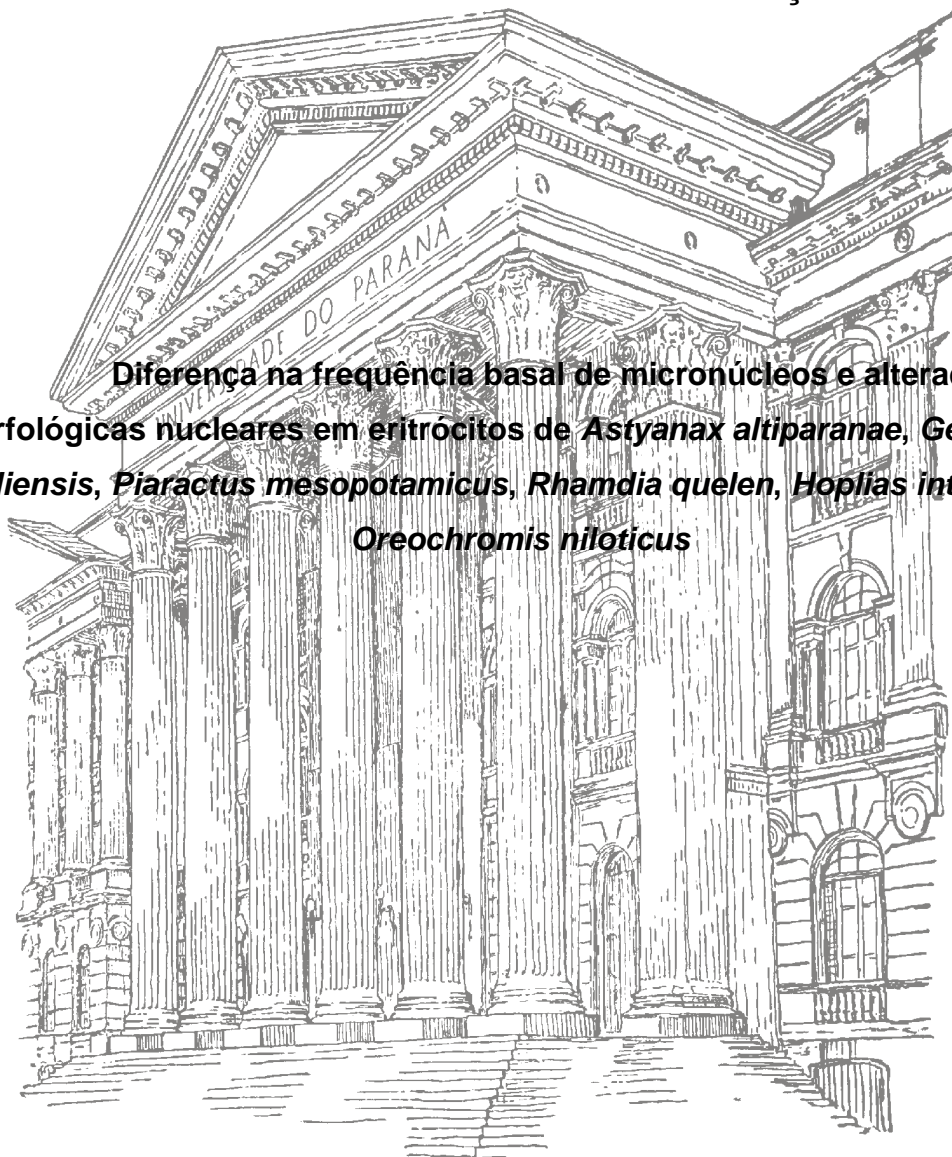


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELHANDRA DE LURDES SCHICORA GONÇALVES

Diferença na frequência basal de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Astyanax altiparanae*, *Geophagus brasiliensis*, *Piaractus mesopotamicus*, *Rhamdia quelen*, *Hoplias intermedius* e *Oreochromis niloticus*



CURITIBA

2015

HELYANDRA DE LURDES SCHICORA GONÇALVES

**Diferença na frequência basal de micronúcleos e alterações
morfológicas nucleares em eritrócitos de *Astyanax altiparanae*, *Geophagus
brasiliensis*, *Piaractus mesopotamicus*, *Rhamdia quelen*, *Hoplias intermedius* e
*Oreochromis niloticus***

Monografia apresentada como requisito à
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas no Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete
Cestari.

Coorientadora: Ma. Tatiane Klingelfus

CURITIBA

2015

RESUMO

Com a crescente preocupação em preservar e manter a qualidade do ambiente aquático, devido aos impactos causados pela atividade humana, estudos são realizados com o intuito de avaliar os efeitos nos organismos quanto a toxicidade de substâncias químicas. O presente estudo teve como objetivo demonstrar danos basais através do teste do micronúcleo písceo em seis espécies de peixes: *Astyanax altiparanae*, *Geophagus brasiliensis*, *Piaractus mesopotamicus*, *Rhamdia quelen*, *Hoplias intermedius* e *Oreochromis niloticus*. As alterações mais frequentes foram do tipo *blebbed*, *lobed*, *notched* e *vacuolated*. Todas as espécies demonstraram apresentar maior frequência de *notched*, e *R. quelen* apresentou também maior frequência de *vacuolated*. Em uma comparação entre espécies, somente a alteração tipo *vacuolated* demonstrou apresentar diferença entre espécies, sendo que *R. quelen* apresentou maior frequência quando comparada às outras espécies, e *H. intermedius* apresentou maior frequência em relação *A. altiparanae*, porém sem diferença com a frequência encontrada em *R. quelen*. Este trabalho tem importância devido a caracterização de danos basais encontrados nas principais espécies de peixes utilizadas na avaliação de xenobióticos.

Palavras-chave: eritrócitos, teste do micronúcleo písceo, peixes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. MUTAGÊNESE AMBIENTAL.....	6
2.2. UTILIZAÇÃO DE PEIXES COMO ORGANISMO TESTE	7
2.2.1. <i>Astyanax altiparanae</i>	7
2.2.2. <i>Geophagus brasiliensis</i>	8
2.2.3. <i>Piaractus mesopotamicus</i>	9
2.2.4. <i>Rhamdia quelen</i>	10
2.2.5. <i>Hoplias intermedius</i>	11
2.2.6. <i>Oreochromis niloticus</i>	12
2.3. TESTE DO MICRONÚCLEO	13
2.3.1. HISTÓRICO	13
2.3.2. FORMAÇÃO DO MICRONÚCLEO.....	15
2.3.3. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICA NUCLEARES	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. OBJETIVO GERAL	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL.....	18
4.1.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÕES.....	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

A preocupação em se preservar e manter a qualidade do ambiente aquático está em contínuo crescimento devido aos impactos causados pela atividade humana. Estudos voltados a mutagênese ambiental estão sendo realizados com o intuito de avaliar possíveis danos causados aos organismos, sobre a toxicidade de substâncias existente, tempo que permanecem no ambiente e seu destino, uma vez que estes são o reservatório final de vários produtos.

