

CRISTIANE BENINCÁ

BIOMONITORAMENTO DAS LAGOAS ESTUARINAS DO CAMACHO –
JAGUARUNA (SC) E SANTA MARTA - LAGUNA (SC); UTILIZANDO
Geophagus brasiliensis (CICHLIDAE).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Margarete Cestari

Co-orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro.

CURITIBA
2006

“Faça as coisas o mais simples que você
puder. Porém não as mais simples.”
(ALBERT EINSTEIN)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram em cada passo que dei em minha vida.

Aos meus irmãos e minha irmã, minhas cunhadas e sobrinhos, os grandes amores da minha vida.

Ao meu querido Luciano que participou ativamente deste trabalho, além de ter sido meu apoio nesses anos.

À Catarina e ao Adson, meus “pais adotivos” em Curitiba.

À minha orientadora Margarete, pela atenção, oportunidade e apoio, além de sua participação ativa neste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho e mestrado, e com carinho especial àqueles que participaram das coletas e práticas, Wanessa, Taynah, Thais e Thiago.

Aos pescadores e moradores de Jaguaruna, Sr. Jaime, André, Cris, Lela e Sr. Mario.

Aos professores, Ciro, Helena e Marina que me ajudaram a desenvolver este trabalho, com muita paciência e sabedoria.

À UNESCO pelo apoio técnico, todas as meninas dos laboratórios e coordenação, e os professores Cláudio Ricken, Silvio Ávila, Claus Pich e Reginaldo.

Ao Parque Ecológico Costa, representado pelo Wagner.

Àqueles que me ajudaram em novos desafios, os amigos Alberto e Maritana, e Eliandra e Manoela.

Ao CNPq pelo investimento feito neste trabalho.

E à todos aqueles que participaram direta e indiretamente deste trabalho, mas que minha memória falhou em lembrar.

À Deus, que possibilitou tudo isso.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL.....	1
1.2 BIOMARCADORES PARA O MONITORAMENTO DE GENOTOXICIDADE.....	4
1.2.1 Ensaio Cometa.....	4
1.2.2 Teste do Micronúcleo (MN).....	9
1.3 BIOMARCADORES PARA O MONITORAMENTO DE NEUROTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE	16
1.3.1 Acetilcolinesterase.....	16
1.3.2 Histopatologia de Fígado.....	17
1.4 ASPECTOS ECOLÓGICOS DE <i>Geophagus brasiliensis</i>	19
1.5 SULFATO DE COBRE.....	21
2 OBJETIVOS.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 COLETAS.....	23
3.2 LOCAIS DE COLETA.....	25
3.2.1 Parque Ecológico Costa.....	25
3.2.2 Laguna (SC).....	25
3.3 METODOLOGIA.....	28
3.3.1 Teste do Micronúcleo Písceo.....	28
3.3.2 Ensaio Cometa.....	29
3.3.3 Atividade da Acetilcolinesterase.....	31
3.3.4 Histopatologia.....	32
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN).....	35
4.1.1 Coleta Parque Ecológico Costa (Ponto Referência).....	36
4.1.2 Controle Positivo.....	36
4.1.3 Coleta de Novembro/2004.....	36
4.1.4 Coleta de Junho/2005.....	37
4.1.5 Coleta de Novembro/2005.....	38
4.1.6 Contraste entre as coletas.....	39
4.2 ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS.....	41
4.2.1 Coleta Parque Ecológico Costa (Ponto Referência).....	42
4.2.2 Controle Positivo.....	42
4.2.3 Coleta de Novembro/2004.....	43
4.2.4 Coleta de Junho/2005.....	44

4.2.5	Coleta de Novembro/2005.....	45
4.2.6	Contraste entre as coletas.....	46
4.3	ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAISS.....	48
4.3.1	Coleta Parque Ecológico Costa (Ponto Referência).....	48
4.3.2	Controle Positivo.....	49
4.3.3	Coleta de Novembro/2004.....	50
4.3.4	Coleta de Junho/2005.....	51
4.3.5	Coleta de Novembro/2005.....	52
4.3.6	Contraste entre as coletas.....	53
4.4	ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE.....	55
4.4.1	Coleta Parque Ecológico Costa (Ponto Referência).....	55
4.4.2	Coleta de Novembro/2004.....	55
4.4.3	Coleta de Junho/2005.....	56
4.4.4	Coleta de Novembro/2005.....	57
4.4.5	Contraste entre as coletas.....	58
4.5	HISTOPATOLOGIA.....	60
4.5.1	Coleta Parque Ecológico Costa (Ponto Referência).....	60
4.5.1.1	<i>Quantificação de Centro de Melanomacrófagos (CMM) e Melanomacrófagos Livres (ML)</i>	60
4.5.1.2	<i>Avaliação histopatológica das lesões</i>	61
4.5.2	Coleta de Novembro/2004.....	61
4.5.2.1	<i>Quantificação de Centro de Melanomacrófagos (CMM) e Melanomacrófagos Livres (ML)</i>	61
4.5.2.2	<i>Avaliação histopatológica das lesões</i>	61
4.5.3	Coleta de Junho/2005.....	62
4.5.3.1	<i>Quantificação de Centro de Melanomacrófagos (CMM) e Melanomacrófagos Livres (ML)</i>	62
4.5.3.2	<i>Avaliação histopatológica das lesões</i>	63
4.5.4	Coleta de Novembro/2005.....	64
4.5.4.1	<i>Quantificação de Centro de Melanomacrófagos (CMM) e Melanomacrófagos Livres (ML)</i>	64
4.5.4.2	<i>Avaliação histopatológica das lesões</i>	65
4.5.5	Contraste entre as coletas.....	66
4.5.5.1	<i>Quantificação de Centro de Melanomacrófagos (CMM) e Melanomacrófagos Livres (ML)</i>	66
4.5.5.2	<i>Avaliação histopatológica das lesões</i>	67
4.6	CONTRASTE ENTRE OS BIOMARCADORES.....	69
5	DISCUSSÃO.....	70
6	CONCLUSÕES.....	83
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
8	APÊNDICES.....	94

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>Geophagus brasiliensis</i>	23
FIGURA 2 - MAPA DE SANTA CATARINA INDICANDO A CIDADE DE LAGUNA.....	25
FIGURA 3 - IMAGEM DE SATÉLITE DAS LAGOAS ESTUARINAS DE LAGUNA E JAGUARUNA (SC).....	27
FIGURA 4 - IMAGEM DE CÉLULA SEM ALTERAÇÃO, ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA NUCLEAR E MICRONÚCLEO.....	35
FIGURA 5 - FREQUÊNCIA DE MN E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS NA COLETA DE NOVEMBRO/2004, EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA E CONTROLE POSITIVO.....	37
FIGURA 6 - FREQUÊNCIA DE MN E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS NA COLETA DE JUNHO/2005, EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA E CONTROLE POSITIVO.....	38
FIGURA 7 - FREQUÊNCIA DE MN E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS NA COLETA DE NOVEMBRO/2005, EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA E CONTROLE POSITIVO.....	39
FIGURA 8 - FREQUÊNCIA DE MN E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS ENTRE AS COLETAS.....	40
FIGURA 9 - IMAGEM CAPTURADA DE COMETAS EM ERITRÓCITOS INDICANDO AS CLASSES 0, 1, 2, 3 E 4.....	41
FIGURA 10 - MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE <i>Geophagus brasiliensis</i> - NOVEMBRO/2004 EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA E CONTROLE POSITIVO.....	44
FIGURA 11 - MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE <i>Geophagus brasiliensis</i> - JUNHO/2005 EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA E CONTROLE POSITIVO.....	45
FIGURA 12 - MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE <i>Geophagus brasiliensis</i> - NOVEMBRO/2005 EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA E CONTROLE POSITIVO.....	46
FIGURA 13 - MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE <i>Geophagus brasiliensis</i> - COLETAS DE NOVEMBRO/2004, JUNHO/2005 E NOVEMBRO/2005.....	47
FIGURA 14 - IMAGEM CAPTURADA DE COMETAS EM CÉLULAS RENAI INDICANDO AS CLASSES 0, 1, 2, 3 E 4.....	48
FIGURA 15 - MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAI DE <i>Geophagus brasiliensis</i> - NOVEMBRO/2004 EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA E CONTROLE POSITIVO.....	51

