Ecotox. Environ. Safe.* .
- Board, P. G., Menon, D., (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *B. B. A. - Gen. Subjects.* 1830 (5), 3267-3288.
- Bouayed, J., Rammal, H., Younos, C., Soulimani, R., (2007). Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 564 (1), 146-149.
- Bradford, M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1), 248-254.
- Brocardo, P. S., Pandolfo, P., Takahashi, R. N., Rodrigues, A. L. S., Dafre, A. L., (2005). Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology.* 207 (2), 283-291.
- Buljan, J., (1996). Pollution limits for discharge of tannery effluents into water bodies and severs. *World Leather* 9,65-68.
- Chahine, S., O'Donnell, M., (2010). Effects of acute or chronic exposure to dietary organic anions on secretion of methotrexate and salicylate by Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster* larvae. *Arch. Insect. Biochem.* 73 (3), 128.
- Chan, L., Lowes, S., Hirst, B. H., (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21 (1), 25-51.
- Chandra, S., Chauhan, L., Murthy, R., Gupta, S., (2006). In vivo genotoxic effects of industrial waste leachates in mice following oral exposure. *Environ. Mol. Mutagen.* 47 (5), 325.
- Chen, J., Wang, Y., Zhang, H., Zhao, X., (2006). Overview on the Studies of Nitrate Pollution in Groundwater [J]. *Prog. Geog.* 1, 4.
- Chien, C., Dauterman, W., (1991). Studies on glutathione S-transferase in *Helicoverpa* (= *Heliothis*) *zea*. *Insect. Biochem.* 21.
- Cravedi, J., Boudry, G., Baradat, M., Rao, D., Debrauwer, L., (2001). Metabolic fate of 2, 4-dichloroaniline, prochloraz and nonylphenol diethoxylate in rainbow trout: a comparative in vivo/in vitro approach. *Aquat. Toxicol.* 53 (3), 159-172.
- Daniel, M., Sharpe, A., Driver, J., Knight, A., Keenan, P., et al., (2004). Results of a technology demonstration project to compare rapid aquatic toxicity screening tests in the analysis of industrial effluents. *J. Environ. Monitor.* 6 (11), 855.

- Davidson, R. J., (2002). Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biol. Psychiat.* 51 (1), 68-80.
- Dean, R., Fu, S., Stocker, R., Davies, M. J., (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324 (Pt 1), 1.
- Dhanapakiam, P., Ramasamy, V., Joseph, M., (2006). Changes in the level of transaminases in Indian major carp, *Labeo rohita* exposed to sublethal concentration of tannery and distillery effluents. *J. Environ. Biol.* 27 (3), 567-570.
- El-Demerdash, F. M., (2011). Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food Chem. Toxicol.* 49 (6), 1346-1352.
- Floyd, R. A., (1999). Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY), Vol. 222. Royal Society of Medicine, 1999, 236-245.*
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E. M., Panayiotidis, M. I., (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 674 (1), 3-22.
- Freitas, A., Funck, V., Rotta, M. S., Bohrer, D., Mörschbacher, V., et al., (2009). Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res. Bull.* 79 (1), 77.
- Giannetti, B., Bonilla, S., Almeida, C., (2004). Developing eco-technologies: A possibility to minimize environmental impact in Southern Brazil. *J. Clean. Produc.* 12 (4), 361-368.
- Gómez, N., Sierra, M., Cortelezzi, A., Capitulo, A., (2008). Effects of discharges from the textile industry on the biotic integrity of benthic assemblages. *Ecotox. Environ. Safe.* 69 (3), 472.
- Green, T., (1997). Methylene chloride induced mouse liver and lung tumours: an overview of the role of mechanistic studies in human safety assessment. *Hum. Exp. Toxicol.* 16 (1), 3-13.
- Gromadzińska, J., Wasowicz, W., Sklodowska, M., Bulikowski, W., Rydzynski, K., (1996). The influence of atmospheric chromium on selenium content and glutathione peroxidase activity in blood of tannery workers. *Environ. Health Persp.* 104 (12), 1312.
- Gül, S., Belge-Kurutaş, E., Yildiz, E., Sahan, A., Doran, F., (2004). Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environ. Int.* 30 (5), 605.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I. M., et al., (1974). The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (10), 3879-3882.
- Halliwell, B., (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. T.* 35 (5), 1147-1150.
- Halliwell, B., Chirico, S., (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57 (5), 715S-724S.
- Han, J., Won, E.-J., Hwang, D.-S., Rhee, J.-S., Lee, J.-S., (2013). Effect of copper exposure on GST activity and on the expression of four GSTs under oxidative stress condition in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*. *Comp. Biochem. Phys. C.* In Press.
- Hayes, J., McLellan, L., (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Res.* 31 (4), 273-300.
- Hearne, J. L., Colman, R. F., (2006). Contribution of the mu loop to the structure and function of rat glutathione transferase M1-1. *Protein Sci.* 15 (6), 1277.

- Hovatta, I., Tennant, R. S., Helton, R., Marr, R. A., Singer, O., et al., (2005). Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature*. 438 (7068), 662-666.
- Igarashi, T., Satoh, T., Ueno, K., Kitagawa, H., (1983). Species difference in glutathione level and glutathione related enzyme activities in rats, mice, guinea pigs and hamsters. *J. Pharmacobio-dynam.* 6 (12), 941.
- Júnior, H., Silva, J., Arenzon, A., Portela, C., Ferreira, I., et al., (2007). Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. *Chemosphere*. 67 (6), 1211.
- Keller, B. O., Davidson, A. G. F., Innis, S. M., (2009). Phthalate metabolites in urine of CF patients are associated with use of enteric-coated pancreatic enzymes. *Environmental toxicology and pharmacology*. 27 (3), 424-427.
- Koetz, P. R., Faria, O. L., Nunes, W. A., (1995). Tratamento de efluentes homogêneos de curtume por digestão anaeróbia em reatores de fluxo ascendente. *Revi. Brasi. Agrociênc.* 1 (1), 23-29.
- Kumar, V., Majumdar, C., Roy, P., (2008). Effects of endocrine disrupting chemicals from leather industry effluents on male reproductive system. *J. Steroid Biochem.* 111 (3-5), 208.
- Landi, S., (2000). Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 463 (3), 247-283.
- LeBel, C. P., Ali, S. F., McKee, M., Bondy, S. C., (1990). Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol. App. Pharm.* 104 (1), 17-24.
- Li, G., Sang, N., Wang, Q., (2006). Oxidative damage induced in brains and livers of mice by landfill leachate. *Ecotox. Environ. Safe.* 65 (1), 134-139.
- Łobiński, R., Pereiro, I. R., Chassaing, H., Wasik, A., Szpunar, J., (1998). Elemental speciation and coupled techniques—towards faster and reliable analyses. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 13 (9), 859-867.
- Marcolin, M. d. L., Benitz, A. d. N. D., Arcego, D. M., Noschang, C., Krolow, R., et al., (2012). Effects of early life interventions and palatable diet on anxiety and on oxidative stress in young rats. *Physiol. Beh.* 106 (4), 491-498.
- Marengo, J. A., (2008). Água e mudanças climáticas. *Estud. Av.* 22 (63).
- Matsumoto, S. T., Mantovani, M. S., Malagutti, M. I. A., Dias, A. L., Fonseca, I. C., et al., (2006). Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet. Mol. Biol.* 29 (1), 148-158.
- Moyses, F., (2010). Rato Como Modelo Animal Para Avaliação Da Toxicidade Induzida Pela Exposição Crônica A Efluentes De Curtumes: Parâmetros Comportamentais E Bioquímicos Dissertação Apresentada no Programa e Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, 2010.
- Moysés, F. d. S., Bertoldi, K., Spindler, C., Sanches, E. F., Elsner, V. R., et al., (2014). Exposition to tannery wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats. *Physiol. Behav.* 129, 160-166.
- Muthuswamy, A. D., Vedagiri, K., Ganesan, M., Chinnakannu, P., (2006). Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: Role of L-carnitine and DL- α -lipoic acid. *Clinica chimica acta.* 368 (1), 84-92.
- Nabb, D. L., Mingoia, R. T., Yang, C.-H., Han, X., (2006). Comparison of basal level metabolic enzyme activities of freshly isolated hepatocytes from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and rat. *Aquat. Toxicol.* 80 (1), 52-59.
- Nadda, G., Saxena, P. N., Srivastava, G., (2005). Effects of sublethal doses of beta-cyfluthrin on mutant *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Appl Entomol Zool.* 40 (2), 265-271.

- Nishimoto, M., Roubal, W. T., Stein, J. E., Varanasi, U., (1991). Oxidative DNA damage in tissues of English sole *parophrys vetulus* exposed to nitrofurantoin. *Chem-Biol. Interact.* 80 (3), 317-326.
- Oral, R., Meriç, S., De Nicola, E., Petruzzelli, D., Della Rocca, C., et al., (2007). Multi-species toxicity evaluation of a chromium-based leather tannery wastewater. *Desalination.* 211 (1), 48-57.
- Pickett, C. B., Lu, A. Y., (1989). Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Ann. Rev. Biochem.* 58 (1), 743-764.
- Prabakaran, M., Binuramesh, C., Steinhagen, D., Dinakaran Michael, R., (2007). Immune response in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* on exposure to tannery effluent. *Ecotox. Environ. Safe.* 68 (3), 372-378.
- Ramos-Gomez, M., Kwak, M.-K., Dolan, P. M., Itoh, K., Yamamoto, M., et al., (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (6), 3410-3415.
- Reveillaud, I., Niedzwiecki, A., Bensch, K., Fleming, J., (1991). Expression of bovine superoxide dismutase in *Drosophila melanogaster* augments resistance of oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 11 (2), 632.
- Sharma, A., Mishra, M., Shukla, A., Kumar, R., Abdin, M., et al., (2012). Organochlorine pesticide, endosulfan induced cellular and organismal response in *Drosophila melanogaster*. *J. Hazard. Mater.* 221, 275.
- Sharma, K., Sharma, S., Singh, P., Kumar, S., Grover, R., et al., (2007). A comparative study on characterization of textile wastewaters (untreated and treated) toxicity by chemical and biological tests. *Chemosphere.* 69 (1), 48.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., Dowd, C. A., (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360 (Pt 1), 1.
- Shen, S., Chien, Y., Chien, C., (2003). Induction of glutathione S-transferases activities in *Drosophila melanogaster* exposed to phenol. *Arch. Insect. Biochem.* 53 (2), 80.
- Siddique, H. R., Gupta, S. C., Dhawan, A., Murthy, R., Saxena, D., et al., (2005). Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 46 (3), 189-197.
- Siddique, H. R., Gupta, S. C., Mitra, K., Bajpai, V. K., Mathur, N., et al., (2008). Adverse effect of tannery waste leachates in transgenic *Drosophila melanogaster*: role of ROS in modulation of Hsp70, oxidative stress and apoptosis. *J. Appl. Toxicol.* 28 (6), 734-748.
- Siqueira, I. R., Vanzella, C., Bianchetti, P., Rodrigues, M. A., Stülp, S., (2011). Anxiety-like behaviour in mice exposed to tannery wastewater: The effect of photoelectrooxidation treatment. *Neurotoxicol. Teratol.* 33 (4), 481.
- Sohal, R., Arnold, L., Orr, W., (1990). Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 56 (3), 223.
- Steward, A. R., Elmarakby, S. A., Stuart, K. G., Kumar, S., Sikka, H. C., (1995). Metabolism of 2-acetylaminofluorene by hepatocytes isolated from rainbow trout. *Toxicol. App. Pharm.* 130 (2), 188-196.
- Su, L., Wang, M., Yin, S.-T., Wang, H.-L., Chen, L., et al., (2008). The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. *Ecotox. Environ. Safe.* 70 (3), 483-489.
- Tagliari, K. C., Cecchini, R., Rocha, J. A. V., Vargas, V. M. F., (2004). Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 561 (1), 101-117.