A utilização de biomarcadores genéticos é necessária ao se analisar alterações no funcionamento e na integridade do DNA das células. Biomarcadores são considerados ferramentas importantes em programas de monitoramento ambiental por apresentarem grande susceptibilidade, alta sensibilidade e relativa especificidade. Neste caso, o teste de micronúcleo pisco é o mais indicado, sendo considerado um teste rápido e de sensível detecção de alterações cromossômicas estruturais e numéricas.

Os peixes são utilizados como organismo teste em estudos por serem excelentes no biomonitoramento do ambiente aquático, uma vez que estes são considerados organismos de fácil adaptação em ensaios laboratoriais, abundantes no ambiente, além de atuarem em diversos níveis da cadeia trófica.

Com isso, surge a necessidade do conhecimento sobre níveis basais de danos espontâneos, que possibilitam avaliar de forma mais eficiente as células, tecidos e órgãos, e realizar comparações com outros estudos sobre a citotoxicidade e mutagenicidade de substâncias, relacionando as diferentes espécies de peixes de acordo com suas características.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MUTAGÊNESE AMBIENTAL

Os organismos vivos estão frequentemente expostos a agentes químicos ou físicos que podem induzir modificações na molécula de DNA. Mutações podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA, na divisão celular, podendo ser induzidas por agentes químicos, provenientes do meio ambiente ou resultantes de reações químicas que ocorrem nas próprias células, ou ainda por radiações. Esses agentes químicos são normalmente conhecidos como mutagênicos ou carcinogênicos, que vão alterar a sequência das bases no DNA, o que pode acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Estudos voltados a mutagênese ambiental despertaram os governantes para o perigo em potencial dos agentes mutagênicos e carcinogênicos para o ecossistema (RIBEIRO *et al.*, 2003). Desde a década de 70, a comunidade científica e agências regulatórias têm se conscientizado sobre os impactos ambientais sobre a saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas (BICKHAM *et al.*, 2000). No Brasil, os testes de ecogenotoxicidade têm sido empregados desde a década de 80, para avaliações ambientais (VALENT, 1998). Verificando-se que os testes de toxicidade com organismos aquáticos constituem uma ferramenta efetiva para avaliação de efeitos de poluentes sobre os organismos vivos, para avaliação de risco de agentes químicos, no monitoramento da qualidade da água e no estabelecimento de limites permissíveis de lançamento de efluentes líquidos nos corpos hídricos (ZAGATTO, 1998).

Segundo Pandrangi *et al.* (1995), estudos sobre a citotoxicidade e mutagenicidade de substâncias são de grande importância, pois permitem avaliar o impacto e o efeito destes sobre células, tecidos e órgãos, e ainda inferir sobre possíveis perturbações metabólicas e determinar respostas de um dado organismo à contaminação.

2.2. UTILIZAÇÃO DE PEIXES COMO ORGANISMO TESTE

Os peixes são um dos organismos mais susceptíveis para escolha de organismos na realização de testes laboratoriais, considerados espécies sentinelas por indicarem efeitos do estresse causados por contaminantes em altos níveis de organização (AL-SABTI e METCALFE, 1995; ADAMS, 2002; AKAISHI, 2003).

Os peixes atuam em diversos níveis da cadeia trófica, sofrem bioacumulação, respondem à presença de mutágenos em baixas concentrações, respondem de uma maneira semelhante aos vertebrados superiores, apresentam capacidade de sobreviver em ambientes saudáveis e relativa resistência aos contaminantes a que estão expostos. Além disso, são abundantes no ambiente, apresentam facilidade em adaptar-se aos ensaios laboratoriais e determinarem a distribuição e os efeitos tóxicos de contaminantes químicos no ambiente (AL-SABTI e METCALFE, 1995; PANDRANGI *et al.*, 1995; AKAISHI, 2003).

2.2.1. *Astyanax altiparanae*

A espécie *Astyanax altiparanae* (Figura 1) pertence à família Characidae, a maior e a mais complexa da ordem Characiformes (BRITSKI *et al.*, 2007), popularmente conhecida como lambari-tambiu, lambari-de-rabo amarelo ou lambari-relógio, está restrita ao sudeste do Brasil e é encontrada principalmente na bacia do Rio Paraná, e também nas bacias do Rio Iguaçu, Rio Paranapanema e Rio Tibagi. O gênero *Astyanax* proposto por Bair e Girard (1854) apud EIGENMANN (1917) apresenta distribuição geográfica ampla na região Neotropical, sendo abundante nas bacias hidrográficas brasileiras e inclui peixes de pequeno porte, até 200 mm (GARUTTI e BRITSKI, 2000).

A. altiparanae apresenta o corpo prateado com a região ventral esbranquiçada e a região dorsal cinzenta, nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na nadadeira caudal há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando os lobos superior e inferior. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (GARUTTI e BRITSKI, 2000).

Esta espécie apresenta dieta onívora, com flexibilidade em seus hábitos alimentares conforme a disponibilidade de recursos (GOMIERO e BRAGA, 2003). Além disso, coloniza diversos habitats de água doce, tanto lóticos quanto lênticos, incluindo ambientes parcialmente degradados. Apresenta capacidade de ajuste a diversas situações ambientais e grande capacidade adaptativa exploratória, utilizando estratégias diferenciadas na estrutura populacional (ORSI *et al.*, 2002 e 2004). Representa um importante elo da cadeia alimentar, constituindo uma parte significativa da dieta de diversos peixes (LEUZZI *et al.*, 2004; BERNNEMANN e SHIBATTA, 2002), sendo consumida também por seres humanos (MEURER *et al.*, 2005).



Figura 1: Exemplar de *A. altiparanae*. Fonte: Google, 2015.

2.2.2. *Geophagus brasiliensis*

A espécie *G. brasiliensis* (Figura 2), também chamado de cará, acará ou papa-terra, pertence à família Cichlidae, com distribuição na bacia Amazônica até o rio Paraná (MORAES *et al.*, 2004). É considerado habitante natural de ambientes lênticos, como lagos, lagoas, reservatórios (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2005), lagoas de planície de inundação (MESCHIATTI, 1995) e ambientes lóticos como riachos (AGOSTINHO, 1999) e rios (UIEDA, 1995). São peixes territorialistas, resistentes e versáteis (FATTORI *et al.*, 1997 apud ABILHOA e SILVA, 2003). Possuem dieta onívora, com hábitos diversificados, alimentando-se de vegetais, material depositado no fundo, peixes, gastrópodes, larvas de insetos, micro crustáceos (cladocera), escamas de peixes e alevinos (STEFANI, REIS e ROCHA, 2008; SABINO e CASTRO, 1990).