FIGURA 16 - MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAIIS DE <i>Geophagus brasiliensis</i> – JUNHO/2005 EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA E CONTROLE POSITIVO.....	52
FIGURA 17 - MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAIIS DE <i>Geophagus brasiliensis</i> - NOVEMBRO/2005 EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA E CONTROLE POSITIVO.....	53
FIGURA 18 - MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAIIS DE <i>Geophagus brasiliensis</i> – COLETAS DE NOVEMBRO/2004, JUNHO/2005 E NOVEMBRO/2005....	54
FIGURA 19 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM <i>Geophagus brasiliensis</i> , COLETA DE NOVEMBRO/2004 X PONTOS REFERÊNCIA DE JANEIRO/2005 E JULHO/2005.....	56
FIGURA 20 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE DE <i>Geophagus brasiliensis</i> , COLETA DE JUNHO/2005 X PONTOS REFERÊNCIA DE JANEIRO/2005 E JULHO/2005.....	57
FIGURA 21 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE DE <i>Geophagus brasiliensis</i> , COLETA DE NOVEMBRO/2005 X PONTOS REFERÊNCIA DE JANEIRO/2005 E JULHO/2005.....	58
FIGURA 22 - ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM <i>Geophagus brasiliensis</i> , COLETA DE NOVEMBRO/2004 X JUNHO/2005 X NOVEMBRO/2005.....	59
FIGURA 23 - MICROSCOPIA DE LUZ DO FÍGADO DE <i>Geophagus brasiliensis</i> . COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA. CORTES COM 5µm DE ESPESSURA.....	60
FIGURA 24 - MEDIANAS ENCONTRADAS PARA O ÍNDICE DE BERNET NA COLETA DE NOVEMBRO/2004 EM CONTRASTE COM O PONTO REFERÊNCIA.....	62
FIGURA 25 - MEDIANAS ENCONTRADAS PARA O ÍNDICE DE BERNET NA COLETA DE NOVEMBRO/2004 EM CONTRASTE COM O PONTO REFERÊNCIA.....	63
FIGURA 26 - MEDIANAS ENCONTRADAS PARA O ÍNDICE DE BERNET NA COLETA DE NOVEMBRO/2005 EM CONTRASTE COM O PONTO REFERÊNCIA.....	65
FIGURA 27 - CONTRASTES DE MÉDIAS DE CMM ENTRE AS COLETAS.....	66
FIGURA 28 - CONTRASTES DE MÉDIAS DE ML ENTRE AS COLETAS.....	67
FIGURA 29 - CONTRASTE ENTRE AS MEDIANAS ENCONTRADAS PARA O ÍNDICE DE BERNET ENTRE AS COLETAS.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TRABALHOS <i>IN SITU</i> UTILIZANDO PEIXES COMO BIOMONITORES PARA O ENSAIO COMETA.....	9
TABELA 2 - ESCORES E MEDIANAS OBTIDAS EM ERITRÓCITOS NO PONTO REFERÊNCIA.....	42
TABELA 3 - ESCORES E MEDIANAS OBTIDAS EM ERITRÓCITOS NO CONTROLE POSITIVO.....	42
TABELA 4 - ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM ERITRÓCITOS NOS PONTOS DE COLETA (NOVEMBRO/2004).....	43
TABELA 5 - ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM ERITRÓCITOS NOS PONTOS DE COLETA (JUNHO/2005).....	44
TABELA 6 - ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM ERITRÓCITOS NOS PONTOS DE COLETA (NOVEMBRO/2005).....	45
TABELA 7 - ESCORES E MEDIANAS OBTIDAS EM CÉLULAS RENAIIS NO PONTO REFERÊNCIA.....	49
TABELA 8 - ESCORES E MEDIANAS OBTIDAS EM CÉLULAS RENAIIS NO CONTROLE POSITIVO.....	49
TABELA 9 - ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM CÉLULAS RENAIIS NOS PONTOS DE COLETA (NOVEMBRO/2004).....	50
TABELA 10 - ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM CÉLULAS RENAIIS NOS PONTOS DE COLETA (JUNHO/2005).....	51
TABELA 11 - ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM CÉLULAS RENAIIS NOS PONTOS DE COLETA (NOVEMBRO/2005).....	53
TABELA 12 - OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE <i>Geophagus brasiliensis</i> NO PONTO REFERÊNCIA.....	61
TABELA 13 - MÉDIAS DE CMM E ML DA COLETA DE NOVEMBRO/2004 E PONTO REFERÊNCIA.....	61
TABELA 14 - OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE <i>Geophagus brasiliensis</i> NA COLETA DE NOVEMBRO/04, EM CONTRASTE AO PONTO REFERÊNCIA.....	62
TABELA 15 - MÉDIAS DE CMM E ML DA COLETA DE JUNHO/2005 E PONTO REFERÊNCIA.....	63
TABELA 16 - OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE <i>Geophagus brasiliensis</i> NA COLETA DE JUNHO/05, EM CONTRASTE AO PONTO REFERÊNCIA.....	64
TABELA 17 - MÉDIAS DE CMM E ML DA COLETA DE NOVEMBRO/2005 E PONTO REFERÊNCIA.....	64
TABELA 18 - OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE <i>Geophagus brasiliensis</i> NA COLETA DE NOVEMBRO/05, EM CONTRASTE AO PONTO REFERÊNCIA.....	65
TABELA 19: OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE <i>Geophagus brasiliensis</i> EM TODAS AS COLETAS, EM CONTRASTE AO PONTO REFERÊNCIA.....	68
TABELA 20: COMPARAÇÃO ENTRE OS BIOMARCADORES PARA CADA PONTO DE COLETA.....	69

RESUMO

Nas últimas décadas têm aumentado o interesse da comunidade científica e agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle aos agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas. O objetivo deste trabalho foi monitorar a qualidade das águas das Lagoas estuarinas do Camacho (Jaguaruna-SC) e Santa Marta (Laguna-SC), utilizando *Geophagus brasiliensis* (acará); avaliando a genotoxicidade através do ensaio cometa em hemácias periféricas e em células renais e do teste do micronúcleo písceo (MNP) em hemácias periféricas; a neurotoxicidade através da atividade da acetilcolinesterase em músculo e a citotoxicidade através de análises histopatológicas de fígado. Foram realizadas três coletas nas Lagoas, novembro/2004, junho/2005 e novembro/2005. Foram utilizados 30 exemplares dos seguintes pontos: P1 (próximo ao Rio Tubarão e cultivos de arroz) na Lagoa de Santa Marta, P2 (próximo a Barra do Camacho) e P3 (ponto mais distante do Rio Tubarão com saídas de esgoto doméstico) na Lagoa do Camacho. Todas as Lagoas são interligadas por canais, e a do Camacho liga-se também ao Oceano através da Barra. Um controle negativo (Ponto Referência – Parque Ecológico Costa – Curitiba/PR) e um positivo (Concentrações crescentes de Sulfato de Cobre (CuSO₄); CI 1x10⁻⁵, CII 4,3x10⁻⁵ e CIII 10⁻⁴, com 72h de exposição) foram utilizados para comparação dos resultados. No teste do micronúcleo písceo foram encontradas diferenças (teste de Kruskal-Wallis) em relação ao controle negativo para P1 em jun/05, e em todos os pontos em nov/05. Em relação ao controle positivo, P1 e P3 em jun/05 tiveram alterações semelhantes as do controle, em nov/05 todos os pontos apresentaram maior número de alterações que o controle. Para o ensaio cometa em eritrócitos, todos os pontos em todas as coletas apresentaram maiores danos que o controle negativo, em relação ao controle positivo, em jun/05 P1 e P3 tiveram danos maiores que o controle e P2 danos iguais, e em Nov/05 P1, P2 e P3 apresentaram danos semelhantes. Já em células renais percebeu-se um aumento gradativos dos danos em relação ao controle negativo. As respostas do ensaio cometa e MNP indicam a presença de substâncias com potenciais genotóxicos agudos e crônicos nas Lagoas. Para acetilcolinesterase

(Teste t) não foi utilizado controle positivo. Em relação ao controle negativo apenas P2 da coleta de nov/04 não apresentou inibição da enzima, todos os outros pontos em todas as coletas apresentaram inibição da atividade da acetilcolinesterase, indicando uma possível contaminação por pesticidas; provavelmente derivada de agrotóxicos dos cultivos de arroz. Para análise histopatológica através dos cálculos dos índices de Bernet, em relação ao Ponto Referência apenas a coleta de nov/04 apresentou menores índices de lesão total em fígado, demonstrando a capacidade dos compostos presentes nas Lagoas de provocar lesões agudas e crônicas no tecido hepático da espécie. Também não foi usado controle positivo para histopatologia. Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que a qualidade ambiental das Lagoas do Camacho e Santa Marta encontra-se comprometida, necessitando medidas emergenciais de controle de lançamento de contaminantes nas mesmas.