- Taju, G., Majeed, S., Nambi, K., Sarath, B. V., Vimal, S., et al., (2012). Comparison of in vitro and in vivo acute toxicity assays in *Ectophasia surattensis* (Bloch, 1790) and its three cell lines in relation to tannery effluent. *Chemosphere*. 87 (1), 55.
- Tang, F., Zhang, X.-b., Liu, Y.-s., Gao, X.-w., (2011). Alteration of glutathione S-transferase properties during the development of *Micromelalopha troglodyta* larvae (Lepidoptera: Notodontidae). *J. Forest. Res.* 22 (3), 447-451.
- Tare, V., Gupta, S., Bose, P., (2003). Case studies on biological treatment of tannery effluents in India. *J. Air Waste Manage.* 53 (8), 976-982.
- Tickner, J. A., Schettler, T., Guidotti, T., McCally, M., Rossi, M., (2001). Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: A critical review. *American journal of industrial medicine*. 39 (1), 100-111.
- Tigini, V., Giansanti, P., Mangiavillano, A., Pannocchia, A., Varese, G., (2011). Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. *Ecotox. Environ. Safe.* 74 (4), 866.
- Ulrich, A. B., Standop, J., Schmied, B. M., Schneider, M. B., Lawson, T. A., et al., (2002). Species differences in the distribution of drug-metabolizing enzymes in the pancreas. *Toxicol. Pathol.* 30 (2), 247-253.
- Vargas, V. M. F., Rosa, D. P., Sarmiento, E. C., Rocha, J. A. V., Tagliari, K. C., et al., (2007). Atividade mutagênica como parâmetro ambiental para avaliar a qualidade em bacias hidrográficas. *Fepam em Revista*. 1 (1), 4-11.
- Wang, H., Zhang, J., Yu, H., (2007). Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Bio. Med.* 42 (10), 1524-1533.
- Weisbrod, A. V., Sahi, J., Segner, H., James, M. O., Nichols, J., et al., (2009). The state of in vitro science for use in bioaccumulation assessments for fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (1), 86-96.
- Wendel, A., Feuerstein, S., (1981). Drug-induced lipid peroxidation in mice — Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem. Pharmacol.* 30 (18), 2513-2520.
- Yamamoto, K., Zhang, P., Miake, F., Kashige, N., Aso, Y., et al., (2005). Cloning, expression and characterization of theta-class glutathione S-transferase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 141 (3), 340.
- Yang, Y., Cheng, J.-Z., Singhal, S. S., Saini, M., Pandya, U., et al., (2001). Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation overexpression of HGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J. Biol. Chem.* 276 (22), 19220-19230.
- Yu, S., Consequences of induction of foreign compound-metabolizing enzymes in insects. Yu, S., (1986). Consequences of induction of foreign compound-metabolizing enzymes in insects. *Molecular aspects of insect-plant associations*. 153-174.

9. ANEXOS

ANEXO 1 – Artigo 1

“Glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities in liver and brain are rodent species-dependent following exposure to tannery effluent” submetido em Junho de 2014 para a *Neurotoxicology and Teratology*.

- Fwd: A manuscript number has been assigned to Glutathione peroxidase and glutathi...

----- Mensagem original -----

Assunto: A manuscript number has been assigned to Glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities in liver and brain are rodent species-dependent following exposure to tannery effluent

Data: 2014-06-06 14:48

Remetente: "Neurotoxicology & Teratology" <easwigarntt@gmail.com>

Para: ionara@ufrgs.br

Dear Dr. Ionara Siqueira,

Your submission entitled "Glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities in liver and brain are rodent species-dependent following exposure to tannery effluent" has been been assigned the following manuscript number: NTT-14-65.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/ntt/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Neurotoxicology and Teratology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities in liver and brain are rodent species-dependent following exposure to tannery effluent

Felipe dos Santos Moysés^a, Karine Bertoldi^a, Viviane Rostirola Elsner^a, Marco Antônio Siqueira Rodrigues^b, Ionara Rodrigues Siqueira^{a, c, *}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS – Brazil.

^bInstituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS, Brazil

^cDepartamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding Author: Ionara Rodrigues Siqueira, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202, 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 3316 3121; E-mail: ionara@ufrgs.br

Abstract

It has been demonstrated that mice exposed to tannery effluent show an anxiety-like behavior, without any behavioral effects in rats. Our hypothesis is that mice, a responsive species, and rat, a non-responsive species, are divergent in their hepatic and brain biochemical responses induced by wastewater. Our aim was to evaluate the effects of tannery effluent on oxidative status parameters in brain structures and liver of mice and rats. The homogenates were incubated with different concentrations of tannery effluent or water. The mixture was used to assess levels of free radicals and activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase. Exposure to tannery effluent induced similar effects in brain structures of rats and mice, since increased free radicals levels in cerebellum, hippocampus and cortex and reduced superoxide dismutase activity in hippocampus. Besides, there was an increase in the free radicals in mice liver when exposed to tannery effluent, without any effect in rat liver. Moreover, rat liver showed an increase in glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities when exposed to effluent, while this pattern was not observed in mice liver. Our data suggest that divergent species-dependent hepatic enzymes adaptations might reflect differences in oxidative status and yet in the bioavailability of tannery effluent compounds.

Keywords: tannery effluent; oxidative parameters; rat; mice; glutathione peroxidase; glutathione S-transferase.

1. Introduction

Water pollution is a global problem related mainly to population growth, urbanization and industrialization (Chen et al., 2006; Ma et al., 2009). However, there is limited information regarding the exposure to a complex chemical mixture as tannery wastewater (Siddique et al., 2008). In this context, the leather-tanning industry is one of the major polluters of freshwater bodies, especially in developing countries, such as Brazil. The wastewater generated by tanneries is very complex, since a large amount and variety of chemical agents are used in hide processing. It has been supposed that single constituent-induced toxicity cannot predict the effects induced by wastewater, since the combined effects of all chemical species and their potential synergistic effects can impact the global effect on organisms (Siddique et al., 2008; Tigini et al., 2011)

The oxidative stress has been suggested as a central biochemical mechanism of toxicity from several environmental toxicants (El-Demerdash, 2011; Franco et al., 2009). Exposure to xenobiotics can increase reactive oxygen species content, such as superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical, and/ or may modify the antioxidant capacity (Brocardo et al., 2005; Franco et al., 2009), resulting in an attack to macromolecules such as lipids, proteins and DNA, what can contribute to a wide range of diseases including cardiovascular and neurodegenerative diseases (Bergamini et al., 2004; Dean et al., 1997; Muthuswamy et al., 2006). It is important to note that in order to handle the free radicals, cells have antioxidant systems, which consists of non-enzymatic scavengers (such as tocopherol, ascorbate, carotenoids, flavonoids) and an enzymatic antioxidant systems, including enzymes like superoxide dismutase that converts $O_2^{\cdot -}$ into H_2O_2 , catalase, which is related to H_2O_2 detoxification, and glutathione peroxidase that breaks down peroxides, notably those derived from the oxidation of membrane phospholipids (Halliwell and Chirico, 1993). In addition, the glutathione S-transferase can contribute to the detoxification of free radicals (Board and Menon, 2013). Glutathione S-transferases are a ubiquitous family of biotransformation involved in the metabolic detoxification of a wide range of xenobiotics and endogenous electrophilic compounds (Hayes and McLellan, 1999; Landi, 2000). The glutathione S-transferases conjugate

non-polar compounds, including xenobiotics, to glutathione, forming water-soluble glutathione-conjugates that are readily transported out of the cell. Indeed, the role of hepatic glutathione S-transferase has been widely demonstrated, for example, knockout mice, in which hepatic glutathione S-transferase activity is reduced by 50% compared with wild-type mice, are more susceptible to benzo[a]pyrene carcinogenesis (Ramos-Gomez et al., 2001).

It is important to cite that the exposure to tannery wastewater is modestly studied. In an elegant study, Tagliari and colleagues (2004) demonstrated that liver fish, namely *Gymnogeophagus gymnogenys*, collected in an impacted area by industrial, urban and agricultural contamination, specially related to discharges of domestic and tannery wastewaters, has higher SOD activity and lipoperoxidation levels than those obtained from non-polluted area. Recently, it was investigated the neurobehavioral effects of exposure of mice to tannery effluents using behavioral models where tannery effluent induces an anxiety-like behavior in mice (Siqueira et al., 2011). However, studies reporting the biochemical mechanisms of tannery effluent-induced anxiety are lack. Considering that different species may show variation in their responses to chemicals, it was tested other species of laboratory animals, specifically Wistar rats. Surprisingly, exposure of Wistar rats to tannery effluent did not modify any studied behavioral and biochemical evaluated parameters in animal models of locomotion, memory, anxiety and depression, besides oxidative status markers (Moysés et al., 2014). Despite these findings, to our knowledge there are no studies reporting biochemical mechanisms involved in this difference.

Our working hypothesis is that the discrepancies in behavioral findings between mice and rats may be related to neurochemical and hepatic responses to exposure tannery effluent. Considering that in vitro exposure can reflect species differences and peculiarities in xenobiotic metabolism (Nabb et al., 2006; Steward et al., 1995; Ulrich et al., 2002; Weisbrod et al., 2009), the aim of this study was to evaluate the in vitro effects of tannery effluent on levels of free radicals, and activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase in brain areas and liver of two mammal species, specifically mice and rats.