(CATELLA *et al.*, 1996) e 60 a 82 cm de comprimento (VAZZOLER *et al.*, 1997, BRITSKI *et al.*, 2007).

Essa espécie é considerado de grande valor comercial e de grande potencial para a piscicultura nacional (CASTAGNOLLI e ZUIM, 1985; CALCAGNOTO, 1998; JOMORI *et al.*, 2003; RESENDE, 2003; CATELLA, 2001 *apud* PEIXER e PETRERE, 2007) e até internacional (PULLELA, 1997). Apresenta sucesso na criação em sistemas de cultivo intensivo, aquiculturais, devido a suas características de precocidade, rusticidade, carne saborosa e de alto valor comercial, além do ótimo crescimento e adaptação à alimentação artificial (CASTAGNOLI e CYRINO, 1986). Por sua importância para a aquicultura brasileira (LIMA *et al.*, 1999), esta espécie tem recebido atenção especial dos pesquisadores pelo interesse em melhorar as técnicas empregadas em seu cultivo intensivo (FOLLY *et al.*, 2001).



Figura 3: Exemplar de *Piaractus mesopotamicus*. Fonte: Google, 2015.

2.2.4. *Rhamdia quelen*

A espécie *Rhamdia quelen* (Figura 4), popularmente conhecida como Jundiá, pertence à família Heptapteridae (NELSON, 2006), com distribuição Neotropical é encontrada do sul do México ao centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). Habita lagos e poços, fundos de rios, com preferência aos ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite a procura de alimento (GUEDES, 1980).

Apresenta hábito alimentar onívoro (GOMES *et al.*, 2000), crescimento rápido no verão e resistência ao inverno (BARCELLOS *et al.*, 2003). É considerada uma espécie promissora para o cultivo, com fácil adaptação ao manejo, boa produtividade em açudes e alto potencial de comercialização (GOMES *et al.*, 2000).

Com coloração que varia de marrom avermelhado a cinza ardósia, a espécie *Rhamdia quelen* pode ser diferenciada das outras espécies de *Rhamdia* por apresentar espinho na nadadeira peitoral serrilhado em ambos os lados, nadadeira caudal com lóbulos desiguais, presença ou não de poros sensoriais múltiplos na cabeça; véu da narina posterior aberta postero-lateralmente, barbilhões maxilares com no mínimo 28,8% do comprimento padrão, 5 a 16 arcos branquiais, olhos de tamanho médio com ou sem padrão de manchas, podendo apresentar ainda uma marca tipo selim escuro na nuca (GOMES *et al.*, 2000).



Figura 4: Exemplar de *Rhamdia quelen*. Fonte: Tatiane Klingelfus, 2013.

2.2.5. *Hoplias intermedius*

A espécie *H. intermedius* (Figura 5), popularmente conhecida como trairão amazônico, pertence à família Erythrinidae. Espécie endêmica da América do Sul, são peixes predadores de hábito carnívoro e territorialistas. Podem atingir 100 cm de comprimento e 15 à 20 kg de peso corporal (BRITSKI, 1972), possuem preferência a ambientes lóticos, como rios e cachoeiras (OYAKAWA e MATTOX, 2009).

O trairão é um peixe de escamas que possui corpo cilíndrico, coloração no dorso quase negra, nos flancos acinzentados e no ventre esbranquiçada. Essa espécie vem despertando o interesse de pesquisadores e de produtores em várias regiões do Brasil nos últimos anos, pela sua qualidade da carne e por suas características para a pesca esportiva (OYAKAWA e MATTOX, 2009).



Figura 5: Exemplar de *Hoplias intermedius*. Fonte: Tatiane Klingelfuss, 2013.

2.2.6. *Oreochromis niloticus*

A espécie *Oreochromis niloticus* (Figura 6), popularmente conhecida por tilápia do Nilo, pertence à família Cichlidae. Espécie de peixe dulceaquícola e originária da África, introduzida na região nordeste do Brasil em 1971 e disseminada pelo resto do país. A tilápia é amplamente distribuída em ecossistemas tropicais e um dos peixes mais importantes na atividade piscicultura no Brasil, possuindo grande capacidade de inserção e adaptação a diversos tipos de habitat (RODRIGUEZ e GOLD, 2004).

Apresenta hábito alimentar onívoro, coloração cinza azulada, corpo curto e alto, cabeça e cauda pequenas (GALLI e TORLONI, 1984) e presença de listras verticais por todo comprimento da nadadeira caudal (COSTA-PIERCE, 2003). Suas características incluem a rusticidade, extrema resistência a condições adversas do meio e enfermidades, crescimento rápido e adaptação ao confinamento, aceitação de rações com grande facilidade, desde o período de pós-larva até a fase de terminação. Além disso, é a melhor espécie que resiste a altas temperaturas, a baixa concentração de oxigênio dissolvido e a alta concentração de amônia na água (BOSCOLO *et al.*,

2001; EL-SAYED, 1999). Outra característica que torna vantajosa a criação de tilápias é a capacidade do organismo em obter um ótimo desenvolvimento em grandes concentrações populacionais, característica que diminui o custo de manutenção per capita (PONCEMARBÁN *et al.*, 2006). Segundo Girón-Pérez *et al.* (2007), a tilápia do Nilo é um ótimo modelo para avaliação do ecossistema aquático e para realização de estudos toxicológicos.



Figura 6: Exemplar de *Oreochromis niloticus*. Fonte: Google, 2015.

2.3. TESTE DO MICRONÚCLEO

2.3.1. HISTÓRICO

O primeiro relato na tentativa em usar micronúcleos na avaliação de danos citogenéticos foi descrito por Evans *et al.*, em 1959, em roedores, que utilizaram a frequência de micronúcleos para medir o dano induzido por radiação. Estes autores verificaram que a origem de fragmentos cromossomos acêntricos na mitose ocorre a partir das cromátides, cromossomos, quebras de cromátides e trocas simétricas e assimétricas incompletas, que são frequentemente excluídos dos núcleos das células filhas e aparecem como micronúcleos na intérfase seguinte. Posteriormente, Schroeder (1970) recomendou a utilização de esfregaços de medula óssea em roedores para detectar *in vivo* os danos causados por agentes mutagenicos químicos, com a ocorrência de micronúcleos.

Schmid, em 1975, conduziu seu estudo para o desenvolvimento de testes simples *in vivo* com base na identificação de micronúcleos em eritrócitos jovens (policromáticos) de medula óssea de roedores. A técnica foi uma alternativa ao método de obtenção de metáfases, utilizada principalmente para observar aberrações cromossômicas causados por agentes químicos.