ABSTRACT

The interest of the scientific community and regulatory agencies concerning detection, foreknowledge and control of factors that cause some damages in human health and also alter the ecosystem tenability is increasing in the last decades. The objective of the present report was to monitor the water quality of the Estuarine Lakes located in Camacho (Jaguaruna, Santa Catarina State) and Santa Marta (Laguna, Santa Catarina State), using *Geophagus brasiliensis* (commonly known as *acará*). Genotoxicity through the comet assay in peripheral erythrocytes and in kidney cells, piscine micronucleus test (PMN) in peripheral erythrocytes, neurotoxicity through the acetylcholinesterase activity and also the cytotoxicity through histopathological analysis in liver were evaluated in this study. Three collections were performed in the Lakes, in November 2004, June 2005 and November 2005. Thirty specimens of the following places were used: P1 (close to the Tubarão River and rice cultivation) in Santa Marta Lake, P2 (near the Camacho Mouth) and P3 (farthest place from the Tubarão River with domestic sewage outputs) in Camacho Lake. Water channels connect all the Lakes, and the Camacho Lake is also linked to the ocean through the Mouth. A negative control (Reference Spot – Ecological Park Costa – Curitiba, Paraná State) and also a positive control (Rising Copper Sulphate Concentrations - CuSO₄; CI 1x10⁻⁵, CII 4, 3x10⁻⁵ and CIII 10⁻⁴, with 72h of exposure) were both used to compare the results. Differences were found (Kruskal-Wallis test) in the piscine micronucleus test concerning the negative control for P1 in June 2005, and in all the places in November 2005. Concerning the positive control, P1 and P3 in June 2005 presented similar alterations as observed in the control, and in November 2005 all places presented higher alterations than the control. In all places for all collections higher damages were observed compared to the negative control for the comet assay performed in erythrocytes. Comparing with the positive control P1 and P3 in June 2005 had higher damages and P2 had the same damages, and in November 2005 P1, P2 and P3 presented similar damages. And then for the kidney cells we realize a gradual increase of damages compared to the negative control. The results of the comet

assay and PMN indicate the presence of substances with chronic and acute genotoxic potential in the Lakes. Positive control was not used for acetylcholinesterase (T test). Concerning the negative control, only P2 of the November 2004 collection did not present enzyme inhibition. All the other places in all collections presented an inhibition of the acetylcholinesterase activity indicating a possible contamination by pesticides, probably originally from the agrotoxics of the rice cultivations nearby. For the histopathological analysis through Bernet index calculations, only the collection of November 2004 presented lower levels of total damage in liver concerning the Reference Spot, showing the capability of the substances within the Lakes in causing acute and chronic damages in the hepatic tissue of the studied specie. Positive control was not used for histopathology as well. The results of the present report show that the environmental quality of the Camacho and Santa Marta Lakes is affected. Thus, emergency policies to control the spilling of contaminants into the Lakes are needed.

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL

Durante as últimas três décadas tem aumentado o interesse da comunidade científica e agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle sobre os agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003). Este interesse foi intensificado com o constante crescimento da população mundial e o conseqüente aumento da industrialização, associado à utilização inadequada de recursos naturais.

Existem três principais situações que requerem biomonitoramento: (1) onde existam razões para se acreditar que espécies nativas estão sendo ameaçadas; (2) quando há implicações para a saúde humana quanto ao consumo de organismos potencialmente afetados; (3) quando existe o interesse em conhecer a qualidade ambiental (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

O biomonitoramento, principalmente no que diz respeito a organismos expostos a poluentes (bioindicadores); utilizando testes em sistemas biológicos (biomarcadores), propiciam promissoras ferramentas para a identificação de poluentes capazes de causar dano à saúde humana e ao ambiente (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

Entre os organismos utilizados como bioindicadores ambientais, estão as espécies aquáticas, tais como moluscos, peixes, anfíbios, mamíferos (COTELLE e FERARD, 1999), algas (AOYAMA; IWAHORI; MIYATA, 2003) e planárias (GUECHEVA; HENRIQUES; ERDTMANN, 2001). Dentro destas, o amplo uso de peixes é explicado pela sua capacidade de responder a tóxicos como os grandes vertebrados, podendo assim, ser bioindicadores dos potenciais carcinogênicos e teratogênicos em humanos. Os peixes indicam o potencial de exposição de populações humanas a genotóxicos químicos, sendo considerados os maiores vetores de transferência de contaminantes para humanos (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Muitas substâncias tóxicas como metais pesados e compostos orgânicos podem ser transferidos dos tecidos dos organismos para os seus predadores e chegar a concentrações de maiores magnitudes nos níveis tróficos superiores (DE LEMOS e TERRA, 2003).

Atualmente ambientes aquáticos como rios, estuários, lagoas e oceanos, próximos a grandes cidades, recebem seus esgotos e efluentes industriais. Estes têm sido agrupados de acordo com sua origem industrial. As maiores categorias incluem químicos e derivados, fabricação de papel e munições, refinaria de petróleo, indústrias de metais primários e outros (HOUK, 1992).

Com a implantação da agricultura industrial, extensas áreas naturais têm sido substituídas por monoculturas, causando um grave desequilíbrio no solo e o desenvolvimento de plantas e insetos indesejáveis. Assim, passaram a ser utilizados diversos agroquímicos, entre fertilizantes e agrotóxicos, o que tornou a agricultura uma das principais fontes de contaminantes aquáticos (KLEMZ, 2002).

Algumas das conseqüências destes tóxicos em organismos aquáticos incluem defeitos de hereditariedade devido a mutações e efeitos teratogênicos em células germinativas, declínio populacional, efeitos carcinogênicos (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998b), redução de crescimento, desenvolvimento anormal e redução da sobrevivência de embriões, larvas e adultos (LEE e STEINERT, 2003). Em humanos são citados, além da toxicidade que pode levar ao câncer, doenças como arterosclerose, doenças cardiovasculares e velhice prematura (GROVER e KAUR, 1999).

Devido às implicações ecológicas associadas com genotoxicidade, a detecção e quantificação de danos genéticos são de interesse em estudos ambientais. Genotóxicos produzem modificações químicas e físicas ao DNA, chamadas de DNA adducts (presença de substâncias ligantes ao DNA) ou quebra de fita do DNA, respectivamente (NACCI; CAYULA; JACKIM, 1996).

Muitos biomarcadores têm sido utilizados na detecção de exposição e efeitos da poluição genotóxica. Estes incluem a presença de DNA adducts, aberrações cromossômicas, quebras da fita do DNA, presença de micronúcleo e outras freqüentes anomalias nucleares (BOMBAIL; GORDON; BATTY, 2000).

A função primária dos testes de toxicologia genética é investigar o potencial de agentes químicos induzirem mutações nas células somáticas, ou que possam ser transmitidas às futuras gerações (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

1.2 BIOMARCADORES PARA O MONITORAMENTO DE GENOTOXICIDADE AMBIENTAL

De maneira geral, biomarcadores podem ser definidos como respostas biológicas aos poluentes ambientais que podem ser mensurados indicando a presença, os efeitos e, em alguns casos, o grau de contaminação. Uma questão que pode ser respondida por biomarcadores é se há contaminação ambiental em grau suficiente para causar efeitos fisiológicos. Se a resposta for positiva, investigações adicionais podem ser justificadas para determinar a natureza e o grau de contaminação. Por esta razão, biomarcadores devem ser considerados como indicadores precoces de contaminação (WALKER et al., 1996 *apud* KLEMZ, 2002).

Nos anos 50 e 60 a ecologia e a genética se uniram e desenvolveram os primeiros testes rápidos e eficientes hoje empregados em genotoxicidade (VILLELA et al. 2003).

1.2.1 ENSAIO COMETA

Na técnica do ensaio cometa utiliza-se células individualizadas, colocadas em agarose sobre uma lâmina de microscopia, lisadas, submetidas à eletroforese e coradas com brometo de etídio. O resultado é observado ao microscópio, sendo que as células sem DNA danificado apresentam um núcleo redondo, enquanto o DNA resultante de quebras simples ou múltiplas migra para fora do núcleo, formando uma cauda, parecendo um cometa. A extensão do DNA que migrou está relacionada com o dano ocorrido (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEIL, 1995).

As vantagens dessa técnica incluem, além da sensibilidade na detecção de dano no DNA: (a) a coleta de dados em nível de células individuais; (b) o uso de um número pequeno de células para a análise; (c) a possibilidade de aplicação em qualquer população de células eucarióticas isoladas (TICE e VASQUEZ, 1999).