2. Material and Methods

2.1. Tannery effluent

The wastewater used in the study was collected from a tannery located in Rio Grande do Sul state, southern Brazil. The tannery effluent was collected after their treatment by a conventional method (physicochemical, followed by specified units of biological treatment). The effluent characteristics were showed in Table 1 and Table 2. Physico–chemical properties are described in Table 1, while characterization of organic compounds in Table 2.

2.2. Animals

Adult male Swiss albino mice (CF1 strain) were obtained at 3-5 months of age, provided by the Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde (FEPPS) in Porto Alegre, RS and adult male Wistar rats aged 3-5 months were provided by Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). The animals were housed (five per cage) with food and water *ad libitum* and kept under standard conditions (12-h light/dark cycle, 22±2 °C). The recommendations of the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication No. 80-23, revised 1996) were followed throughout the study and all experiments were approved by the Local Institutional Research Ethics Committee (Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRGS # 21234).

2.3. Tissue preparation and incubation

At the day of the experiments the animals were decapitated; brains were immediately removed and washed using chilled saline solution. The cortex, striatum, hippocampus and liver were rapidly dissected out, instantaneously placed in liquid nitrogen and stored at -80°C. After, the structures were homogenized in 10 volumes of ice-cold phosphate buffer (pH 7.4). To assay glutathione S-transferase activity, samples were homogenized to Tris-HCL (pH 7.5). The

homogenate was centrifuged at 1000xg for 10 minutes at 4°C. The resultant supernatant was incubated with different concentrations of tannery effluent (0, 3, 10, 30 and 50%) at 37°C for 30 minutes (glutathione S-transferase activity) or 60 minutes (oxidative parameters). The mixture (n= 6-8 per group) was used to evaluate the levels of free radicals and activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase.

2.4. Levels of free radicals

To assess the levels of free radicals we used 2-7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a probe (LeBel et al., 1990). An aliquot of the mixture of tissue supernatant and tannery effluent was incubated with DCFH-DA (100 mM) at 37°C for 30 min. The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and emission wavelengths of 488 nm and 525 nm, respectively. All procedures were performed in the dark and blanks containing DCFH-DA (no supernatant) were processed for measurement of fluorescence.

2.5. Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase activity was determined using a RANSOD kit (Randox Labs, USA). This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate $O_2^{\cdot -}$ that reacts with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5 phenyltetrazolium chloride to form a red formazan dye, which is spectrophotometrically assayed at 505 nm and 37°C. The inhibition of chromogen production is proportional to the activity of superoxide dismutase present in the sample.

2.6. Glutathione peroxidase activity

Glutathione peroxidase activity was determined according to Wendel (1981). The reaction was carried out at 37 °C in a solution containing 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.7), 1.1 mM EDTA, 0.44 mM sodium azide, 0.5 mM NADPH, 2 mM glutathione and 0.4 U glutathione reductase. The activity of glutathione peroxidase was measured taking tertbutyl hydroperoxide as the substrate at 340 nm. The contribution of spontaneous NADPH oxidation

was always subtracted from the overall reaction ratio. Glutathione peroxidase activity was expressed as nmol NADPH oxidized per minute per mg protein (Marcolin et al., 2012).

2.7. Glutathione S-transferase activity

Glutathione S-transferase activity was measured by the method of Habig(1974).The reaction mixture contained an aliquot, potassium phosphate buffer pH 7.4, glutathione (1 mM) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (1 mM), which was used as substrate. The reaction was carried out at 37°C and monitored spectrophotometrically at 340 nm for 5 minutes.

2.8. Protein determination

The protein content of the tissue homogenates was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

2.9. Statistical analysis

The results were expressed as percentage of control, where the homogenate without effluent (0% of tannery effluent) was taken as 100%. Results were expressed as medians (25th/75th of percentiles). It was employed Kruskal–Wallis followed by Dunn test. In order to the interaction between factors species and treatment (effluent), when individual control values was converted to parametric data, using the control group mean (0% of tannery effluent), Two-way ANOVA was used. In all tests, $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Levels of free radicals

The exposure to tannery effluent increased the levels of free radicals in the mice liver (KW = 33.60, $p < 0.0001$), although the incubation did not alter this parameter in rats (Table 3). Accordantly, Two-way ANOVA indicated the effect of parameters, species and treatment, besides a significant interaction between the factors, species and treatment, in liver [F (1, 80) =

2.95, $p = 0.025$] was demonstrated, since tannery effluent only increased the DCF formed in liver mice.

The *in vitro* exposure to tannery effluent increased free radical content in cerebella, cortices and hippocampi of rats and mice (Table 4). There was an increase in free radicals levels in rats (KW = 32.93, $p < 0.0001$) and mice (KW = 15.86, $p < 0.0032$) in the cortex. The free radical content was higher in hippocampus of rats (KW = 13.66, $p = 0.0085$) and mice (KW = 12.67, $p = 0.0130$) incubated with effluent. The tannery effluent increased DCF formed levels in both cerebella from rats (KW = 13.66, $p = 0.0085$) and mice (KW = 20.66, $p = 0.0004$). The *in vitro* exposure to tannery effluent did not alter this parameter in striatum of both species (data not shown).

3.2. Superoxide dismutase activity

The superoxide dismutase activity was decreased in hippocampus of rat and mice when exposed to tannery effluent, respectively (KW = 15.37, $p = 0.004$; KW = 20.58, $p = 0.004$; Table 5). Similarly, it was observed that mice cerebella have lower superoxide dismutase activity when exposed to tannery (KW = 15.88, $p = 0.0032$; Table 5). Although, this exposure did not alter superoxide dismutase activity in rat cerebellum (Table 5), as well as in striatum, liver and cortex of both species (data not shown).

3.3. Glutathione peroxidase activity

The exposure to tannery effluent increased glutathione peroxidase activity in liver rats (KW = 17.13, $p < 0.0018$; Table 3), without any effect in the mice group. Two-way ANOVA demonstrated the effect of treatment and species, as well as a significant interaction between factors, species and treatment, on hepatic glutathione peroxidase activity [$F(1, 80) = 2.870$, $p = 0.029$], since this treatment increased this parameter only in rats liver.

The *in vitro* exposure to tannery effluent increased enzyme activity in all tested brain areas of rats, namely cerebellum (KW = 9.66, $p = 0.0466$), cortex (KW = 20.15, $p < 0.0005$), striatum (KW = 21.68, $p < 0.0002$), hippocampus (KW = 18.42, $p = 0.001$) as demonstrated in Table 6.

While, the incubation increased glutathione peroxidase activity in cerebellum (KW = 14.29, $p = 0.0064$) and cortex (KW = 12.85, $p < 0.012$) of mice (Table 6). Moreover, two-way ANOVA identified a tendency to interaction between factors, species and treatment, since the increase of glutathione peroxidase activity was higher in hippocampus [$F(1, 78) = 2.220$, $p = 0.076$] and striatum [$F(1, 74) = 2.21$, $p = 0.078$] of rats.

3.4. Glutathione S-transferase activity

The incubation with tannery effluent induced an augment in glutathione S-transferase activity in rat liver (KW = 16.44, $p < 0.0025$), without any effect in the mice group (Table 3). There was a decline in glutathione S-transferase activity in cerebellum of both species, rats and mice (respectively, KW = 25.08, $p < 0.0001$; KW = 12.86, $p = 0.012$; Table 7). Likewise, this effect was also observed in hippocampus (rats, KW = 24.67, $p < 0.0001$; mice, KW = 14.1, $p = 0.007$; Table 7). However, the incubation with tannery effluent did not alter this parameter in striatum and cortex of both species (data not shown).

4. Discussion

The present data corroborates the hypothesis that mice, a responsive species, and rat, a non-responsive species, are divergent in their cellular oxidative status responses induced by wastewater. Although there is an extensive literature describing the brain vulnerability to oxidative injury induced by xenobiotics (Franco et al., 2009; Li et al., 2006), until the present moment, studies reporting the effects of tannery effluent exposure on oxidative status in brain structures are rare. Therefore, we have addressed the role of the impact of wastewater exposure on oxidative status in different brain areas of rodents, since the brain structures exhibit distinct functions on cognitive and motor functions (Navarro et al., 2002).

The effect of in vitro exposure to tannery effluent on free radical content was similar in brain structures of rats and mice. In this study we found increased free radical content in cerebellum, cortex and hippocampus of mice and rats. This increase in free radical levels can

lead to oxidative stress and succeeding macromolecules damage, including lipids, proteins and nucleic acids (Floyd, 1999). Membrane lipids are important targets of free radicals, generating lipid peroxidation products such as lipid hydroperoxides (Battin and Brumaghim, 2009; Floyd, 1999).

Regarding the superoxide dismutase and glutathione S-transferase, there was a decrease in their activities in the hippocampus and cerebellum of both species. Depletion of these antioxidant defenses facilitates the accumulation of reactive oxygen species which can lead to cell damage, as well as may contribute to the toxicity of tannery effluent (Board and Menon, 2013; Franco et al., 2009). Taken that several oxidative parameters in hippocampus, cortex and cerebellum react with similar profile to in vitro exposure wastewater, we can suppose that the impact on liver, resulting in dissimilar bioavailability, has central role to behavioral finding (Moysés *et al.*, 2014; Siqueira *et al.*, 2011)

It is important to note that hippocampus and cortex are brain regions associated with anxiety behavior (Bannerman et al., 2004; Davidson, 2002). The increased free radicals levels induced by exposure to tannery wastewater can be, at least in part, related to anxiety-like profile, given that studies indicated a positive correlation between intracellular redox status and stress-related anxiety in mice (Bouayed et al., 2007; Hovatta et al., 2005).

Interestingly, incubation with tannery wastewater did not alter the free radicals levels in the striatum of rodents. According to Adams (1993), the striatum has more protective capacity than other brain regions during oxidative stress. Given that striatum is associated with motor activity (Avila-Costa et al., 2001), and the free radicals levels remain unaltered in striatum, we can suppose that exposure to tannery wastewater may not cause locomotor deficits.

It is important to note that the tannery wastewater increased glutathione peroxidase activity in all studied brain structures from rats, as well as in rat liver, while the impact was modest in mice. Taken that, glutathione peroxidase has an important role in cellular antioxidant defense through catalyze the reduction of hydroperoxides to water (Margis et al., 2008), we could

suggest that rats may efficiently break down peroxides derived from the oxidation of membrane phospholipids.

Glutathione peroxidase is the general name for a family of multiple isoenzymes; mammalian glutathione peroxidases 1-4 are selenoproteins. In this context, some studies have correlated the glutathione peroxidase activity with the levels of selenium (Brigelius-Flohé, 1999; Brown et al., 2000; Margis et al., 2008). Zuo and colleagues (2006) described low selenium levels, elevated glutathione peroxidase activity and copper levels in leukemic patients, indicating that higher copper content can increase the glutathione peroxidase activity. In accordance, Han and colleagues (2013) demonstrated that exposure to copper induces an increase in activities of several antioxidant enzymes, glutathione peroxidase and glutathione reductase, in rotifers.