Assim, teste do micronúcleo foi inicialmente desenvolvido para aplicação em pequenos mamíferos, principalmente roedores, e posteriormente foi modificado por Hoofman e de Raat, em 1982, para a aplicação em eritrócitos de peixes na avaliação de compostos mutagênicos no ambiente aquático como método alternativo para o teste de aberrações cromossômicas. Segundo Al-Sabti (1986), os peixes respondem aos xenobióticos de forma homóloga aos mamíferos, e Hose *et al.* (1987) confirmaram a utilização do teste do micronúcleo písceo como uma ferramenta de monitorização rápida para detectar a presença de agentes mutagênicos no ambiente.

Para melhor utilização do teste de micronúcleo písceo, Carrasco *et al.* (1990), descreveram e fotografaram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes, além dos micronúcleo, e classificaram como: *bebbled*; *lobed*; *notched* e *vacuolated*. Williams e Metcalfe (1992) verificaram que a formação de micronúcleos ocorre espontaneamente em células de peixes, mas a frequência de micronúcleos espontânea parece ser menor em peixes em relação a roedores, corroborando para a utilização de outras alterações morfológicas no teste, tornando a análise mais robusta. Fenech (2000), adicionou a técnica descrevendo *binúcleo* como mais uma alteração morfológica que detecta a presença de xenobióticos no ambiente.

O teste de micronúcleo é considerado por Heddle *et al.* 1983 como um teste simples, rápido e de sensível detecção de alterações cromossômicas estruturais e/ou numérica. E sua aplicação em medula óssea e sangue periférico é um dos mais estabelecidos ensaios citogenéticos *in vivo* no campo da genética toxicológica (FENECH, 2000).

2.3.2. FORMAÇÃO DO MICRONÚCLEO

O teste de micronúcleo baseia-se no princípio que, durante o processo de divisão celular, mais especificamente na anáfase, o micronúcleo é formado em células parentais a partir de cromossomos acêntricos ou fragmentos de cromossomos atrasados que se movem em direção aos polos do fuso mitótico e não são incorporados ao núcleo principal das células filhas após a mitose. Como regra, são muito menores que o núcleo principal e portanto chamados de micronúcleos (SCHMID, 1975). Desta forma, diz-se que a presença do micronúcleo na célula é diretamente relacionada às aberrações que ocorrem durante a mitose (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005).

Em roedores, micronúcleos podem ser encontrados em mioblastos, mielocitos e eritroblastos. No entanto, a grande maioria dos micronúcleos apresentam-se em eritrócitos jovens e considerados micronúcleos os corpúsculos formados e visivelmente separados do núcleo principal da célula, possuindo bordas distinguíveis e a mesma refringência do núcleo principal. Com tamanho, no caso de mamíferos, de 1/20 a 1/5 de diâmetro do núcleo de um eritrócito e, no caso específico de peixes, de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo e que não ultrapasse 1/3 do tamanho do núcleo principal (SCHMID, 1975; AL-SABIT, METCALFE, 1995; AYLLON, GARCIA-VAZQUEZ, 2000; GUSTAVINO *et al.* 2001).

2.3.3. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICA NUCLEARES

Estudos descrevem a presença de outras alterações morfológicas nucleares (AMNs), além do micronúcleo, em células de peixes (AYLLON e GARCIA-VAZQUES, 2000; ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005), recebendo uma atenção considerável nos últimos anos quanto a expressão simultânea de anormalidades nucleares juntamente com micronúcleos.

Segundo Carrasco (1990), essas alterações nucleares foram caracterizadas em quatro categorias, descritas como:

a) *Blebbet*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, ainda ligada ao núcleo, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina. O tamanho

destas evaginações se situa na faixa de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas.

b) *Lobbed*: núcleos com evaginações mais largas e não tão definidas como as descritas para *blebbed*.

c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se ausentes de qualquer material visível no seu interior.

d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma, geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes não possuem nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

e) *Binúcleo*: núcleos em número de dois, bem definidos e chamados de *Binúcleo* (FENECH, 2000).

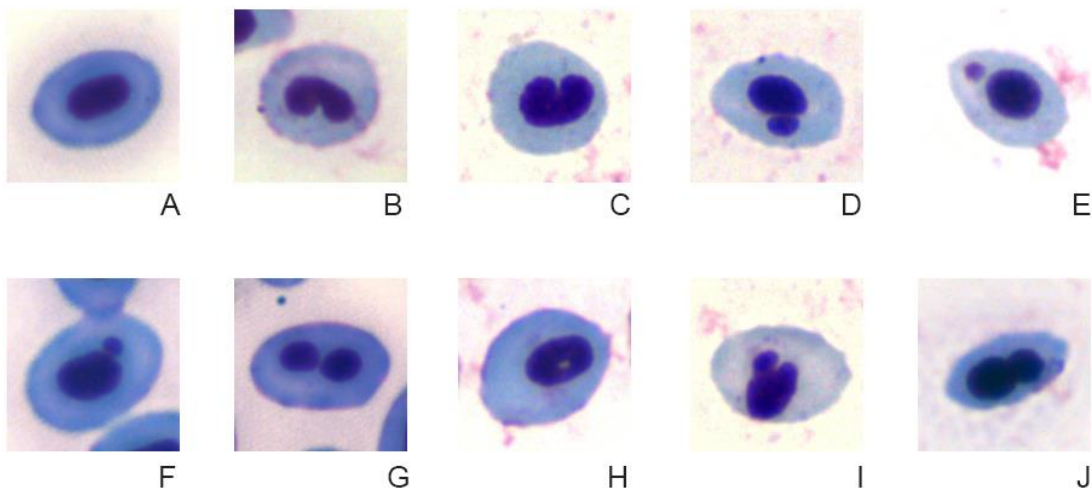


Figura 7: Célula normal (a); e suas alterações morfológicas nucleares: *notched* (b e c), *micronúcleo* (e e f), *binúcleo* (g), *vacuolated* (h) e *bebbled* (i e j). A autora, 2014.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar níveis basais de micronúcleo e de alterações morfológicas nucleares em diferentes espécies de peixes (*Astyanax altiparanae*, *Geophagus brasiliensis*, *Piaractus mesopotamicus*, *Rhamdia quelen*, *Hoplias intermedius* e *Oreochromis niloticus*).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Contabilizar o número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares na espécie *Astyanax altiparanae*, *Geophagus brasiliensis*, *Piaractus mesopotamicus*, *Rhamdia quelen*, *Hoplias intermedius* e *Oreochromis niloticus*.
- Comparar os resultados entre as espécies quanto ao número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares.
- Verificar quais alterações morfológicas nucleares são significativas dentro de cada espécie.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, foram analisados 2000 eritrócitos de seis espécies de peixes: *Astyanax altiparanae*, *Geophagus brasiliensis*, *Piaractus mesopotamicus*, *Rhamdia quelen*, *Hoplias intermedius* e *Oreochromis niloticus*. As amostras variaram de n=12 para *Oreochromis niloticus*, n=26 para *Rhamdia quelen* e n=15 para as demais espécies. Todo material deste estudo pertenceram a grupos submetidos a condições ideais de sobrevivência de estudos realizados no Laboratório de Citogenética Animal Mutagênese Ambiental do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

Os bioensaios a que pertenceram as seis espécies ocorreram em diferentes momentos, mas todos sob as mesmas condições, a saber:

- a) Aclimação de 40 dias em tanques de 1000 litros;
- b) Temperatura em torno de 28°C e pH 8,0;
- c) Aeração constante e regime de iluminação com 12 horas claro e 12 horas escuro.