Uma das dificuldades do uso do Ensaio Cometa em trabalhos ambientais, são os diferentes métodos de quantificação do dano. Atualmente utiliza-se tanto

tamanho da cauda com relação ao núcleo quanto porcentagem de fragmentação da cauda, ou ambos (LEE e STEINERT, 2003).

RYDBERG e JOHANSON (1978) *apud* COTELLE e FERARD (1999) desenvolveram a primeira quantificação de dano ao DNA em células individuais, embebidas em agarose sobre lâminas de microscopia e lisadas em condições alcalinas. Após a neutralização, as células eram coradas com laranja de acridina e a extensão do dano do DNA era quantificada com auxílio de um fotômetro, pela medida da proporção de fluorescência verde (indicando fita dupla de DNA) e por vermelho (indicando fita simples de DNA). Em 1984, ÖSTLING e JOHANSON *apud* COTELLE e FERARD (1999) descreveram um procedimento microeletroforético para a visualização direta do dano de DNA em células individuais. Células de mamíferos suspendidas em uma fina camada de agarose sobre uma lâmina de microscopia foram lisadas por detergentes e sais em altas concentrações, submetidas a eletroforese sob condições neutras, e coradas com um ligante de DNA fluorescente. Durante a eletroforese, as quebras e os fragmentos relaxados migravam do núcleo. Os resultados foram imagens que subsequentemente foram nomeadas por sua aparência a um cometa e utilizadas para determinar a extensão de dano ao DNA. Este método original neutro parece ser sensível para mensurar mudanças na helicoidização do DNA que resultam de quebras simples, mas as condições de lise foram ineficazes para remoção de todas as proteínas. SINGH et al. (1988) adaptou este procedimento para condições alcalinas, que permitiu a detecção de quebras duplas e também de quebras simples.

SINGH et al. (1988) e OLIVE et al. (1990) *apud* RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES (2003) introduziram, independente e paralelamente, algumas modificações no protocolo do teste do cometa, as quais incluíam digestão protéica mais completa e a alcalinização da solução de lise e de eletroforese. Essas modificações possibilitaram a identificação de quebras de fitas simples e sítios álcali-lábeis no DNA, além das quebras de dupla fita, já visualizadas com o protocolo de ÖSTLING e JOHANSON (1984, 1987) *apud* RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES (2003). Esse aumento de sensibilidade do ensaio foi atribuído à desnaturação do DNA (separação das fitas) quando exposto a pH

extremamente alcalino (pH 12). Além disso, as condições de digestão protéica e alcalinização das soluções de lise e eletroforese estimulam a perda da estrutura terciária superenovelada a partir de uma quebra de fita simples de DNA. Essas condições influenciam no tipo de dano a ser visualizado, bem como nas características do cometa obtido. Sob condições neutras (pH 7.5), os cometas apresentam caudas mais densas, enquanto que sob condições alcalinas (pH >10) estas são mais dispersas. Em meio menos alcalino as caudas são mais curtas e mais intensamente coradas, enquanto que em meio mais alcalino (pH 10-11), são mais longas e coram-se mais fracamente (KLAUDE et al., 1996).

O papel da lise no ensaio cometa é o de remover os conteúdos celulares, com exceção do material nuclear. O DNA permanece bem condensado devido à presença de uma pequena quantidade de proteínas não-histônicas. Porém, quando colocado na solução de eletroforese, a qual possui um pH>13, a espiralização do DNA começa a relaxar a partir de pontos de quebra da fita. Isto permite que tais quebras sejam reveladas pela eletroforese na seqüência do teste (YENDLE et al., 1997; COLLINS et al., 1997; KLAUDE et al., 1996).

O Ensaio Cometa em condições alcalinas detecta quebras simples e duplas da fita de DNA. Mas quebras simples não são as lesões mais interessantes. Elas são rapidamente reparadas, e não são consideradas como letais significantes ou lesões mutagênicas. Muitos agentes genotóxicos não induzem quebra diretamente. Eles podem criar sítios apurínicos-apirimidínicos (com a falta de uma base), que são álcali-lábeis e são provavelmente convertidos em quebra quando o DNA está em solução de eletroforese de alto pH. Além disso, quebras estarão transitoriamente presentes dependendo de reparo de lesões via excisão de base ou excisão de nucleotídeos, e então um alto nível de quebras no Ensaio Cometa poderá indicar altos danos ou eficiente reparo (COLLINS et al., 1997).

Várias são as metodologias empregadas para avaliar a extensão do dano ocasionado ao DNA. Uma das medidas utilizadas na avaliação deste dano é feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão das caudas formadas pelo DNA em migração (classificados como classe 0= nenhum dano, até classe 4= máximo dano). Esta análise tanto pode ser feita visualmente como através de programas

computacionais especiais. Outros padrões e técnicas de medida de dano também podem ser utilizados (FERRARO et al., 2004).

Algumas modificações foram feitas para adequar o Ensaio Cometa as situações específicas. COLLINS et al. (1997), aplicaram endonuclease de reparo de lesões específicas sobre as lâminas após a lise, e aumentaram enormemente a sensibilidade e especificidade do teste, induzindo quebras em sítios danificados.

Outras modificações foram feitas para o preparo da suspensão celular, dependendo do tipo celular a ser usado. COTELLE e FERARD (1999), fizeram um resumo de alguns tipos celulares utilizados e seus métodos de preparo; dentre estes estão plantas, vermes, moluscos, peixes, anfíbios e mamíferos.

GUECHEVA; HENRIQUES; ERDTMANN (2001) desenvolveram o preparo de suspensão celular para planárias utilizando tripsina. BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS (1998) testaram diversos meios para dissociação de tecidos como fígado, rim e brânquias e verificaram um menor número de células danificadas no controle, utilizando uma solução de 200-mM N-t-butyl- α -phenylnitron em PBS.

Segundo MITCHELMORE e CHIPMAN (1998b), o uso de tripsina no preparo da suspensão celular resulta em quebras de fita do DNA, em células controles. Utilizando a técnica de perfusão de hepatócitos em colágeno, é possível detectar um número mínimo de quebras em células controle.

O Ensaio Cometa tem sido descrito como sendo altamente sensível, detectando uma quebra em 1×10^{10} (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998b).

Em peixes, 97% das células sanguíneas são eritrócitos e 3% leucócitos, dando assim uma alta homogeneidade à amostra (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998b), porém outros tipos de tecidos podem ser utilizados.

Os tipos celulares de peixes utilizados no Ensaio Cometa incluem intestino, fígado, rim, baço, músculo, brânquias e gônadas (LEE e STEINERT, 2003). Estes autores citam que alguns dos fatores que podem influenciar nos danos do DNA em um particular tecido incluem heterogeneidade do tipo celular, ciclo celular, frequência de renovação celular e cultura ou condições de crescimento.

Variações sazonais devem ser consideradas quando o material é coletado em campo, o que pode interferir nos resultados do Ensaio Cometa (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998b). WINTER et al., (2004) levaram em consideração as variações sazonais, coletando seus peixes (*Leuciscus cephalus*) dos rios de Birmingham (UK) por quatro semanas entre inverno/primavera (janeiro a março) e verão/outono (julho a outubro).

Na literatura, estudos *in vitro* e *in vivo* com o Ensaio Cometa em peixes são reportados. Para experimentos *in vivo*, substâncias teste são injetadas no peixe ou misturadas com água ou comida. Genotoxicidade de poluentes na água, são avaliados *in vitro* pelo tratamento de culturas de hepatócitos ou *in situ* pela captura dos animais em locais contaminados (COTELLE e FERARD, 1999).

Tratamentos *in vitro* de células vermelhas do sangue de linguado (*Pleuronectes cunericanus*) com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) resultaram em aumento da cauda do cometa (NACCI; CAYULA; JACKIM, 1996). MITCHELMORE e CHIPMAN (1998a) trataram hepatócitos de salmão marrom (*Salmo trutta*) agente, obtendo resultados similares.

Considerando experimentos *in situ*, alguns peixes (*Leusciscus cephalus*) foram capturados no rio Ain (França), considerado como ponto referência, e em duas estações do rio Rhone, localizado em uma área industrial. Os peixes capturados no rio Rhone exibiram altos danos de DNA comparados ao ponto referência. Estes altos danos foram relacionados aos altos níveis de cádmio e cromo encontrados nos sedimentos deste rio (DEVAUX et al., 1998).

Vários são os trabalhos *in situ* utilizando diversas espécies de peixes para biomonitoramento através do Ensaio Cometa, alguns são ilustrados na Tabela 1 (COTELLE e FERARD, 1999).

TABELA 1: TRABALHOS *IN SITU* UTILIZANDO PEIXES COMO BIOMONITORES PARA O ENSAIO COMETA.