We also showed that there was a decrease in superoxide dismutase activity in cerebellum from mice. This result corroborates the regional heterogeneity to neurotoxicants might be related to dissimilar antioxidant capacity in different cerebral area (Candelario-Jalil et al., 2001), as well as the difference in the metabolizing of xenobiotics in dissimilar species (Green, 1997; Ulrich et al., 2002)

The most relevance of our finding is that tannery effluent is able to alter antioxidant enzyme activities in rat liver, including those involved with detoxification of xenobiotics. The incubation with tannery wastewater increased hepatic glutathione peroxidase and glutathione

S-transferase activities, whereas these parameters remained unaltered in mice. Accordingly, increased glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities can be related to the fact that rat is a behaviorally non-responsive species, as well as to unchanged levels of free radicals in liver rats.

Taken that, glutathione S-transferase is involved in xenobiotic detoxification (Franco et al., 2009; Hayes and McLellan, 1999) and liver has central role in oral bioavailability of

compounds (Chan et al., 2004), we can suppose that increased activity of liver glutathione S-transferase could amplify the efficiency of detoxification of tannery wastewater in rats. In accordance, since the exposure to wastewater did not augment the activity of this enzyme in liver mice, the rat liver has higher ability to biotransform this xenobiotic. Interestingly, several works showed that glutathione S-transferase activity is higher in hamsters compared to rats (Åström et al., 1987; Igarashi et al., 1983), supporting the idea that glutathione S-transferases may vary between species. It is important to note that mammalian glutathione S-transferases have been classified in different classes, namely alpha, mu, pi, sigma, kappa, theta and zeta. Interestingly, sublethal concentrations of copper augmented the glutathione S-transferases expression, particularly, omega, sigma, and zeta classes in rotifer *Brachionus koreanus* (Han et al., 2013). Several factors, such as the density of glutathione S-transferases classes and its distribution in the tissue from each species, may be involved with dissimilar detoxification in mammals (Landi, 2000; Sheehan et al., 2001). For example, the dichloromethane, a substrate of glutathione S-transferase θ , induces liver and lung tumor in mice, without any effect in rats and hamsters (Green, 1997); we could infer that the biotransformation of dichloromethane, as well the tannery wastewater, is higher in rats and hamsters compared to mice (Landi, 2000).

Our findings may be related to our behavioral results, since mice exposed to tannery effluent showed an anxiety-like behavior, without any behavioral effects in rats (Moyses et al., 2014; Siqueira et al. 2011). We may suggest that the increased hepatic glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities observed in rats can contribute to an appropriate detoxification, and therefore could decrease the toxicity of tannery wastewater. Thus, the mice were unable to increase these enzymes activities, consequently this species appear to be more susceptible to wastewaters exposure. Previously, it was demonstrated a similar response to another contaminant, the landfill leachate (Bertoldi et al., 2012).

It is important to note that at this moment it is impossible to determine what compound(s) is primarily responsible for the toxicity of tannery wastewater, since the composition of this wastewater is actually complex (Table 1 and 2). Major components include organic and

inorganic compounds such as tannins, surfactants, sulfonated oils, dyes, biocides, acrylic resins, organic acids, as well as ammonium, chromium, chloride, and sulfide salts (Cassano et al., 1997; Prabakaran et al., 2007; Tare et al., 2003). These compounds are known for their toxic effects in the liver, reproductive tract, kidneys, lungs, and heart, besides teratogenicity at critical points in development (Tickner et al., 2001). However, industrial effluents contain several unknown compounds, which can represent a risk of unidentified magnitude, indeed their synergistic or antagonistic effects might alter the response to exposure (Siddique et al., 2005).

In conclusion, our data suggest that liver glutathione peroxidase and glutathione S-transferase enzymes have a central role on divergent behavioral responses between rat and mice induced by exposure to tannery effluent. It is clear that more studies are necessary to elucidate the precise mechanism by which tannery effluent causes divergent response in rodent species.

Conflict of interest statement

There are no known conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian funding agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul — FAPERGS; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — CAPES (F. S. Moysés); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — CNPq (Dr. I.R. Siqueira; F. S. Moysés; V.R. Elsner; K. Bertoldi).

References

Adams JD, Wang B, Klaidman LK, Lebel CP, Odunze IN, Shah D. New aspects of brain oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Free Radical Bio Med* 1993; 15(2): 195-202.

Åström A, Månér S, DePierre J. Induction of liver microsomal epoxide hydrolase, UDP-glucuronyl transferase and cytosolic glutathione transferase in different rodent species by 2-acetylaminofluorene or 3-methylcholanthrene. *Xenobiotica* 1987; 17(2): 155-163.

Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Fortoul TI, Machado-Salas JP, Espinosa-Villanueva J, Rugerio-Vargas C, et al. Motor impairments in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat striatum and prefrontal cortex. *Int J Neurosci* 2001; 108(3-4): 193-200.

Bannerman D, Rawlins J, McHugh S, Deacon R, Yee B, Bast T, et al. Regional dissociations within the hippocampus — memory and anxiety. *Neurosci Biobehav R* 2004; 28(3): 273-283.

Battin EE, Brumaghim JL. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 2009; 55(1): 1-23.

Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Design* 2004; 10(14): 1611-1626.

Bertoldi K, Spindler C, Moysés FdS, Vanzella C, Lovatel GA, Elsner VR, et al. Effect of landfill leachate on oxidative stress of brain structures and liver from rodents: Modulation by photoelectrooxidation process. *Ecotox Environ Safe* 2012.

Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *B B A - Gen Subjects* 2013; 1830 (5): 3267-3288.

Bouayed J, Rammal H, Younos C, Soulimani R. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *Eur J Pharmacol* 2007; 564(1): 146-149.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(1): 248-254.

Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Bio Med* 1999; 27(9): 951-965.

Brocardo PS, Pandolfo P, Takahashi RN, Rodrigues ALS, Dafre AL. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology* 2005; 207(2): 283-291.

Brown KM, Pickard K, Nicol F, Beckett GJ, Duthie GG, Arthur JR. Effect of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. *Clin Sci* 2000; 98(5): 593-599.

Candelario-Jalil E, Mhadu NH, Al-Dalain SM, Martínez G, León OS. Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci Res* 2001; 41(3): 233-241.

Cassano A, Drioli E, Molinari R. Recovery and reuse of chemicals in unhairing, degreasing and chromium tanning processes by membranes. *Desalination* 1997; 113(2): 251-261.

Chan L, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21(1): 25-51.

Chen J, Wang Y, Zhang H, Zhao X. Overview on the Studies of Nitrate Pollution in Groundwater [J]. *Prog Geog* 2006; 1: 4.

Davidson RJ. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biol Psychiat* 2002; 51(1): 68-80.

Dean R, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324(Pt 1): 1.

El-Demerdash FM. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food Chem Toxicol* 2011; 49(6): 1346-1352.

Floyd RA, (1999). Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY), Vol. 222. Royal Society of Medicine, 1999, 236-245.

Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutat Res-Gen Tox En* 2009; 674(1): 3-22.

Green T. Methylene chloride induced mouse liver and lung tumours: an overview of the role of mechanistic studies in human safety assessment. *Hum Exp Toxicol* 1997; 16(1): 3-13.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974; 249(22): 7130-9.

Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(5): 715S-724S.

Han J, Won E-J, Hwang D-S, Rhee J-S, Lee J-S. Effect of copper exposure on GST activity and on the expression of four GSTs under oxidative stress condition in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*. *Comp Biochem Phys C* 2013; In Press.

Hayes J, McLellan L. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Res* 1999; 31(4): 273-300.

Hovatta I, Tennant RS, Helton R, Marr RA, Singer O, Redwine JM, et al. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 2005; 438(7068): 662-666.

Igarashi T, Satoh T, Ueno K, Kitagawa H. Species difference in glutathione level and glutathione related enzyme activities in rats, mice, guinea pigs and hamsters. *J Pharmacobiodynam* 1983; 6(12): 941.

Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res-Gen Tox En* 2000; 463(3): 247-283.

LeBel CP, Ali SF, McKee M, Bondy SC. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol App Pharm* 1990; 104(1): 17-24.

Li G, Sang N, Wang Q. Oxidative damage induced in brains and livers of mice by landfill leachate. *Ecotox Environ Safe* 2006; 65(1): 134-139.

Ma J, Ding Z, Wei G, Zhao H, Huang T. Sources of water pollution and evolution of water quality in the Wuwei basin of Shiyang river, Northwest China. *J Environ Manage* 2009; 90(2): 1168-1177.

Marcolin MdL, Benitz AdND, Arcego DM, Noschang C, Krolow R, Dalmaz C. Effects of early life interventions and palatable diet on anxiety and on oxidative stress in young rats. *Physiol Beh* 2012; 106 (4): 491-498.

Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis- Pinheiro M. Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *Febs J* 2008; 275(15): 3959-3970.

Moysés FdS, Bertoldi K, Spindler C, Sanches EF, Elsner VR, Rodrigues MAS, et al. Exposition to tannery wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats. *Physiol. Behav.* 2014; 129: 160-166.

Muthuswamy AD, Vedagiri K, Ganesan M, Chinnakannu P. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: role of l-carnitine and DL- α -lipoic acid. *Clin Chim Acta* 2006; 368(1-2): 84-92.

Nabb DL, Mingoia RT, Yang C-H, Han X. Comparison of basal level metabolic enzyme activities of freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat. *Aquat. Toxicol.* 2006; 80(1): 52-59.

Navarro A, Del Pino MJS, Gómez C, Peralta JL, Boveris A. Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am J Physiol - Reg I* 2002; 282(4): R985-R992.

Prabakaran M, Binuramesh C, Steinhagen D, Dinakaran Michael R. Immune response in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* on exposure to tannery effluent. *Ecotox Environ Safe* 2007; 68(3): 372-378.

Ramos-Gomez M, Kwak M-K, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(6): 3410-3415.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 2001; 360(Pt 1): 1.

Siddique HR, Gupta SC, Dhawan A, Murthy R, Saxena D, Chowdhuri DK. Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 2005; 46(3): 189-197.

Siddique HR, Gupta SC, Mitra K, Bajpai VK, Mathur N, Murthy RC, et al. Adverse effect of tannery waste leachates in transgenic *Drosophila melanogaster*: role of ROS in modulation of Hsp70, oxidative stress and apoptosis. *J. Appl. Toxicol.* 2008; 28(6): 734-748.