Passado o período de aclimação, os peixes foram transferidos para aquários de 100 litros ou individualizados em aquários de 20 litros, onde permaneceram durante 96 horas sob condições controladas (as mesmas descritas acima).

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL

Antes de serem sacrificados os peixes foram anestesiados com 150mg/L de benzocaína (GONTIJO *et al.*, 2003). O sangue periférico foi retirado com o auxílio de uma agulha e seringa heparinizadas, através da artéria caudal para peixes com tamanhos acima de 10 cm e por punção cardíaca com hematócrito heparinizado, para peixes abaixo deste tamanho.

Para análise da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos, foi empregada a técnica descrita por (HEDDLE, 1973) e (SCHMID, 1975), com alguns ajustes (FERRARO *et al.*, 2004).

Procedimentos:

- a) As lâminas foram limpas e identificadas;
- b) Imediatamente após cada coleta de sangue, 10 µl foi colocado na superfície da lâmina;
- c) Foi preparada uma lâmina por animal;
- d) Com o auxílio de lamínula, foi realizada a extensão (esfregaço) do sangue, (técnica de extensões sanguíneas);
- e) As lâminas foram secas ao ar, overnight, e fixadas em cubetas, em etanol 96% por 30 minutos.
- f) Após a fixação, as lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 15 minutos. Após este tempo, as lâminas foram lavadas com água destilada e secas ao ar.

Para a análise das lâminas foi utilizado microscópio óptico, sendo consideradas somente hemácias nucleadas com membranas citoplasmática e nuclear intactas. A análise foi realizada por apenas um observador, em teste cego.

4.1.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação das espécies analisadas através do biomarcador genético teste de micronúcleo písceo (MNP), a análise estatística utilizada, primeiramente, foi o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, a fim de verificar a existência de uma distribuição normal entre os valores apresentados. Com resultados negativos para normalidade, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, para dados não-paramétricos, seguido pelo pós teste de Student-Newman-Keuls, com o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

Para as seis espécies de peixes foram encontradas as alterações do tipo *blebbed*, *lobed*, *notched* e *vacuolated*. Apenas para *A. altiparanae* não foi encontrado a alteração do tipo *lobed*.

Comparando em cada espécie a frequência das AMNs, na espécie *A. altiparanae* a alteração tipo *notched* apresentou maior frequência comparada com as alterações tipo *lobed* ($p < 0,0001$) e *vacuolated* ($p = 0,0079$) (Figura 7A). O mesmo ocorreu para espécie *P. mesopotamicus* e *O. niloticus* que apresentaram maior frequência para alteração *notched* em relação as alterações *lobed* ($p = 0,0015$ e $p = 0,0019$, respectivamente) e *vacuolated* ($p = 0,0267$ e $p = 0,0137$, respectivamente) (Figura 7C e 7F). *Geophagus brasiliensis* e *Hoplias intermedius* também apresentaram maior frequência para alteração *notched*, mas houve diferença somente em relação ao tipo *lobed* ($p = 0,0054$ e $p = 0,0142$, respectivamente) (Figura 7B e 7E). Já a espécie *Rhamdia quelen* apresentou maior frequência para as alterações tipo *notched* e *vacuolated* em relação a alteração *lobed* ($p < 0,0001$ e $p = 0,0001$, respectivamente) (Figura 7D).

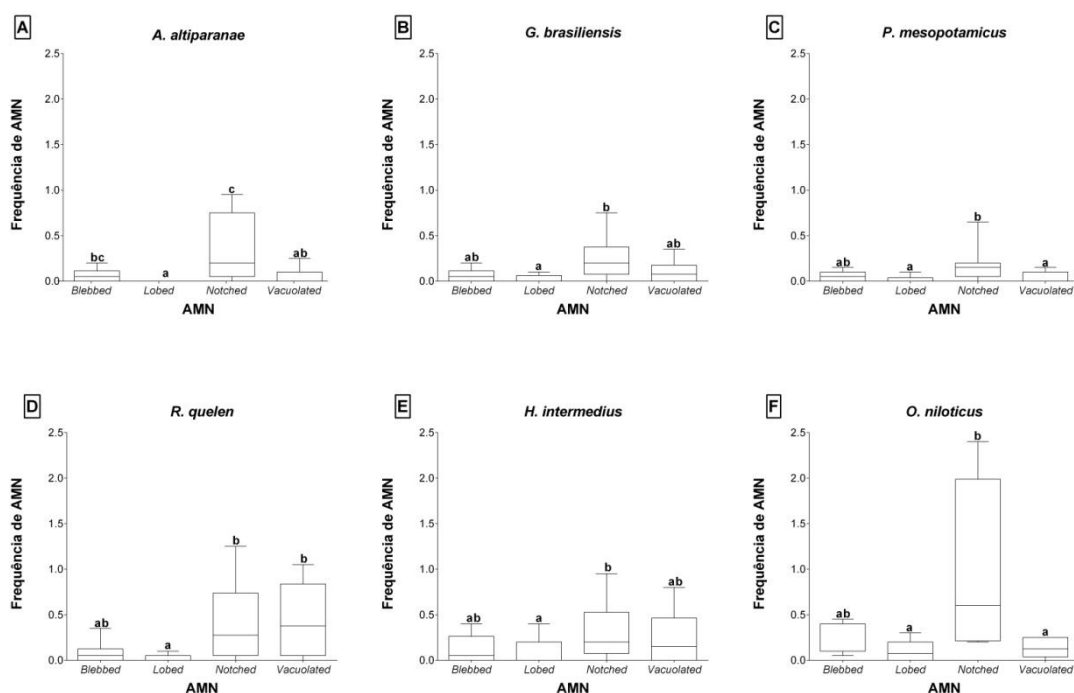


Figura 8.: Comparação entre as alterações morfológicas nucleares (AMNs) em (A) *Astyanax altiparanae*, (B) *Geophagus brasiliensis*, (C) *Piaractus mesopotamicus*, (D) *Rhamdia quelen*, (E) *Hoplias intermedius* e (F) *Oreochromis niloticus*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística, considerando valores de $p < 0,05$ como significantes.