Espécie	Tipo Celular	Local de coleta	Contaminação	Resposta	Referência
Chub (<i>Leuciscus cephalus</i>)	Eritrócitos	Rio Rhône (França)	Com metais	+	Devaux et al., 1998
Brown bullhead (<i>Ameiurus nebulosus</i>)	Eritrócitos	Port Franks, South Lake Huron, Peche Island Peterborough (Canadá)		-	Pandrangi et al., 1995
Brown bullhead (<i>Ameiurus nebulosus</i>)	Eritrócitos	LaSalle, Big Creek Hamilton Harbour (Canadá)	Com HPAs/BPCs	+	Pandrangi et al., 1995
Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	Eritrócitos	Lago Huron (Canadá)		-	Pandrangi et al., 1995
Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	Eritrócitos	Big Creek (Canadá)	Com HPAs/BPCs	+	Pandrangi et al., 1995
Butterfish (<i>Pholis gunnellus</i>)	Eritrócitos	Firth of Forth (Escócia)	Com metais, hidrocarbonetos e Organoclorados	-	Bombail et al., 2001
Dab (<i>Limanda limanda</i>)	Eritrócitos	Canal English (França)	HPAs	+	Akcha, Hubert e Pfhof-Leszkowics (2002)
Tilápia (<i>Tilapia rendalli</i>)	Eritrócitos	Lago Igapó II (Brasil)	Com esgoto doméstico e industrial	+	Lemos et al., 2005
Trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Eritrócitos	Rio Biobío (Chile)	HPA	+	Inzunza et al., 2005

FONTE: COTELLE e FERARD (1999) modificada pelo autor.

Vários outros estudos demonstram o potencial do Ensaio Cometa para detectar quebras das fitas do DNA em células de peixe, induzidos por uma gama de genotóxicos (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998a; NACCI; CAYULA; JACKIM, 1996; COTELLE e FERARD, 1999; LEE e STEINERT, 2003; KAMMANN et al., 2000).

Quando o teste do micronúcleo e o Ensaio Cometa são realizados juntos em várias espécies de peixes, expostos a um grande número de genotóxicos, os resultados indicam que o teste do micronúcleo é menos sensível que o Ensaio Cometa (MEIER et al., 2002; PETRAS et al., 1995 *apud* LEE e STEINERT, 2003).

1.2.2 TESTE DO MICRONÚCLEO (MN)

Os micronúcleos foram descritos no citoplasma de eritrócitos há mais de um século, e foram chamados de “fragmentos do material nuclear” por Howell ou “corpúsculos intraglobulares” por Jolly; no final do século XIX e início do XX.

Devida esta descoberta, os hematologistas chamavam esta estrutura de “corpúsculo de Howell-Jolly” (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

O primeiro uso do teste do micronúcleo para detectar danos citogenéticos parece ter sido reportado por EVANS et al. (1959) *apud* HEDDLE et al. (1983); ele utilizou a frequência de MN para mensurar dano citogenético induzido em células de raízes de *Vicia faba* por raios nêutrons e gama na presença e ausência de oxigênio. Ele estimou uma frequência de micronúcleos aproximadamente de 60% para as células tratadas. Subseqüentemente, SCHROEDER (1966, 1970) *apud* HEDDLE et al. (1983) recomendou o uso de células da medula óssea para detectar danos causados por mutágenos químicos e demonstrou uma conexão entre frequência de micronúcleos e danos citogenéticos. Em 1973, VON LEDEBUR e SCHMID *apud* HEDDLE et al. (1983), desenvolveram o teste *in vivo* para identificação de corpúsculos de Howell-Jolly em células eritrocitárias policromáticas de medula óssea de ratos; sendo referido o nome, teste do micronúcleo em 1976. Logo depois se iniciou também o uso de células eritrocitárias circulantes para esse teste.

EVANS et al. *apud* KIRSCH-VOLDERS et al. (2003), descobriram em 1959 o amplo uso do micronúcleo como marcador para danos citogenéticos, quando compararam a eficiência de raios nêutrons e gama em raiz de *Vicia faba*. Pouco tempo depois, COUNTRYMAN e HEDDLE *apud* KIRSCH-VOLDERS et al. (2003), introduziram linfócitos como outro sistema celular para detecção de dano cromossômico por produção de micronúcleos.

Na citogenética clássica, cromossomos são estudados diretamente por observação e contagem de aberrações cromossômicas na metáfase. Este estudo produz uma análise mais detalhada, mas a complexidade de enumerar aberrações cromossômicas na metáfase e a possível perda de cromossomos durante a preparação da metáfase, estimulou o desenvolvimento de um sistema mais simples de mensuração de danos cromossômicos (FENECH, 2000).

Entre os testes desenvolvidos para investigar genotoxicidade, o teste micronúcleo tem se provado um sensível indicador de danos cromossômicos e tem sido usado com sucesso em tecidos hematopoiéticos e epiteliais de muitos

organismos (DE LA SIENRAA; ARMIENTAB; GONSEBATTA, 2003). O teste do micronúcleo em medula óssea e sangue periférico é hoje um dos melhores testes de citogenética *in vivo*, para estudos de genotoxicidade; no entanto não é aplicável a qualquer tipo celular, não pode ser usado eficientemente ou quantitativamente em populações celulares que não sofrem divisão ou em células em divisão em que a cinética da divisão celular não é bem compreendida ou controlada (FENECH, 2000).

O teste do micronúcleo é o ensaio *in vitro* mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Os micronúcleos (MN) aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula. Os MN podem, também ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Micronúcleos resultam de lesões no DNA ou cromossomos, ou a nível de proteínas direta ou indiretamente envolvidas na segregação cromossômica (como tubulina, por exemplo). Formação de micronúcleos depende da perda de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros, e requer divisão mitótica ou meiótica (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

Sabe-se que perdas cromossômicas e a não segregação de cromossomos (não disjunção), são importantes eventos no câncer e que eles são causados por defeitos no fuso, centrômero ou como uma consequência da não-condensação da estrutura cromossômica antes da metáfase (FENECH, 2000).

As vantagens do teste do micronúcleo incluem, além da simplicidade e rapidez: (1) MN pode ser observado durante o ciclo celular, e o número de células contáveis é ilimitado; (2) A contagem pode ser feita por qualquer pessoa com pouco

treinamento em citogenética; (3) não é necessário o cariótipo; (4) o MN formado persiste pelo menos até a próxima intérfase; (5) não é necessário nenhum reagente para bloquear o fuso (HEDDLE et al., 1983).

Os MN são muito menores que o núcleo principal, sendo uma proporção de 1/5 até 1/20 do tamanho deste. Em peixes os micronúcleos parecem ser menores que os sugeridos, pois o tamanho de seus cromossomos é menor que em mamíferos, portanto a proporção é de 1/10 até 1/30 do tamanho do núcleo principal (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Para a contagem dos MN, são analisadas entre 1000 a 2000 células, com membranas celulares e nucleares intactas. É possível fazer a contagem de MN por programas computacionais; como o Cytoscan. O Cytoscan é um programa de captura de imagens que não requer a contínua transferência de informação digital do microscópio para o computador, podendo escanear uma área de 10cm² por lâmina em 5 min (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

CARRASCO, TYLBURY E MYERS (1990) *apud* FERRARO et al. (2004), utilizaram, além da contagem dos MN, também a contagem de alterações morfológicas nucleares, classificando-as como: (1) *Blebbbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). Os tamanhos destas evaginações variam de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal, (2) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para *Blebbbed*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas, (3) *Vacuoted*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior, (4) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma, geralmente com uma profundidade apreciável. Estes cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pelo envelope nuclear.

Para CAVAS, GARANKO e ARKHIPCHUK (2005), alterações morfológicas nucleares são indicadores de citotoxicidade e MN de genotoxicidade.

Ocasionalmente pontes entre dois núcleos em uma célula binucleada são observadas. São provocadas, provavelmente, por cromossomos dicêntricos que foram puxados para pólos opostos da célula em divisão, resultando em uma ponte que foi coberta pela membrana nuclear. Estas pontes nucleoplásmicas fornecem uma mensuração de alteração cromossômica e podem ser contadas junto com os micronúcleos (FENECH, 2000).

O teste do micronúcleo é rotineiramente usado como teste padrão durante o primeiro estágio de desenvolvimento de novas drogas farmacêuticas, para identificar possíveis aberrações cromossômicas. Por muitas razões o teste do micronúcleo iniciou-se como uma alternativa para o teste de aberrações cromossômicas – requer menos tempo em laboratório, menos material e menos treinamento (PHELPS; GARRIOTT; HOFFMAN, 2002).