Siqueira IR, Vanzella C, Bianchetti P, Rodrigues MA, Stülp S. Anxiety-like behaviour in mice exposed to tannery wastewater: The effect of photoelectrooxidation treatment. *Neurotoxicol Teratol* 2011; 33(4): 481.

Steward AR, Elmarakby SA, Stuart KG, Kumar S, Sikka HC. Metabolism of 2-acetylaminofluorene by hepatocytes isolated from rainbow trout. *Toxicol App Pharm* 1995; 130(2): 188-196.

Tagliari KC, Cecchini R, Rocha JAV, Vargas VMF. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutat Res-Gen Tox En* 2004; 561(1): 101-117.

Tare V, Gupta S, Bose P. Case studies on biological treatment of tannery effluents in India. *J Air Waste Manage* 2003; 53(8): 976-982.

Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, Rossi M. Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: A critical review. *American journal of industrial medicine* 2001; 39(1): 100-111.

Tigini V, Giansanti P, Mangiavillano A, Pannocchia A, Varese GC. Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. *Ecotox Environ Safe* 2011; 74(4): 866-873.

Ulrich AB, Standop J, Schmied BM, Schneider MB, Lawson TA, Pour PM. Species differences in the distribution of drug-metabolizing enzymes in the pancreas. *Toxicol Pathol* 2002; 30(2): 247-253.

Weisbrod AV, Sahi J, Segner H, James MO, Nichols J, Schultz I, et al. The state of in vitro science for use in bioaccumulation assessments for fish. *Environ Toxicol Chem* 2009; 28(1): 86-96.

Wendel A, Feuerstein S. Drug-induced lipid peroxidation in mice — Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem Pharmacol* 1981; 30(18): 2513-2520.

Zuo X, Chen J, Zhou X, Li X, Mei G. Levels of selenium, zinc, copper, and antioxidant enzyme activity in patients with leukemia. *Biol Trace Elem Res* 2006; 114(1-3): 41-53.

Table 1. Physico–chemical properties of the tannery effluent.

| Parameter | Tannery Effluent |
|--|------------------|
| COD (mgO ₂ /L) | 320 |
| BOD ₅ (mgO ₂ /L) | 240 |
| pH | 7 |
| Total solids (mg/L) | 10469 |
| Total nitrogen (mg/L) | 180 |
| Ammoniacal nitrogen (mg/L) | 90 |
| Chlorides (mg/L) | 3650 |
| Phosphorus (mg/L) | 0,9 |
| Total chrome (mg/L) | 0,3 |
| Total calcium (mg/L) | 218 |
| Total magnesium (mg/L) | 198 |
| Total sodium (mg/L) | 2800 |

COD = chemical oxygen demand; BOD₅ = biochemical oxygen demand.

Table 2.Characterization of *organic compounds* in tannery effluents using GC / MS.

| Extraction solvente | Retention time (min) | NIST library ID |
|--------------------------|----------------------|---|
| Hexane | 18.08 | Tetramethyl decane |
| | 19.76 | 1-hexadecene |
| | 19.86 | n-hexadecane |
| | 20.19 | 2-(methylthio)benzothiazole |
| | 21.87 | 2-methyl-4-isopropylheptane |
| | 22.54 | 1-octadecene |
| | 22.64 | n-octadecane |
| | 23.66 | Diisobutylphthalate |
| | 24.62 | Sulfurousacid, hexyltetradecylester |
| | 27 | n-octadecanoicacid |
| | 28.52 | n-tricosane |
| | 29.55 | n-tetraconsane |
| | 30.54 | n-pentacosane |
| | 31.14 | Dioctylphthalate |
| | 31.5 | n-hexacosane |
| | 32.43 | n-heptacosane |
| | 33.32 | n-octacosane |
| | 34.19 | n-nonacosane |
| | 36 | n-triacontane |
| 37.08 | n-hentriacontane | |
| Dichloromethane/hexane | 22.95 | Heptasiloxane |
| | 24.09 | Phthalate |
| | 26.64 | Hexadecamethyl-cyclooctasioxane |
| | 28.52 | Sulfurousacid, octadecyl 2-propyl ester |
| | 30.05 | n-octasane |
| | 31.51 | n-nonocasane |
| Methanol/dichloromethane | 20.2 | Nitroaniline |
| | 31.14 | Diisooctylphthalate |
| | 33.67 | Squalene |
| | 33.76 and 33.99 | Phthalates |

The analysis of tannery wastewater was performed by GC / MS. The solid phase extraction was made with an SPE Puller, Model D, Visiprep TM (Supelco, USA). Extractions with different solvents (hexane, dichloromethane / hexane and methanol / dichloromethane) were performed and substances in fractions are characterized by gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS Clarus 680, Perkin Elmer, RTX-5ms column, 30m x 0.25 mm x 0.25 mM). MS analyzes were conducted in scan mode. The mass spectrometer was scanning from 30 to 400 amu (TERNES). Identification of compounds was based on comparison of mass spectra with mass spectral those of databases (NIST Mass Spectral Library MS-2008).

Table 3. Effect of tannery effluent on levels of free radicals, glutathione peroxidase activity and glutathione S-transferase activity in liver of mice and rats.

| Tannery Effluent (%) | Rats | | | Mice | | |
|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| | DCF | GPx activity | GST activity | DCF | GPx activity | GST activity |
| 0 | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) |
| 3 | 92.7 (89.6, 93.7) | 120.8 (116.1, 168) | 101.5 (100.6, 102.6) | 90.5 (87.3, 104.9) | 102.5 (93.5, 114.8) | 101.3 (99.7, 106.1) |
| 10 | 94 (92, 97.9) | 143.0 (118.4, 188.3) | 103.2 (102.6, 106.1)* | 97.7 (88.9, 112.1) | 106.3 (98.3, 119.2) | 102.3 (98.3, 105.5) |
| 30 | 107.3 (106, 110) | 180.4 (131, 216.3) * | 101.6 (100.1, 103) | 123.4 (117, 128.7)* | 107.1 (100, 121.6) | 102.1 (99, 104) |
| 50 | 113.5 (109.4, 121.8) | 172.9 (115.9, 228.2)* | 105.9 (103.8, 106.6)* | 126.8 (121.6, 131.7)* | 114.6 (102, 120.8) | 102.2 (100.5, 103.8) |

Results were represented as percentage of control group (values 0% of tannery effluent was considered 100% of DCF formed, glutathione peroxidase activity or glutathione s-transferase activity).

Data was expressed as median (25th/75th percentiles) and analyzed by Kruskal–Wallis followed by

Dunn's test.* Values significantly different from 0% (control group), $p < 0.05$

Table 4. Effect of tannery effluent on effluent on levels of free radicals in cerebellum, cortex and hippocampus of mice and rats

| Tannery Effluent (%) | Rat | | | Mice | | |
|----------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Cerebellum | Cortex | Hippocampus | Cerebellum | Cortex | Hippocampus |
| | 0 | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) |
| 3 | 104 (99.8, 110.6) | 113.4 (102.6, 115.6) | 99.6 (93.3, 102.4) | 97.8 (95.3, 103.8) | 100.8 (97.4, 115.5) | 104.3 (101.6, 110.8) |
| 10 | 109.4 (96.9, 111.8) | 119.8 (114, 124.4) | 102.9 (99, 112.3) | 103.3 (91.1, 105.7) | 117.9 (108.4, 138.4)* | 101.3 (97.4, 110.9) |
| 30 | 117.4 (107.1, 129)* | 134.9 (134, 136.4)* | 106.5 (102.7, 115) | 108.2 (105.2, 112.8) | 128.3 (128.3, 130.6)* | 111.8 (83.9, 120.6) |
| 50 | 109.8 (104.1, 128.7) | 140.5 (137.7, 144.7)* | 112.2 (103.1, 115)* | 120.6 (112, 126.4) * | 118.6 (107, 133.1) | 120.1 (107.6, 130.6)* |

Results were represented as percentage of control group (values 0% of tannery effluent was considered 100% of DCF formed). Data was expressed as median (25th/75th percentiles) and analyzed by Kruskal–Wallis followed by Dunn’s test.* Values significantly different from 0% (control group), $p < 0.05$.

Table 5. Effect of tannery effluent on superoxide dismutase activity in cerebellum and hippocampus of rats and mice.

| Tannery Effluent (%) | Rats | | Mice | |
|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Cerebellum | Hippocampus | Cerebellum | Hippocampus |
| 0 | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) |
| 3 | 79.4 (41.5, 95) | 95.6 (64.6, 115.5) | 69.9 (51.8, 111) | 92 (78.4, 100.4) |
| 10 | 45.8 (26.5, 116.2) | 56.8 (45.6, 98.2) | 64.1 (57.3, 92) | 78.1 (71.4, 102.9) |
| 30 | 115.9 (33.4, 147.1) | 53.6 (27, 87.4) | 50 (42.3, 50)* | 74.7 (56.3, 92.9)* |
| 50 | 65.4 (28.3, 111) | 54.1 (38.8, 74.4)* | 54.9 (35.4, 66.7)* | 72.6 (57.5, 81.8)* |

Results were represented as percentage of control group (values 0% of tannery effluent considered 100% of superoxide dismutase activity). Data was expressed as median (25th/75th percentiles) and analyzed by Kruskal–Wallis followed by Dunn’s test. * Values significantly different from 0% (control group), $p < 0.004$.