Comparando cada tipo de AMN entre as espécies, foi observada diferença estatística somente da alteração tipo *vacuolated*. Sendo que *R. quelen* apresentou maior frequência em relação a *A. altiparanae* ($p=0,0016$), *G. brasiliensis* ($p=0,0432$), *P. mesopotamicus* ($p=0,0022$) e *O. niloticus* ($p=0,036$), com exceção apenas de *H. intermedius* ($p>0,05$). E a espécie *H. intermedius* apresentou maior frequência em relação a *A. altiparanae* ($p=0,0173$) (Figura 8).

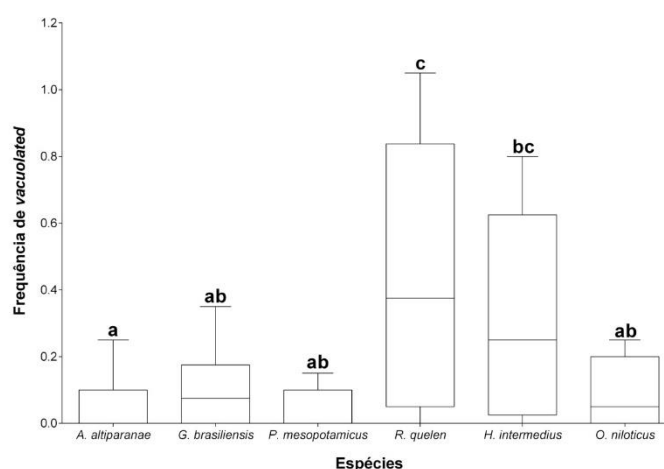


Figura 9.: Comparação entre as espécies *A. altiparanae*, *G. brasiliensis*, *P. mesopotamicus*, *R. quelen*, *H. intermedius* e *O. niloticus* em relação à alteração morfológica nuclear (AMN) tipo *vacuolated*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística, considerando valores de $p<0,05$ como significantes.

As alterações *micronúcleo* e *binúcleo* não estão representadas nos gráficos, pois estas apresentaram frequências igual a zero, não sendo possível realizar análise estatística.

6. DISCUSSÃO

Estudos demonstram que diferentes espécies de peixes que vivem no mesmo ambiente apresentam variações de danos ao DNA (Grisolia *et al.*, 2009). No presente estudo, foram realizadas comparações entre diferentes espécies de peixes que vivem em diferentes porções dos corpos d'água (fundo de rios, coluna d'água) e apresentam diferentes hábitos alimentares (carnívoros, onívoros, detritívoros). Através do teste de

MNP e AMNs foi possível observar a presença dessas alterações em todas as espécies analisadas, evidenciando a alteração *notched*, que obteve maiores frequências em todas as espécies analisadas individualmente, e *vacuolated*, que apresentou diferença estatística entre todas as AMNs, destacando a espécie *R. quelen*.

R. quelen é uma espécie habitante de fundos de rios, lagos e poços, com preferência aos ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação, acredita-se que a diferença observada nesta espécie pode estar relacionada ao seu hábito alimentar onívoro de fundo de rios. Grisolia *et al.* (2009), em estudo com peixes na Lagoa de Paranoá, observou nas espécies *Steindachnerina insculpita* e *Cichla temensis* níveis elevados de danos no DNA e micronúcleos, dentre várias espécies avaliadas, apresentando hábito onívoro de fundo de rios e piscívoros, respectivamente. Klingelfus (2013), analisou danos no DNA em *R. quelen* pela exposição de diferentes concentrações de nanopartículas de TiO₂ e chumbo II, observando pelo MNP que somente a alteração tipo *vacuolated* apresentou diferença entre os tratamentos, porém, não apresentou diferença significativa entre grupo controle negativo e o grupo tratado com chumbo II, evidenciando a elevada frequência de *vacuolated* na espécie sem exposição a xenobióticos. Segundo Grisolia *et al.* (2009), devemos estar cientes da sensibilidade diferencial de organismos aquáticos a agentes genotóxicos e suas respostas a elas, e de suas relações no ecossistema aquático.

H. intermedius foi outra espécie que também apresentou frequência significativa para alteração *vacuolated*, sendo esta a única espécie que não diferenciou estatisticamente com *R. quelen*. Vicari (2015) observou, por meio de estudos com peixes da espécie *H. intermedius* exposto a diferentes concentrações de nanopartícula de TiO₂ e chumbo II, que ambas as alterações tipo *notched* e *vacuolated* se destacaram tanto para o grupo controle negativo como para os diferentes tratamentos utilizados, pelo teste de MNP. No presente estudo *H. intermedius* apresentou maior frequência para a alteração tipo *vacuolated* na comparação com a espécie *A. altiparanae* esta por sua vez obteve menores valores em relação as demais espécies. Galvan (2011), avaliou a genotoxicidade de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino e pesquisa utilizando o peixe *A. altiparanae*, e

identificou que frequências de MN e AMNs nos eritrócitos dessa espécie foram baixas em todos os grupos (controle e expostos). Neste estudo, acredita-se também na influência do hábito alimentar na relação entre a espécie *H. intermedius* com hábito carnívoro e territorialista, e *A. altiparanae* espécie onívora de coluna d'água.

Em relação as alterações morfológicas nucleares *micronúcleo* e *binúcleo*, todas as espécies avaliadas apresentaram médias iguais a zero. Conforme Williams e Metcalfe (1992), a formação de micronúcleo ocorre espontaneamente em células de peixes, porém essa frequência é relativamente menor em comparação a outros organismos. O que leva a necessidade da inclusão das outras alterações morfológicas nucleares para uma análise mais robusta. Segundo Al-Sabti e Metcalfe (1995), frequências espontâneas de micronúcleos observados em estudos com várias espécies de peixes são variáveis, dependendo do método utilizado e o manuseio dos espécimes. Udroui (2006) indicou que fatores intrínsecos, como tempo de vida dos eritrócitos circulantes e tempo de remoção de eritrócitos velhos ou danificados poderiam influenciar a presença espontânea de micronúcleo. Por outro lado, a sensibilidade dos testes de genotoxicidade também pode ser afetada pela elevada variabilidade interindividual (Akcha *et al.*, 2003).