HOOFTMAN e de RAAT (1982) *apud* FERRARO et al. (2004), tomando por base o teste do micronúcleo originalmente desenvolvido em 1975 para células de medula óssea de camundongos, introduziram-no nos estudos de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Esta modificação do teste original passou a ser conhecida como *Piscine Micronucleus Test*, e adotado neste trabalho como *Teste do Micronúcleo Písceo* (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990; *apud* FERRARO et al., 2004).

Até recentemente, testes em peixes para detectar efeitos clastogênicos, que pode incluir alterações de cromátides irmãs (SCE) e aberrações cromossômicas, têm sido dificultados por problemas operacionais. A técnica para obtenção de metáfases não é válida para várias espécies de peixes cujos cariótipos consistem de um grande número de cromossomos pequenos e irregulares (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Muitas espécies de peixes têm se demonstrado como bons bioindicadores para estudos *in situ*, utilizando o teste micronúcleo como biomarcador de genotoxicidade: *Barbus plebejus* (MINISSI; CICCOTTI; RIZZONI, 1996), *Oncorhynchus mykiss* (DE FLORA et al., 1993 *apud* RODRIGUEZ-CEA; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2003), *Carassius sp*, *Zacco platypus*, *Leiognathus nuchalis* e *Ditrema temmincki* (HAYASHI et al., 1998 *apud* RODRIGUEZ-CEA; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2003), *Salmo trutta*

(SANCHEZ-GALAN et al., 1998 *apud* RODRIGUEZ-CEA; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2003).

Vários estudos utilizando eritrócitos periféricos de peixe mostraram aumento da frequência de micronúcleos depois da exposição em laboratório a diferentes poluentes (HOOFTMAN e de RAAT, 1982; AL-SABTI, 1986; DAS e NANDA, 1986; CROSS e HOSE, 1986; HOSE et al., 1987; METCALFE, 1988; AL-SABTI e HARDIG, 1990; AL-SABTI, 1991; HUGHES e HEBERT, 1991; UEDA et al., 1992; SCHULTZ et al., 1993; AL-SABTI et al., 1994; AL-SABTI, 1994, *apud* AL-SABTI e METCALFE, 1995; CESTARI et al., 2004; FERRARO et al., 2004; ALE et al., 2004).

Exposições experimentais (por imersão) a diferentes concentrações de ciclofosfamida, colchicina e cádmio mostraram que o salmão marrom (*Salmo trutta*) foi mais sensível para formação de micronúcleos que *Anguila anguila* e *Phoxinus phoxinus*, demonstrando variações de sensibilidade a genotóxicos em diferentes espécies de peixes (RODRIGUEZ-CEA; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2003).

AL-SABTI et al. (1994) *apud* AL-SABTI e METCALFE (1995); investigaram os efeitos citogenéticos do cromo (Cr [VI]) e Cr [III] em carpa (*Carassius auratus gibelio*) usando o teste micronúcleo em eritrócitos. Quando os peixes foram expostos a 3 doses de cromo (Cr [VI]) e Cr [III], houve um aumento na frequência de micronúcleos em relação à amostra controle.

Recentes pesquisas têm demonstrado ensaios mais sensíveis e seletivos para o teste micronúcleo. O teste de micronúcleo em hepatócitos tem sido desenvolvido com roedores (TATES et al., 1980; BRAITHWAITE e ASHBY, 1988; CLIET et al., 1989 *apud* AL-SABTI e METCALFE, 1995) e parece ser altamente sensível a clastógenos, provavelmente devido aos hepatócitos serem expostos a altas concentrações de químicos durante o metabolismo de xenobiontes.

A formação de micronúcleos em células controle negativo de peixes parece ser mais freqüente que em células de roedores (WILLIAMS e METCALFE, 1992).

Muitos estudos de MN em eritrócitos de peixes têm sido conduzidos *in situ*. Peixes são capturados de um ou mais pontos poluídos e pontos referência. Estes

estudos são muito importantes para estabelecer uma relação entre a exposição a poluentes e a resposta clastogênica (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

AL-SABTI e METCALFE (1995) fazem algumas recomendações para estudos *in situ* com peixes, utilizando o teste do micronúcleo: (1) estabelecer um padrão de tamanho e idade dos exemplares em todos os pontos de coleta; (2) exemplares devem ser coletados em datas próximas; (3) frequência de MN deve ser calculada para cada espécie separadamente; (4) variação devida à movimentação das espécies, genótipo e metabolismo; devem ser consideradas. Outros fatores podem, ainda, interferir na resposta do teste MN como idade, sexo, dieta, saúde e estágio reprodutivo. A diferença na resposta entre os sexos pode se dar devida às diferenças hormonais.

1.3 BIOMARCADORES PARA O MONITORAMENTO DE NEUROTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE

1.3.1 ACETILCOLINESTERASE

A acetilcolina é uma substância neurotransmissora cuja função nas sinapses e na junção neuromuscular tem sido bastante estudada. A magnitude do potencial pós-sináptico parece estar diretamente relacionada à quantidade de acetilcolina liberada. Entretanto, o sistema nervoso não poderia funcionar a menos que a acetilcolina fosse rapidamente removida, pois, caso contrário, ela gradualmente se acumularia e um potencial pós-sináptico contínuo seria mantido. A enzima acetilcolinesterase está presente e é responsável pela hidrólise e, portanto, remoção do neurotransmissor. À medida que diminui a quantidade de substâncias transmissoras, o potencial pós-sináptico geralmente diminui (SCHMIDT-NIELSEN, 1996).

Na transmissão sináptica colinérgica é essencial que a acetilcolina seja degradada rapidamente, antes da chegada de um novo impulso nervoso (STENESH, 1998). Tal reação ocorre mediada pela acetilcolinesterase (AChE). A AChE catalisa a hidrólise da acetilcolina, que é então transformada em colina e acetato, com a liberação de um próton. A hidrólise ocorre tão logo o neurotransmissor tenha cumprido seu papel, ou seja, ligar-se ao receptor nicotínico da membrana pós-sináptica permitindo sua abertura, a entrada de íons Na^{2+} e a despolarização da membrana, o que irá propagar o potencial de ação subsequente. Quando a atividade da AChE é inibida de alguma forma, há um bloqueio na transmissão de impulsos nervosos, o que rapidamente paralisa as funções vitais (STENESH, 1998). Isso ocorre pela sobreposição dos impulsos nervosos, devido à permanência dos canais de Na^{2+} abertos.

Efeitos resultantes da inibição da AChE podem ocorrer no sistema nervoso central ou periférico, autônomo ou somático. Alterações do sistema nervoso autônomo parassimpático (efeito colinérgico pré e pós-ganglionar) são muito comuns em contaminações, quando o xenobionte inibe a AChE. Dentre os

xenobiontes com potencial para a inibição da atividade da acetilcolinesterase, destacam-se os pesticidas organofosforados, carbamatos e alguns metais pesados (STURM; SILVA DE ASSIS; HANSEN, 1999).

1.3.2 HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO

O fígado é a maior glândula em qualquer vertebrado, produz secreção exócrina não enzimática, a bile, que é coletada por um sistema de ductos e liberada no trato digestivo (POUGH; HEISSER; McFARLAND, 1999).

De uma maneira geral o fígado dos peixes é constituído por células do parênquima hepático que são os tipos celulares dominantes e apresentam forma variável, de oval a polígonos irregulares; estão concentricamente arranjados ao redor de capilares sanguíneos (sinusóides) formando os cordões de hepatócitos. Seus núcleos são geralmente esféricos e contêm quantidades variáveis de heterocromatina, dispersa ou periférica a um único núcleo. Os hepatócitos possuem retículo endoplasmático rugoso e liso, aparelho de Golgi e vários tipos de vesículas. Um abundante retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias conferem uma alta atividade metabólica e biosintética. Nos hepatócitos de peixes o retículo endoplasmático rugoso encontra-se, muitas vezes, localizado paralelamente à membrana plasmática. O retículo liso é escasso e localiza-se geralmente na periferia de depósitos de glicogênio ou intercalado com o aparelho de Golgi (HEATH, 1995; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

O fígado possui canalículos biliares que são regiões especializadas da membrana de 2 a 4 hepatócitos justapostos, formando um canal intercelular que recebe bile por secreção celular, esta estrutura é mantida por complexos juncionais, usualmente desmossomos. Os canalículos biliares se juntam para formarem um ducto biliar, delimitado por epitélio cubóide ou colunar e com conjuntivo subjacente; os ductos biliares convergem em um ducto hepático que deixa o fígado e se abre no duodeno, na porção anterior do bulbo intestinal ou alimenta a vesícula biliar, dependendo da espécie de peixe (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

Células mesoteliais formam a membrana serosa que recobre o fígado. O mesotélio é um epitélio simples pavimentoso que recobre as vísceras e no fígado constitui-se de uma extensão do peritônio (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995; FERGUSON, 1989).