Table 6. Effect of tannery effluent on glutathione peroxidase activity in brain areas of mice and rats

| Tannery Effluent (%) | Rat | | | | Mice | | | |
|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| | Cerebellum | Cortex | Striatum | Hippocampus | Cerebellum | Cortex | Striatum | Hippocampus |
| 0 | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) |
| 3 | 101 (95.1, 103.6) | 106 (102.7, 107.6) | 182.8 (102.9, 286.5) | 106.5 (102.1, 112.1) | 106 (101.2, 115.4) | 102.1 (89.5, 111.4) | 114.4 (84, 213.3) | 96 (93.7, 106) |
| 10 | 105.9 (101.4, 108.6) | 113.7 (106.6, 133.1)* | 454.6 (194.4, 697.1)* | 109.4 (100.1, 113.7) | 110.3 (103, 129.8) | 110.1 (103.2, 118.3) | 134.1 (79.5, 241.8) | 91.3 (76.2, 97.9) |
| 30 | 101 (89.3, 108.1) | 114.7 (110.8, 126.4)* | 452.7 (245, 639.7)* | 113.9 (109, 116.9)* | 113.5 (107.9, 119.1)* | 111.7 (104.2, 119.6)* | 174.2 (89.9, 293.9) | 95.7 (83.5, 100.3) |
| 50 | 109.2 (101, 117.4)* | 123.9 (109.9, 140.5)* | 370.4 (263.4, 720.3)* | 113.5 (108.9, 120.9)* | 119.7 (104.6, 142.7)* | 111.4 (103.8, 119.8) | 163.7 (129, 261.1) | 99.9 (88.1, 114.9) |

Results were represented as percentage of control group (values 0% of tannery effluent was considered 100% of glutathione peroxidase activity). Data was expressed as median (25th/75th percentiles) and analyzed by Kruskal–Wallis followed by Dunn’s test.* Values significantly different from 0% (control group), $p < 0.05$

Table 7. Effect of tannery effluent on glutathione S-transferase activity in cerebellum and hippocampus of mice and rats.

| Tannery | | | | |
|-----------------|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| Effluent | | | | |
| (%) | Rats | | Mice | |
| | Cerebellum | Hippocampus | Cerebellum | Hippocampus |
| 0 | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) | 100 (0, 0) |
| 3 | 84.3 (82, 86.3) | 109.2 (102.9, 113.3) | 91.7 (82.3, 96.8) | 100 (89.7, 106.2) |
| 10 | 74.5 (70.9, 80.8) | 90 (75.1, 95.6) | 91.1 (77.2, 94.9) | 92.6 (82.7, 94) |
| 30 | 63.3 (59.2, 71.7)* | 72 (67, 81.1) | 82.4 (71, 87)* | 93.1 (87.8, 97.6) |
| 50 | 55 (52.7, 65.3)* | 69.2 (56.9, 75.5)* | 77.2 (74.2, 86.7)* | 80.7 (70.4, 82.6) * |

Results were represented as percentage of control group (values 0% of tannery effluent was considered 100% of glutathione S-transferase activity). Data was expressed as median (25th/75th percentiles) and analyzed by Kruskal–Wallis followed by Dunn’s test.* Values significantly different from 0% (control group), $p < 0.01$.

ANEXO 2 – Artigo 2

“Exposure to tannery effluent impacts the antioxidant enzymatic system in adults *Drosophila melanogaster*” submetido em Junho de 2014 para Toxicology Letters.

FW: Editor handles TOXLET-D-14-00506

> From: toxlet@mgreditorial.com
> To: ionarasiqueira@hotmail.com
> Date: Tue, 10 Jun 2014 01:42:53 +0100
> Subject: Editor handles TOXLET-D-14-00506
>
> Ms. Ref. No.: TOXLET-D-14-00506
> Title: Exposure to tannery effluent impacts the antioxidant enzymatic system in adults *Drosophila melanogaster*
> Toxicology Letters
>
> Dear Dr. Ionara Siqueira,
>
> Your submission entitled "Exposure to tannery effluent impacts the antioxidant enzymatic system in adults *Drosophila melanogaster*" will be handled by Editor Kenneth Barry Delclos.
>
> You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/toxlet/>.
> Your username is: ionara
> If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/toxlet/automail_query.asp.
>
> Thank you for submitting your work to this journal.
>
> Kind regards,
>
> Elsevier Editorial System
> Toxicology Letters

Exposure to tannery effluent impacts the antioxidant enzymatic system in adults *Drosophila melanogaster*

Felipe dos Santos Moysés^a, Karine Bertoldi^a, Gisele Lovatel^a, Sabrina Vaz^b, Kelly Ferreira^b, Juliana Junqueira^b, Pamela Brambilla Bagatini^b, Marco Antônio Siqueira Rodrigues^c, Léder Leal Xavier^b, Ionara Rodrigues Siqueira^{a,d,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS – Brazil.

^bLaboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^cInstituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, RS, Brazil

^dDepartamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding Author: Ionara Rodrigues Siqueira, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202, 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 3316 3121; E-mail: ionara@ufrgs.br

Abstract

The modulation of oxidative status, especially antioxidant enzymatic system, has been considered as a central mechanism of several xenobiotics toxicity, although the tannery effluent effects on antioxidant defenses of insect species have been rarely evaluated. Our aim was to

evaluate the impact of exposure to tannery wastewater on oxidative status parameters, specifically, the enzymatic antioxidant system, in insects using a classical invertebrate model, the adult *Drosophila melanogaster*. The flies were placed for 72 h on standard diet containing 0, 5, 10, 30 and 50% of tannery effluent. After exposure, the mortality was evaluated. Living flies were frozen, and subsequently homogenized. The homogenate was used to assess superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities. Exposure to tannery effluent induced concentration-dependent lethality. The exposure to tannery effluent increased glutathione peroxidase activity in *Drosophila melanogaster*, while no changes were found in superoxide dismutase activity. However, a decrease was observed in the activity of glutathione S-transferase activity in flies. Considering these results it is possible suggest that the exposure to tannery wastewater can alter the enzymatic antioxidant system and that *Drosophila melanogaster* is a reliable model to evaluate the toxicity induced by tannery wastewater.

Keywords: tannery effluent; oxidative parameters; *Drosophila melanogaster*; glutathione peroxidase; glutathione S-transferase.

1. Introduction

Several studies using mammals have suggested the oxidative stress as central biochemical mechanism of toxicity from environmental toxic agents (El-Demerdash, 2011; Franco et al.,

2009). Although single chemical-induced oxidative stress has been documented, limited information is available for exposure to a complex chemical mixture (Siddique et al., 2008).

Various contaminants can increase reactive oxygen species production and/ or modify the antioxidant capacity (Brocardo et al., 2005; Franco et al., 2009), which can damage macromolecule (Bergamini et al., 2004; Dean et al., 1997; Muthuswamy et al., 2006). Organisms have antioxidant defences to minimize oxidative damage to cellular components (Halliwell and Chirico, 1993)

The enzymatic antioxidant system contains evolutionary conserved proteins, such as superoxide dismutase (SOD) that converts $O_2^{\cdot -}$ into H_2O_2 , catalase, which is related to H_2O_2 detoxification, and glutathione peroxidase (GPx) that breaks down peroxides (Halliwell and Chirico, 1993). Furthermore, the glutathione S-transferase (GST) can contribute to the detoxification of free radicals (Board and Menon, 2013). It is interesting to note that exposure to contaminants can modulate several antioxidant enzyme activities, as well as mRNA and protein expression, for example exposure to cadmium alters GSTs and catalase in non-biting midges, *Chironomus riparius* (Nair and Choi, 2011; Nair et al., 2012; Nair et al., 2011).

There are some studies describing the neurobehavioral and biochemical alterations induced by tannery effluents in mammal species (Moysés et al., 2014b; Siqueira et al., 2011). Exposure to tannery effluent induces oxidative stress in brain structures of rats and mice (Moysés et al., 2014a). Moreover, rat liver showed an increase in glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities when exposed to effluent (Moysés et al., 2014a). However, there are few studies reporting the effects of exposure to tannery effluent on insects.

Tannery wastewater exposure alters oxidative status and possesses genotoxic activity in larvae from *Drosophila melanogaster*, a model insect belonging to the dipteran order (Siddique et al., 2005; Siddique et al., 2008). There are no studies, to our knowledge, reporting the effect of exposure of these flies to tannery wastewater on oxidative stress parameters in adult stage.

Considering the potential toxicity of tannery wastewater, the aim of this study was to evaluate the effects of tannery effluent on activities of antioxidant enzymes, namely superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase, in adults *Drosophila melanogaster*.

2. Materials and methods

2.1. Tannery effluent

The wastewater used in the study was collected from a tannery located in Rio Grande do Sul state, southern Brazil. The tannery effluent was collected after their treatment by a conventional method (physicochemical, followed by specified units of biological treatment).

2.2. *Drosophila melanogaster* strain and maintenance

Wild-type *Canton-S* strain was purchased from Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana University, USA). Male and female flies were maintained in an environmentally controlled room at 25°C on a 12 h light/dark cycle, under 60–70% humidity, in vials containing standard medium prepared with 10 g agar, 50 g of brown sugar, 10 g methylparaben (to prevent fungal growth), 100 g of rye flour, 1 L of water and dried yeast.

2.3. Experimental procedures

The experiments were performed using 19-day-old male and female flies, day one being considered the day of pupae eclosion. Flies were submitted to different treatments in vials during 72 h, according to the concentration of tannery effluent added to the cooked standard medium: 0 (without effluent), 5, 10, 30 and 50%.

2.4. Mortality

The mortality was determined according to Reveillaud et al. (1991), with modifications. The number of dead flies was counted after 72 h of exposure to tannery wastewater, and the living flies were frozen at -20°C during 20 minutes, separated by gender in a Petri dish on ice, and promptly transferred to -20°C.

2.5. Whole body homogenate preparation

For determination of enzyme activities, flies were homogenized in 10 volume (w:v) ice-cold 66 mM potassiumphosphate buffer, containing 1 mM PMSF and 0.1% Triton. Homogenate was centrifuged at 3000 g for 5 min and the supernatant was recentrifuged at 50 000 g for 30 min and the pellet was discarded (Sohal et al., 1990).

2.6. Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase activity was determined using a RANSOD kit (Randox Labs, USA). This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate $O_2^{\cdot-}$ that reacts with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5 phenyltetrazolium chloride to form a red formazan dye, which is spectrophotometrically assayed at 505 nm. The inhibition of chromogen production is proportional to the activity of superoxide dismutase present in the sample.

2.7. Glutathione peroxidase activity

Glutathione peroxidase activity was determined according to Wendel (1981). The reaction was carried out at 37 °C in a solution containing 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.7), 1.1 mM EDTA, 0.44 mM sodium azide, 0.5 mM NADPH, 2 mM glutathione and 0.4 U

glutathione reductase. The activity of glutathione peroxidase was measured taking tertbutyl hydroperoxide as the substrate at 340 nm. The contribution of spontaneous NADPH oxidation was always subtracted from the overall reaction ratio. Glutathione peroxidase activity was expressed as nmol NADPH oxidized per minute per mg protein (Sohal et al., 1990).

2.8. Glutathione S-transferase activity

Glutathione S-transferase activity was measured by the method of Habig (1974). The reaction mixture contained an aliquot, potassium phosphate buffer pH 7.4, glutathione (1 mM) and CDNB (1 mM), which was used as substrate. The reaction was carried out at 37°C and monitored spectrophotometrically at 340 nm for 5 minutes (Sharma et al., 2012).

2.9. Protein determination

The protein content of the tissue homogenates was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976; Shen et al., 2003).

2.10. Statistical analysis

The mortality results were expressed as number of dead flies. To evaluate the mortality of flies, the chi-square test was used with the Bonferroni adjustment for multiple comparisons.