Estudos apontam a influência de fatores intraespecíficos em respostas ao teste de MNP. Esses fatores incluem: idade; sexo; dieta; saúde; status reprodutivo e linhagem genética (AL-SABTI, 1995). Em peixes, respostas ao teste de micronúcleo podem variar de acordo com o sexo, pois conforme o estado hormonal de peixes fêmeas, o grau de dano citogenético se altera. A idade dos peixes é outra possível variável, pois já foi relatada em trabalhos com mamífero que indivíduos mais velhos apresentam tendência a uma maior sensibilidade a danos citogenéticos e em peixes nas primeiras fases de desenvolvimento do que na fase adulta por exposição a agentes genotóxicos (Christie e Da Costa, 1983). A dieta é outro fator que pode influenciar sobre a ativação metabólica de vias celulares por produtos químicos genotóxicos (Virgano *et al.*, 1993). Os organismos utilizados no trabalho eram juvenis em relação ao tempo de vida específico para cada espécie, e por este motivo pode ter ocorrido a ausência de micronúcleos e alterações do tipo *binúcleo*.

Para alteração tipo *notched*, foi observado um número basal relativamente alto, representativo em todas as espécies quando comparadas com cada alteração

individualmente. Segundo Udroui (2006), o teste de micronúcleo não consiste em mera observação das frequências de eritrócitos micronucleados, mas consiste no estudo das variações destas frequências. Essa comparação é feita normalmente entre animais controle e expostos, havendo a importância no conhecimento de valores basais de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares.

7. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível observar a importância de se conhecer valores basais das frequências de MN e AMNs. Dentre as diferentes espécies avaliadas, foi possível observar que as AMNs ocorreram com relativa frequência entre as espécies, em destaque a alteração *notched*, que foi significativa em todas as espécies, indicando a ocorrência espontânea nos eritrócitos com maior frequência sem a exposição a xenobióticos. Na espécie *Rhamdia quelen*, foi identificado que a alteração *vacuolated* ocorre espontaneamente em grande frequência em seus eritrócitos, sendo possível relacionar a alteração como uma característica da espécie quando comparada outras espécies avaliadas.

Desta forma, pode se dizer que AMNs ocorrem a nível basal, ou seja, espontaneamente sem a interferência de xenobióticos, e que estas podem ocorrer em elevadas frequências. Contudo, deve se levar em conta a influência de fatores intraespecíficos da espécie e estar ciente da sensibilidade diferencial de organismos aquáticos e de suas relações no ecossistema aquático, uma vez que, até o momento, não é possível afirmar quais os motivos reais da origem dessas alterações.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, 2002.

AGOSTINHO, A. A. et al. Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. In: TUNDISI, J. G.; STRASKRABA, M. (Ed.). **Theoretica reservoir ecology and its applications**. São Carlos: International Institute of Ecology-IEE; Leiden: Backhuys Publishers, 1999. Cap. 11, p. 227-265.

AGOSTINHO, A. A.; BINI, L. M.; GOMES, L. C.; JÚLIO, H. F. JR.; PAVANELLI, C. S.; AGOSTINHO, C. S. 2004. Fish assemblages. In **The Upper Paraná River floodplain: physical aspects, ecology, and conservations**. S. M. Thomaz, A. A. Agostinho, N. S. Hahn (Eds.) Backhuys Publishers, Leiden, 223 – 246.

AKAISHI, F.M. **Aplicação de Biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Curitiba, 2003.

AKCHA, F., VINCENT HUBERT, F., PFHOL-LESZKOWICZ, A., 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (Limanda) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. **Mutation Research**, v. 534, p. 21–32.

AL-SABTI, K. (1986) **Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals**, *Cytobios*, 47, 147-154.

AL-SABTI, K; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 343, p. 121-135, 1995.

ASSUMPÇÃO *et al.* Análise do conteúdo estomacal de *Cichla ocellaris* e *Pygocentrus nattereri* (espécies introduzidas) e *Geophagus brasiliensis* e *Astyana bimaculatus* (espécies nativas) de lagos do Vale do Rio Doce – MG e suas implicações. In: ROCHA, O; ESPINDOLA, E. L. G.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R.; RIETZLER, A. C. (Orgs.). **Espécies invasoras em águas doces: estudos de caso e propostas de manejo**. 416 p. 2005.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, v. 467, p. 177-186, 2000.

Bair e Girard (1854) apud EIGENMANN (1917) EIGENMANN, C. H. The American Characidae. **Memoirs Museum of Comparative Zoology**, Vol. XLII. Part 1. CAMBRIDGE, U. S. A.; Printed for the museum, 558 p., 1917.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; RODRIGUES, L. B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R. M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A. B.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, 34: 1565-1469, 2003.

BERNNEMANN, S. T.; SHIBATTA, O. A. Dinâmica de uma assembleia de peixes do tio Tibagi, p. 433-442. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Eds). **A Bacia do tio Tibagi**. Londrina, ED. UEL, 595p., 2002.

- BICKHAM, J. W.; SANDHU, S.; HEBERT, P. D. N.; CHIKHI, L.; ATHWAL, R. 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implication for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**. Nº 463. P. 33-51.
- BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA W. M.; MEURER, F. Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Linhagens Tailandesa e Comum nas Fases Inicial e de Crescimento. **Revista brasileira de Zootecnia**. 2001; 30 (5): 1391-1396.
- BRIRSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**. Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, São Paulo, p. 79-108, 1972.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. Brasília: EMBRAPA, 2 ed., 227 p., 2007;
- CALCAGNOTO, D. 1998. **Caracterização de Bancos Genéticos Selvagens de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Através da Análise do DNA Mitocondrial**. São Paulo Tese (Doutorado) Departamento de Genética e Biologia Evolutiva – Universidade de São Paulo.
- CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123 -2136, 1990.
- CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J. E. P. **Piscicultura nos trópicos**. São Paulo: Manole, 1986. 154p.
- CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S. M. F. 1985. **Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu (*Colossoma mitrei* Berg 1985)**. FCAV/UNESP. Jaboticabal, SP. 26p.
- CATELLA, A. C.; PEIXER, J.; PALMEIRA, S. da S. 1996; Sistema de controle de pesca de Mato Grosso do Sul, SCPESCA/MS-1 maio/1994 à abril/1995. Corumbá MS: EMBRAPA-CPAP/SEMADES-MS. (EMBRAPA-CPAP, **Documento** (16)). 49p.
- CATELLA, A. C. 2001 A pesca no Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil; descrição, nível de exploração e manejo (1994-1999). Manaus Tese (Doutorado) Instituto acional de Pesquisa da Amazônia – Universidade do Amazonas *apud* PEIXER, J. e PETRERE, JR., M. 2007. Hook selectivity of the Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) in the Pantanal, the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz. J. Biol.** 67(2), 339-345.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.19, p.107-111, 2005.
- CHRISTIE, N.T. and M. Costa (1983) In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. III. Effects of metals on DNA structure and function in intact cells, **Biological Trace Element Research**, 5, 55-71.
- EL-SAYED, A. F. M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**. 1999; 179: 149-168;
- EVANS, H.J., G.J. Neary and F.S. Williamson (1959) Intern. J. **Radiation Biology**., v. 1, p. 216-229.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, Limerick, p. 411-4116, 2002.