De acordo com HINTON e LAUREM (1990), existem muitas razões para selecionar o fígado como um importante órgão em estudos de toxicologia. O fígado é o primeiro órgão a atuar na biotransformação de xenobiontes e excreção de alguns metais pesados; atua na estocagem de carboidratos (glicogênio) e, especialmente em peixes, acumulam lipídeos.

1.4 ASPECTOS ECOLÓGICOS DE *Geophagus brasiliensis*

A família Cichlidae é um dos maiores grupos de peixes teleósteos, compreendendo cerca de 1400 espécies, a grande maioria de habitat dulceaquícola, sendo poucas as encontradas em ambiente salobre (KULLANDER e NIJSSEN, 1989 *apud* LOUREIRO, 1999).

Geophagus brasiliensis (acará) é um ciclídio, muito comum em lagos e reservatórios da região Central e Sul do Brasil (SCHWANTES; BARTLETI; SCHWANTES, 1991).

É uma espécie abundante no período de verão, em ambientes de fundos lodosos, com reprodução entre final de verão e início de outono (ROLLA et al., 2003).

Os ciclídios são representados por peixes muito versáteis, territorialistas e resistentes, com predileção por ambientes lênticos, principalmente lagos e lagoas (FATTORI et al., 1997 *apud* ABILHOA e DA SILVA, 2003). Quanto à alimentação, possuem hábitos muito diversificados, podendo se alimentar do lodo depositado no fundo, de peixes, gastrópodos, tecamebas, microcrustáceos e larvas de insetos (SABINO e CASTRO 1990; ANDREATA e TENÓRIO, 1997; CAMARA et al., 1988; BARBIERI et al., 2000 *apud* ABILHOA e DA SILVA, 2003).

CALZA et al. (2004), avaliou níveis de metais pesados em músculo, gônadas e brânquias de *Geophagus brasiliensis* capturados no rio Paraíba do Sul; sendo identificados em seus tecidos os seguintes metais: Titânio, Cromo, Manganês, Ferro, Cobalto, Cobre, Zinco, Rubídio, Estrôncio, Bário, e Chumbo. As brânquias são o tecido com maior nível de metais, provavelmente devido a seu contato direto com a água, demonstrando assim, a alta capacidade de biocumulação desta espécie.

SILVANO (2003) verificou concentrações de Cromo, Manganês, Níquel, Zinco e Ferro na água e no sedimento da Lagoa Azul, em Siderópolis (SC); região altamente contaminada pela extração contínua de carvão. Estes metais, exceto o Ferro, foram também analisados no músculo e no fígado das espécies dos peixes *Oreochromis niloticus* (tilápia) e *Geophagus brasiliensis* (acará). As análises do

sedimento, quando comparadas a locais não contaminados, indicaram concentração elevada para Ferro, Manganês, Cromo e Zinco. O conteúdo de metais em peixes não apresentou diferença entre as espécies analisadas, todavia entre os diferentes tecidos analisados, o fígado apresentou a maior concentração em ambas as espécies. Através das análises do músculo (parte comestível), foi avaliado o risco à saúde humana. Segundo a estimativa da ingestão diária, os peixes analisados não propiciaram risco aparente de contaminação à população do entorno.

Apesar de não ter encontrado nenhuma informação sobre o uso da espécie *Geophagus brasiliensis* como bioindicador para os biomarcadores utilizados, o motivo por utilizá-la neste trabalho é explicado por ser uma espécie endêmica e de fácil captura, além de levar em conta sua alimentação constituída também por sedimento, onde muitos químicos se depositam e podem interagir com o DNA.

1.5 SULFATO DE COBRE

O cobre é altamente tóxico em peixes, sendo muitas vezes utilizado como peixeicida. Em peixes provoca aumento da respiração mitocondrial, diminui as respostas a estimulações adrenérgicas, acidificação intracelular e o mais importante, reduz a viabilidade celular (MANZL et al., 2004).

Em galinhas foi confirmado o potencial genotóxico do Sulfato de cobre através dos testes de aberrações cromossômicas e micronúcleo (BHUNYA e JENA, 1996). Já em peixes, os efeitos do sulfato de cobre têm sido bastante estudados, e sabe-se que algumas espécies são mais susceptíveis que outras (CARVALHO e FERNANDES, 2005).

Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar como o Cobre induz a toxicidade celular. A base das teorias é que íons livres de cobre participam na formação de espécies reativas de oxigênio. Essa formação é explicada pela reação de Haber-Weiss (GAETKE e CHOW, 2003).

Muitas pesquisas com estudos *in vitro* e com culturas de células afirmam a capacidade do cobre de iniciar danos oxidativos além de peroxidação de membranas lipídicas, interferindo em importantes eventos celulares (KRUMSCHANABEL et al., 2005; GAETKE e CHOW, 2003)

2 OBJETIVOS

- Monitorar a qualidade das águas das Lagoas estuarinas do Camacho (Jaguaruna – SC) e Santa Marta (Laguna – SC), bem como do Parque Ecológico Costa (Curitiba – PR) utilizando como bioindicador *Geophagus brasiliensis*.
- Comparar a contaminação sazonal das áreas acima citadas através dos biomarcadores de:
 - Genotoxicidade, utilizando o Ensaio Cometa em hemácias periféricas e células renais; e do teste do micronúcleo (MN) em hemácias periféricas;
 - Neurotoxicidade, através da determinação da atividade da acetilcolinesterase no músculo axial.
 - Citotoxicidade, por análises histopatológicas em fígado, utilizando técnicas de microscopia de luz.
- Avaliar a sensibilidade da espécie *Geophagus brasiliensis* como bioindicador.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETAS

Os organismos utilizados como bioindicadores foram peixes da espécie *Geophagus brasiliensis*, popularmente conhecido como cará ou acará (Figura 1).

FIGURA 1 – *Geophagus brasiliensis*



Os exemplares foram coletados em três pontos previamente estabelecidos nas Lagoas estuarinas de Laguna e Jaguaruna (SC) e um Ponto Referência (controle negativo) no Parque Ecológico Costa em Curitiba (PR). Em Laguna e Jaguaruna, foram realizadas coletas em novembro/2004, junho/2005 e novembro/2005, com auxílio de tarrafas, sendo coletados 30 animais em cada um dos pontos. Na coleta de novembro/2004 os peixes foram mantidos vivos em caixas de isopor com água do local e aeração. Em seguida foram transportados até a UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense (Criciúma/SC – aproximadamente 100 km do local de coleta), onde foram estudados. Em junho/2005 e novembro/2005 os animais foram processados em Jaguaruna, em uma estação laboratório montada em uma casa próxima à Lagoa do Camacho. Em Curitiba, no Parque Ecológico Costa, foram realizadas coletas em janeiro/2005 e julho/2005, com 30 exemplares em cada uma delas. As coletas foram realizadas com auxílio de rede de arrasto. Os peixes foram mantidos em isopor com água do local e aeração, e em seguida transportados até o Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental - UFPR.

O material para a análise da acetilcolinesterase e histopatologia foi processado no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia e no Laboratório de Toxicologia Celular do Departamento de Biologia Celular da UFPR, respectivamente.

3.2 LOCAIS DE COLETA

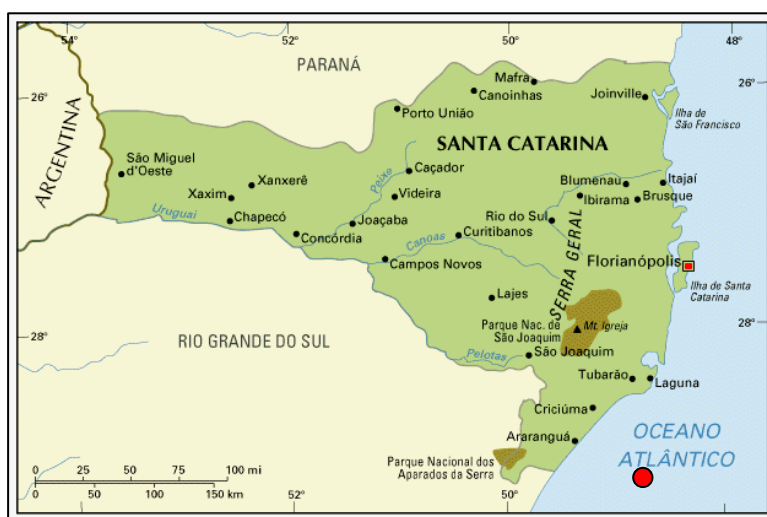
3.2.1 Parque Ecológico Costa

Situado à Rua Nicola Pelanda s/nº no bairro Umbará, em Curitiba, possui um milhão e quinhentos mil metros quadrados. Foi uma área de extração de areia, mas um projeto de recuperação o transformou em um abrigo natural para um grande grupo de espécies animais e vegetais, além de oferecer um pesque-pague. Através de um levantamento histórico feito no local e sem obter relatos de contaminação no local, este se tornou um ambiente apto para ser usado como Ponto Referência.