GPx, GST and SOD activities were expressed as percentage of control, where the homogenate without effluent (0% of tannery effluent, male or female) was taken as 100%. Results were expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed for normality of distribution using the Kolmogorov-Smirnov test for normality. It was employed ANOVA followed by Duncan's test. Two-way ANOVA was used in order to evaluate the interaction between factors species and treatment (effluent) using the male control group mean (0% of tannery effluent). $P < 0.05$ was considered significant, except in Bonferroni adjustment ($P < 0.01$).

3. Results

Exposure to tannery effluent increased *D. melanogaster* mortality (Chi-square 4 degree of freedom [df] = 165.1, $P < 0.0001$) in 10 % (chi-square 1 df = 31.51, $P < 0.0001$), 30% (chi-square = 69.79, $P < 0.0001$) and 50% (chi-square = 133.0, $P < 0.0001$) concentrations (Table 1).

Two-way ANOVA demonstrated the effect of exposure of *D. Melanogaster* to tannery effluent on GPx activity ($F_{(4, 125)} = 2.506$, $p = 0.046$), as well as a significant interaction between factors, sex and treatment ($F_{(4, 125)} = 3.765$; $p = 0.006$). One-way ANOVA indicated that the exposure to tannery effluent increased GPx activity in male ($F_{(4,38)} = 6.229$, $p = 0.001$; Figure 1) and females ($F_{(4, 94)} = 3.400$, $p = 0.012$; Figure 1).

The GST activity was altered by exposure to tannery effluent ($F_{(4, 88)} = 5.967$; $p < 0.001$), since the exposure at 30 and 50% induced a reduction on GST activity in male *D. melanogaster*,

while females seem be resilient to its contaminant(Figure 2). The exposure did not alter superoxide dismutase activity in either male or female *D. melanogaster* (Figure 3).

4. Discussion

The present study is the first evidence reporting the effects of exposure to tannery wastewater on lethality indexes and antioxidant system of adult *Drosophila melanogaster*. It is important to note that the impact on enzyme activities has been taken as a good biomarker of toxic effects induced by chemical exposure (Shen et al., 2003).

Our findings demonstrated that the tannery effluent increased concentration-dependent the mortality of flies, this is consistent with those obtained by Taju and colleagues (2012) with a fish model. It is possible to infer that the higher mortality might be linked to biochemical findings here observed, which can suggest a decrease in detoxification and antioxidant capacities. The reduction of GST activity in *D. melanogaster* exposed to tannery wastewater may be an indicative of toxicity, since GST is a ubiquitous family of biotransformation involved in the metabolic detoxification of xenobiotics and endogenous electrophilic compounds (Hayes and McLellan, 1999; Landi, 2000). The GSTs conjugate non-polar compounds to glutathione, generating water-soluble glutathione-conjugates that are readily transported out of the cell. The insect GSTs play an important role in the defence mechanisms against many substances as plant alleochemicals and insecticides (Chien and Dauterman, 1991; Shen et al., 2003; Tang et al., 2011; Yu, 1986). Besides, the reduced antioxidant defenses can facilitate the cell damage induced by free radicals (Board and Menon, 2013; Franco et al., 2009).

Neurotoxicological studies have evaluated the impact of tannery wastewater exposure in mammal species (Moysés et al., 2014b). In accordance with results here presented, *in vitro* exposure to tannery effluent decreases glutathione S-transferase activity in brain areas, specifically cerebella and hippocampi, of two tested mammal species, rats and mice (Moysés et al., 2014a). We could suggest that the glutathione system can be a sensitive biochemical indicator to tannery effluent.

GSTs are enzymes of a multiple gene family, so that insect cytosolic GSTs have been assigned to at least six classes: Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Theta and Zeta (Ranson et al., 2001). Members of these six classes have been identified in the *Drosophila melanogaster* (Ranson et al., 2002). The Delta and Epsilon classes, both specific to insects, are the largest classes comprising over 65% of the total complement of cytosolic GSTs in the Diptera (Lumjuan et al., 2007; Ranson et al., 2002). Interestingly, sublethal concentrations of copper augmented the glutathione S-transferases expression, particularly, omega, sigma, and zeta classes in rotifer *Brachionus koreanus* (Han et al., 2013).

Our results agree with those obtained by Gül and colleagues (2004) that animals from a contaminated area have decreased GST activity. It is interesting to note that the contamination

to wastewaters by tannery effluent can occur at different levels of the food chain, from producers (i.e. algae and plants) to secondary consumers (i.e. insects, crustaceans and fishes) (Gómez et al., 2008; Sharma et al., 2007; Tigini et al., 2011). The effects observed here in flies might indicate the bioaccumulation of contaminants up the food chain (Khan, 2001; Naidu, 1996).

To our knowledge, we provide here, for the first time, evidence of tannery wastewater exposure modulation on GPx activity in adult flies. It is known that GPx has an important role in cellular antioxidant defence through catalyze the reduction of hydroperoxides to water (Margis et al., 2008), and the increased activity can be a marker of oxidative stress (Siddique et al., 2008). Siddique and colleagues (2008) demonstrated that exposure of larvae of *D. melanogaster* to tannery leachates increased antioxidants enzymes activities, and this was associated with an adaptation to increased reactive oxygen species and lipid peroxidation levels. In accordance, our results showed that the exposure to tannery wastewater also can increase GPx activity in adult *D. melanogaster*. Gromadzińska et al. (1996) demonstrated that the tannery workers exhibited significantly high erythrocyte and plasma GPx activity, as well as elevated levels of lipid peroxidation in blood plasma.

Interestingly, it was described that the exposure to tannery wastewater induces behavioral changes on the elevated plus maze in mice, indicating an anxiety-like behavior, without any effect in rats, demonstrating that mice are more susceptible than rats to tannery effluent (Moysés et al., 2014b; Siqueira et al., 2011). However, biochemical findings may be related to behavioural findings, since the incubation of rat liver homogenate with tannery wastewater induced an increase in glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities when exposed to effluent, while this pattern was not observed in mice liver (Moysés et al., 2014a). Taken together, it is possible to suggest that the higher GST and GPx could contribute to liver detoxification and therefore decrease the toxicity of tannery wastewater in rats (Moysés et al., 2014a). It is interesting to note that it has been identified different classes, namely alpha, mu, pi, sigma, kappa, theta and zeta, in mammal species. Several factors, such as the density of glutathione S-transferases classes and its distribution in the tissue from each species, might be involved with dissimilar detoxification in different species (Landi, 2000; Sheehan et al., 2001).

Our data support the idea that the alteration in antioxidant enzymatic system can be related to toxic effects of tannery wastewater exposure in insects, specifically the exposure to tannery effluent alters antioxidant enzyme activities in adult *Drosophila melanogaster*. The present study suggests that *Drosophila melanogaster* appears to be a reliable model to evaluate the toxicity of tannery wastewater.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

Funding

This work was supported by the Brazilian funding agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul — FAPERGS; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — CAPES (F. M. Santos); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — CNPq (Dr. I.R. Siqueira; F. M. Santos; V.R. Elsner; K. Bertoldi).

References

- Bergamini, C. M., Gambetti, S., Dondi, A., Cervellati, C., 2004. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr. Pharm. Design.* 10, 1611-1626.
- Board, P. G., Menon, D., 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *B. B. A. - Gen. Subjects.* 1830 3267-3288.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brocardo, P. S., Pandolfo, P., Takahashi, R. N., Rodrigues, A. L. S., Dafre, A. L., 2005. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology.* 207, 283-291.
- Chien, C., Dauterman, W., 1991. Studies on glutathione S-transferase in *Helicoverpa* (= *Heliothis*) *zea*. *Insect. Biochem.* 21, 857–864.
- Dean, R., FU, S., Stocker, R., Davies, M., 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324, 1-18.
- El-Demerdash, F. M., 2011. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1346-1352.
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E. M., Panayiotidis, M. I., 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 674, 3-22.
- Gómez, N., Sierra, M., Cortelezzi, A., Capítulo, A., 2008. Effects of discharges from the textile industry on the biotic integrity of benthic assemblages. *Ecotox. Environ. Safe.* 69, 472.

- Gromadzińska, J., Wasowicz, W., Sklodowska, M., Bulikowski, W., Rydzyński, K., 1996. The influence of atmospheric chromium on selenium content and glutathione peroxidase activity in blood of tannery workers. *Environ. Health Persp.* 104, 1312.
- Gül, S., Belge-Kurutaş, E., Yildiz, E., Sahan, A., Doran, F., 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environ. Int.* 30, 605.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-9.
- Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715S-724S.
- Han, J., Won, E.-J., Hwang, D.-S., Rhee, J.-S., Lee, J.-S., 2013. Effect of copper exposure on GST activity and on the expression of four GSTs under oxidative stress condition in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*. *Comp. Biochem. Phys. C*. In Press.
- Hayes, J., McLellan, L., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Res.* 31, 273-300.
- Khan, A., 2001. Relationships between chromium biomagnification ratio, accumulation factor, and mycorrhizae in plants growing on tannery effluent-polluted soil. *Environ. Int.* 26, 417.
- Landi, S., 2000. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 463, 247-283.
- Lumjuan, N., Stevenson, B. J., Prapanthadara, L.-a., Somboon, P., Loftus, P. M. B. B. J., Severson, D. W., Ranson, H., 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem. Molec.*
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., Margis-Pinheiro, M., 2008. Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *Febs J.* 275, 3959-3970.
- Moysés, F. d. S., Bertoldi, K., Elsner, V. R., Rodrigues, M. A. S., Siqueira, I. R., 2014a. Glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activities in liver and brain are rodent species-dependent following exposure to tannery effluent. Submitted.
- Moysés, F. d. S., Bertoldi, K., Spindler, C., Sanches, E. F., Elsner, V. R., Rodrigues, M. A. S., Siqueira, I. R., 2014b. Exposition to tannery wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats. *Physiol. Behav.* 129, 160-166.
- Muthuswamy, A. D., Vedagiri, K., Ganesan, M., Chinnakannu, P., 2006. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: role of l-carnitine and DL- α -lipoic acid. *Clin. Chim. Acta.* 368, 84-92.
- Naidu, R., 1996. Contaminants and the soil environment in the Australasia-Pacific region: proceedings of the First Australasia-Pacific Conference on Contaminants and Soil Environment in the Australasia-Pacific Region, held in Adelaide, Australia, 18-23 February 1996.

Nair, P., Choi, J., 2011. Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. *Aquat. Toxicol.* (Amsterdam, Netherlands) 101, 550.

Nair, P., Park, S., Choi, J., 2012. Characterization and expression analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase cDNA from *Chironomus riparius* on exposure to cadmium. *Comp. Biochem. Phys B.* 163, 37.