FOLLY, E. F.; BASTOS, V. L. C.; ALVES, M. V.; BASTOS, J. C.; ATELLA, G. C. A high density lipoprotein from *Piaretus mesopotamicus*, pacu, (Osreichtyhes, Characidae), is associated with paraoxonase activity. **Biochime**, v. 83, p. 945-951, 2001.

GALVAN, G. L. **Avaliação genotóxica de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino e pesquisa utilizando como bioindicador o peixe Astyanax altiparanae (CHARACIDAE)**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação), Paraná: Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia**, PUCRS, Série Zoologia, Porto Alegre, v. 13, p. 65-88, 2000.

GRISOLIA, C.K., RIVERO, C.L.G., STARLING, F.L.R.M., DA SILVA, I.C.R., BARBOSA, A.C., DOREA, J.G., 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake, **Genetic Molecular Biol.** 32, 138–143.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, 30 (1): 179-185, 2000.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. de S. O lambari *Astyanax altiparanae* (Characidae) pode ser um dispersor de sementes? **Acta Scientiarum**, v. 25, p. 353-360, 2003.

GONTIJO, Á. M. M. C.; BARRETO, R. E.; SPEIT, G.; REYES, V. A. V; VOLPATO, G. L.; SALVADORI, D. M. F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental**, v. 534, p. 165-172, 2003.

GUEDES, D. S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia* spp) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. Santa Maria – RS, 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1980.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, v.18, p.187-192, 1973.

HEDDLE, J.A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavourin, J.T. MacGregor, G.W. Newell and M.F. Salamon (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, **Mutation Research**, 123, 61-118

HOOFTMAN, R.N. and W.K. de Raat (1982) Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in peripheral blood erythrocytes of Eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate, **Mutation Research**, 104, 147-152.

HOSE, J.E., J.N. Cross, S.G. Smith and D. Diehl (1987) Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California, **Marine Environmental Research**, 22, 167-176.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M. C. 2003. Growth survival of pacu (*Pizractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles reared in ponds with different initial larvicultura periods indoors. **Aquaculture Nutrition** 8, 169-174.

KLINGELFUS, T. **Efeitos tóxicos de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e chumbo inorgânico (PbII) em *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE).** Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Paraná: Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

LEUZZI, M. S. P.; ALMEIDA, F. S. de; ORSI, M. L.; SODRÉ, L. M. K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27 p. 355-362, 2004

MESCHIATTI, A. J. Alimentação da Comunidade de peixes de uma lagoa marginal do rio Mogi-Guaçu, SP. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 3; 115-137, 1995.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSOCLO, W. R.; KAVATA, L. B.; LACERDA, C. H. F. Nível de arraçoamento para alevinos de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1835-1840, 2005.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 370-374, 2002.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4 ed., John Wiley & Sons, 2006.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio rio Paranapanema, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 207-218, 2004.

ORSI, M. L.; SHIBATTA, O. A.; SILVA-SOUZA, A. T. Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertanópolis, p. 425-432, 2002. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Eds). **A bacia do Rio Tibagi, Londrina, UEL**, 595p.

OYAKAWA, O. T.; MATTOX, G. M. T. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 7, n. 2, p. 117-140, 2009.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 345-356, 1995.

PULLELA, S. V. S. 1997. **Aquaculture of pacu (*Piaractus mesopotamicus* and a comparison of its Quality: Microbiological, Sensory and Proximate Composition.** Blacksburg. Dissertação (Mestrado) – Virginia Polytechnic Institute and State University.

RESENDE, E. K. 2003. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin Excluding the Upper Paraná River. In Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation states. CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAERS A. (Eds), World Bank, Victoria. 99-155.

RIBEIRO, L. R.; ANDRADE, H. H. R. Métodos para o diagnóstico da exposição genotóxica ambiental e ocupacional. In: MARQUES, E. K. (ORG). **Diagnóstico Genético-Molecular**, Ed. Da ULBRA, 2003.

RODRIGUEZ-FUENTES, G.; GOLD, B. G. Characterization of cholinesterase activity from diferente tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine Environmental Research**. 2004; 58: 505-509.

SABINO, J.; CASTRO, R. M. C. Alimentação, período de atividade e distribuição espacial dos peixes de um riacho da floresta Atlântica (Sudeste do Brasil). **Revista Brasileira de Biologia**. v. 50: 23-36, 1990.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Tese de Doutorado, 156p. (PhD Thesis) – Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden, 1996.

SILVA, A. J. **Aspectos de alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei* (Berg, 1985) (Pisces, Characidae), no pantanal de Mato Grosso**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1985. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1985.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, Cap. 8, p. 167-170.

STEFANI, P. M.; REIS, S. A.; ROCHA, O. Caracterização alimentar do acará (*Geophagus brasiliensis*) na lagoa dos tropeiros, Minas Gerais. **Anais: II Simpósio de ecologia do PPGERN**, Universidade Federal de São Carlos, 2008.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle, P.M. Jr.; Bergman, H.L. Biomarkers. **Biochemical, Physiological, and Histological markers of antropogenic stress**. Eds. Lewis Publishers, p.235-334, 1992.

UIEDA, V. S. **Comunidade de peixes de um rio litorâneo: Composição, Habitat e Hábitos**, 1995. Tese (Doutorado), Unicamp, Campinas (SP).

VAZZOLER, A. E. A. M.; SUZUKI, H. I.; MARQUES, E. E.; LIZAMA, M. De. LOS, A. 1997. Primeira maturação gonadal, períodos e áreas de reprodução. In: A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e sócio econômicos.

VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Eds), EDUEM, Maringá Paraná. P. 249-265.

VALENT, G. U. 1998. Histórico da importância e utilização dos testes de toxicidade: resultados publicados. In: CONGRESSO DE ECOTOXICOLOGIA. Itajaí-SC.

VIRGANO, L.A., M. BAGNASCO, C. BENNICELLI AND F. Melodia (1993) Xenobiotic metabolizing enzymes in uninduced and induced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of diets and food deprivation, **Comp. Biochemical Physiol**, 104, 51-55.

WALKER, J. A.; BOREHAM, D. R.; UNRAU, P.; DUCAN, A. M. V. Chromosome content and ultrastructure of radiation – induced micronuclei. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 419-424, 1996.

WILLIAMS, R.C. AND C.D. METCALFE (1992) Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout, **Aquatic Toxicology**, 23, 193-202.

ZAGATTO, P. A.; RASMUSSEN, J. B. 1998. International Program on Chemical Safety (IPCS). **Environmental Health Criteria** 155. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Geneva.