Nair, P. M. G., Park, S. Y., Choi, J., 2011. Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. *Comp. Biochem. Phys C* 154, 399-408.

Ranson, H., Claudianos, C., Orтели, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V., Unger, M. F., Collins, F. H., Feyereisen, R., 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science.* 298, 179-181.

Ranson, H., Rossiter, L., Orтели, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C., Collins, F., Hemingway, J., 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* 359, 295.

Reveillaud, I., Niedzwiecki, A., Bensch, K., Fleming, J., 1991. Expression of bovine superoxide dismutase in *Drosophila melanogaster* augments resistance of oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 11, 632.

Sharma, A., Mishra, M., Shukla, A., Kumar, R., Abdin, M., Chowdhuri, D., 2012. Organochlorine pesticide, endosulfan induced cellular and organismal response in *Drosophila melanogaster*. *J. Hazard. Mater.* 221, 275.

Sharma, K., Sharma, S., Singh, P., Kumar, S., Grover, R., Sharma, P., 2007. A comparative study on characterization of textile wastewaters (untreated and treated) toxicity by chemical and biological tests. *Chemosphere.* 69, 48.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., Dowd, C. A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1.

Shen, S., Chien, Y., Chien, C., 2003. Induction of glutathione S-transferases activities in *Drosophila melanogaster* exposed to phenol. *Arch. Insect. Biochem.* 53, 80.

Siddique, H. R., Gupta, S. C., Dhawan, A., Murthy, R., Saxena, D., Chowdhuri, D. K., 2005. Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 46, 189-197.

Siddique, H. R., Gupta, S. C., Mitra, K., Bajpai, V. K., Mathur, N., Murthy, R. C., Saxena, D. K., Chowdhuri, D. K., 2008. Adverse effect of tannery waste leachates in transgenic *Drosophila melanogaster*: role of ROS in modulation of Hsp70, oxidative stress and apoptosis. *J. Appl. Toxicol.* 28, 734-748.

Siqueira, I. R., Vanzella, C., Bianchetti, P., Rodrigues, M. A., Stülp, S., 2011. Anxiety-like behaviour in mice exposed to tannery wastewater: The effect of photoelectrooxidation treatment. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 481.

Sohal, R., Arnold, L., Orr, W., 1990. Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 56, 223.

Taju, G., Majeed, S., Nambi, K., Sarath, B. V., Vimal, S., Kamatchiammal, S., Hameed, A., 2012. Comparison of in vitro and in vivo acute toxicity assays in *Ectophasia suratensis* (Bloch, 1790) and its three cell lines in relation to tannery effluent. *Chemosphere.* 87, 55.

Tang, F., Zhang, X.-b., Liu, Y.-s., Gao, X.-w., 2011. Alteration of glutathione S-transferase properties during the development of *Micromelalopha troglodyta* larvae (Lepidoptera: Notodontidae). *J. Forest. Res.* 22, 447-451.

Tigini, V., Giansanti, P., Mangiavillano, A., Pannocchia, A., Varese, G., 2011. Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. *Ecotox. Environ. Safe.* 74, 866.

Wendel, A., Feuerstein, S., 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice—I Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem. Pharmacol.* 30, 2513-2520.

Yu, S., Consequences of induction of foreign compound-metabolizing enzymes in insects. Yu, S., (1986). Consequences of induction of foreign compound-metabolizing enzymes in insects. *Molecular aspects of insect-plant associations.* 153-174.

List of legends

Figure 1. Effect of tannery effluent on glutathione peroxidase activity in male (n=7-9 per group) and female (n = 11-16 per group) adult *D. melanogaster*. Results were represented as percentage of control (male or female) that was considered as 100% of activity. Data was expressed as mean \pm SEM.* Values significantly different from control group of the respective sex as determined by One-Way ANOVA followed by Duncan's test (p< 0.05).

Figure 2. Effect of tannery effluent on glutathione S-transferase activity in male (n = 7-9 per group) and female (n = 8-10 per group) adult *D. melanogaster*. Results were represented as percentage of control (male or female) that was considered as 100% of activity. Data was expressed as mean \pm SEM.* Values significantly different from control group of the respective sex; † Values significantly different from 5% group of the respective sex, as determined by One-Way ANOVA followed by Duncan's test ($p < 0.05$).

Figure 3. Effect of tannery effluent on superoxide dismutase activity in male (n=7-8 per group) and female (n=10-14 per group) *D. melanogaster*. Results were represented as percentage of control (male or female) that was considered as 100% of activity. Data was expressed as mean \pm SEM. One-Way ANOVA.

Table 1. Mortality of adult *D. melanogaster* exposed to different concentrations of tannery effluent for 72 h

| Concentrations of tannery effluent (%) | No. of files exposed | No. of dead file | Cumulative mortality (%)† | p |
|--|----------------------|------------------|---------------------------|---------|
| 0 | 1041 | 234 | 24.1 \pm 9.4 | |
| 5 | 596 | 92 | 16 \pm 8.7 | 0.571 |
| 10 | 1015 | 342 | 34.8 \pm 5.1 | < 0.001 |

| | | | | |
|----|------|-----|-------------|---------|
| 30 | 816 | 330 | 44.1 ± 15.5 | < 0.001 |
| 50 | 1014 | 473 | 56.3 ± 23.1 | < 0.001 |

†Data are the average of five replicates; The chi-square test was used for statistical comparison using Bonferroni correction for multiple comparisons ($p < 0.01$).

Figure 1

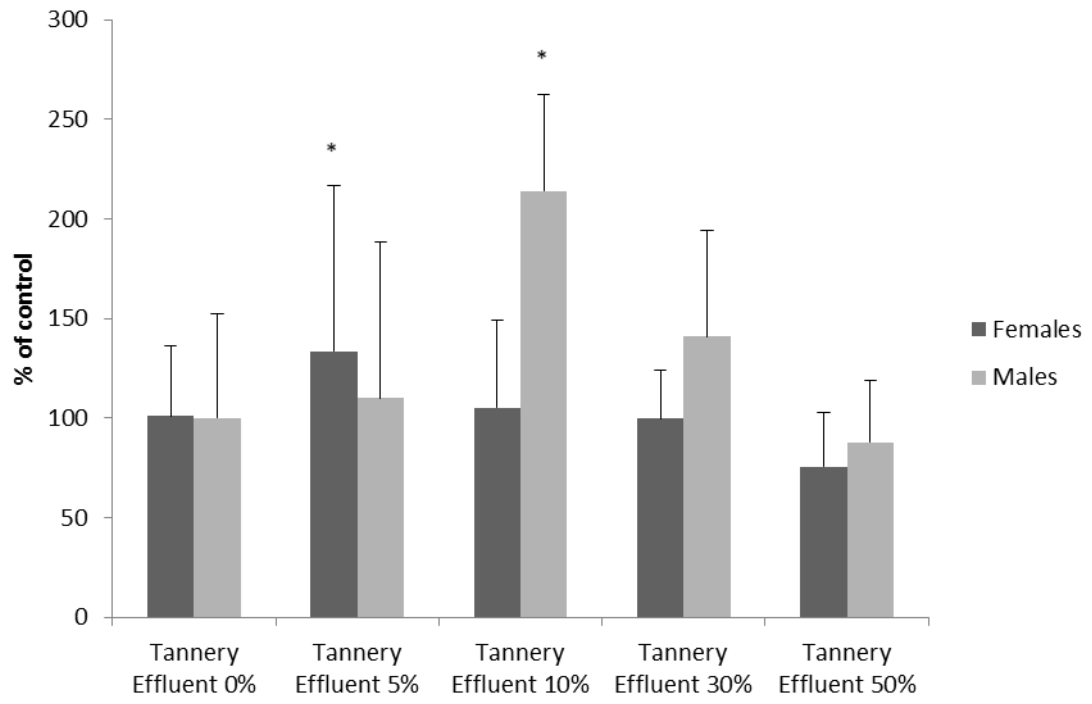


Figure 2

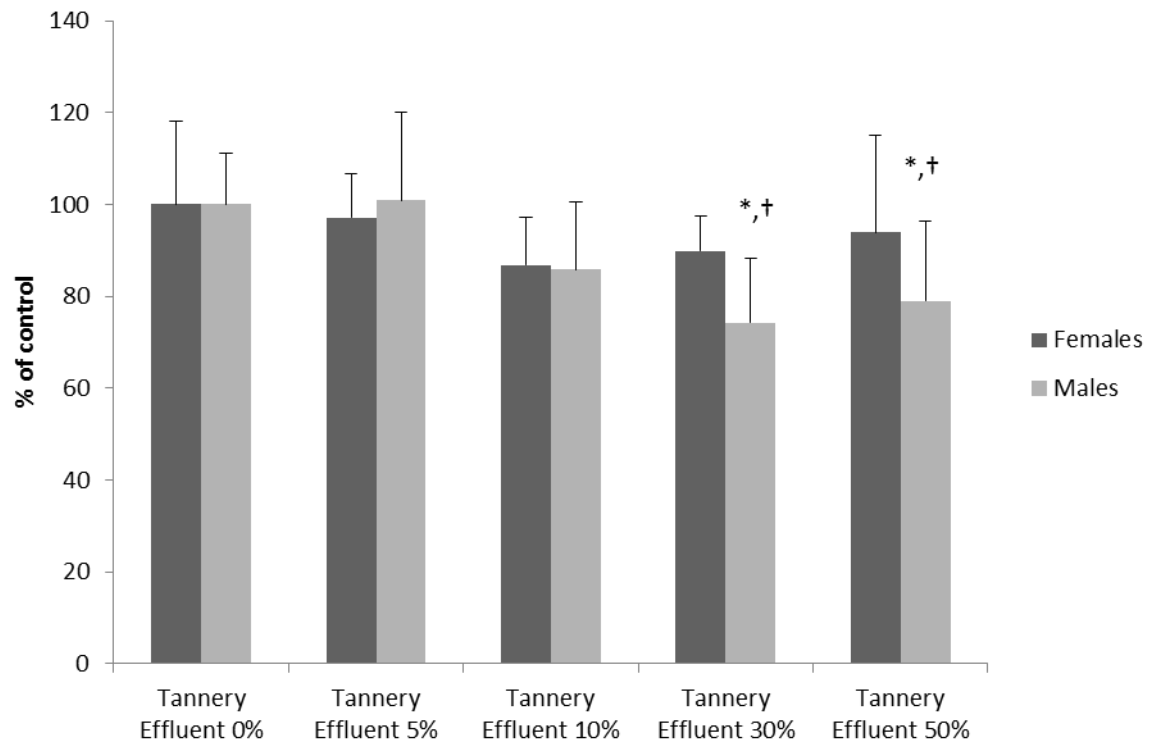


Figure 3