3.2.2 Laguna (SC)

Situado na Região Sul do Estado de Santa Catarina. Apresenta latitude de 28º 28' 54" ao Sul e longitude 48º 46'56" à W de Greenwich e altitude média de 4 metros. Encontra-se a 410 Km de Curitiba e 110 Km de Florianópolis (Figura 2).

FIGURA 2 - MAPA DE SANTA CATARINA INDICANDO A CIDADE DE LAGUNA.



FONTE: Governo de Santa Catarina.

No município de Laguna a principal bacia fluvial é a do Rio Tubarão, o qual é altamente contaminado devido à extração do carvão, que foi à base da

economia dos municípios da região por mais de 80 anos. Durante todo esse tempo, o carvão retirado do solo era lavado no local e os dejetos lançados no rio. Os lavadores, hoje desativados, são a prova de que ali começava a agressão ao meio ambiente. Há cerca de oito anos a atividade de extração do carvão está parada, mas mesmo assim a agressão continua. As minas eram abertas na encosta do Tubarão, e ainda hoje, sempre que chove, a água passa pelos aterros com rejeito de carvão e despeja nos rios resíduos altamente poluidores. A margem é escura e as pedras amareladas têm aspecto enferrujado, graças à grande concentração de enxofre e minério de ferro existente no local.

No Delta do Rio Tubarão os principais rios são: Rio Sambaqui Pequeno, Sambaqui, da Carniça, da Madre, Canal da Jaguaruna e Rio do Meio. Outras pequenas bacias se localizam a oeste das Lagoas do Santo Antônio e Imaruí, são de rios poucos extensos e encachoeirados. Os principais rios são: Rio Carreira do Siqueiro, Ribeirão da Pescaria Brava, rio Parobé, Ribeirão Pequeno, Ribeirão Grande e rio Taquaruçu. Todos os rios deságuam nas lagoas estuarinas.

As lagoas ligam-se ao Oceano através da Lagoa de Santo Antônio, pelo Molhe da Barra e pela Lagoa do Camacho (já em Jaguaruna). Possuem salinidade variável devido à interligação e à distância do mar (Figura 3). São elas: Mirim, Imaruí, Santo Antônio, Santa Marta, Camacho, Garopaba do Sul, Manteiga e Ribeirão Grande. Há por todas as áreas inúmeros canais de irrigação e drenagem para a agricultura e pecuária. As lagoas são de grande importância econômica pela quantidade de peixes e camarão que produzem, beneficiando dez mil pescadores artesanais.

A partir de 1998 teve início, na zona costeira sul-catarinense, junto ao Complexo Lagunar, uma nova forma de uso e ocupação do espaço físico. Trata-se do cultivo intensivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, espécie introduzida dos mares do Oceano Pacífico. A implantação acelerada desta atividade econômica exige a destruição das paisagens e dos ecossistemas associados, trazendo consigo a redução da biodiversidade (RASGAMAR, 2005).

Outro aspecto importante quanto à preservação e estudos toxicológicos nesta região é a presença do Aquífero do Cabo com água doce e potável, escondido

sob uma extensa faixa de areia quartzosa fina. De maneira grosseira, o Aquífero possui formato alongado na direção SW/NE, partindo do Oeste do Costão da Ilhota e convergindo próximo ao Canal da Barra da Lagoa do Camacho. É balizado a oeste, pelas águas mixoalinas das Lagoas do Camacho e Santa Marta e pelo Aquífero de Campos Verdes, já comprometido pela Carcinocultura (cultivo de camarão). À leste faz divisa com o Oceano Atlântico (RASGAMAR, 2005).

As amostras foram coletadas nas Lagoas de Santa Marta (P1 – Ponto mais próximo à saída do Rio Tubarão, tendo ainda cultivos de camarão e arroz em seu entorno), e do Camacho (em dois pontos, P2 – Próximo à Barra do Camacho, com cultivos de camarão em seu entorno; e P3 – Canto Esquerdo da Lagoa, com saídas de esgoto doméstico, cultivos de camarão, sendo o ponto mais distante a saída do Rio Tubarão).

FIGURA 3 - IMAGEM DE SATÉLITE DAS LAGOAS ESTUARINAS DE LAGUNA E JAGUARUNA (SC); SETAS INDICAM PONTOS DE COLETA.



FONTE: NASA WORLD WIND 2005

3.3 METODOLOGIA

Um controle positivo foi criado em laboratório com 66 animais coletados em julho/2005 no Ponto Referência. Foram aclimatados por 7 dias distribuídos em 3 aquários, sendo 22 animais em cada aquário. Após aclimatação, foi diluído na água dos aquários 3 concentrações crescentes de Sulfato de Cobre (CuSO_4): CI 1×10^{-5} , CII $4,3 \times 10^{-5}$ e CIII 10^{-4} g/l. Os animais foram coletados após 72 horas de exposição ao Sulfato de Cobre.

Antes da morte dos animais, estes foram anestesiados com MS 222 (Sal metanosulfonato éster etil ácido 3-aminobenzóico) a 0,02%, dissolvido em água. Os tecidos utilizados foram: sangue periférico, rim, fígado e músculo. O sangue periférico foi coletado com auxílio de micro capilares heparinizados e armazenado em tubo de microcentrífuga do tipo ependorffe ao abrigo da luz, em isopor com gelo para posterior processamento do ensaio cometa. Foram retirados ainda o rim posterior, armazenado em tubo de microcentrífuga do tipo ependorffe (ao abrigo de luz, em isopor com gelo) contendo tampão de homogeneização (Tris-HCl MM=121,10 g/mol / Sacarose MM=342,30g/mol) para posterior processamento do ensaio cometa; fígado, armazenado em pequenos frascos contendo 10ml de solução fixadora Alfac para posterior preparação das lâminas para histopatologia; e músculo, armazenado em ependorffe (mantido em freezer) para posterior análise de atividade da acetilcolinesterase.

3.3.1 Teste do Micronúcleo Písceo

Para o teste do micronúcleo (MN) foi utilizado o protocolo descrito por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975) *apud* FERRARO (2003), com algumas modificações. A técnica consiste nas seguintes etapas:

- Após a coleta de sangue do peixe, uma gota de sangue foi pingada em lâmina bem limpa.
- Com auxílio de outra lâmina foi feito o esfregaço, o qual secou em temperatura ambiente.

- Após secar as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 20 min. Após, o material foi levado para a UFPR, onde as lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 6.8), por 10 min.
- As lâminas foram analisadas em teste cego contando-se 2.000 células por animal. Só foram consideradas para análise hemácias nucleadas com membrana citoplasmática intacta.
- Foram também consideradas alterações na forma dos núcleos das hemácias, conforme descrito por CARRASCO, TYLBURY e MYERS (1990) *apud* FERRARO (2003).

3.3.2 Ensaio Cometa

Para o Ensaio Cometa foram utilizadas células de sangue periférico e células renais, as quais foram preparadas da seguinte maneira:

a) Preparo do Sangue Periférico:

- Após a coleta o sangue total de cada animal foi mantido em gelo e protegido da luz.
- Foram coletados 10 μ l de sangue de cada tubo e misturados com 1ml de soro bovino fetal.

b) Preparo da suspensão celular de rim:

- Após a coleta do rim posterior este foi armazenado em tampão de homogeneização (Tris-HCl MM=121,10 g/mol / Sacarose MM=342,30g/mol) e colocado em gelo, protegendo da luz.
- Foi feita a homogeneização em homogeneizador Potter-Elvehjem 1500 rpm por 30s.
- Do homogeneizado obtido, foram coletados em ependorffes (usando pipetador) porções com a menor quantidade de material sólido possível.

Após o preparo do material celular, foi feito o processamento de acordo como protocolo descrito por SINGH et al. (1988), com algumas modificações de acordo com as seguintes etapas:

- Foram coletados 10µl da suspensão celular (tanto para sangue periférico + soro, quanto para células renais), e misturados gentilmente com agarose de baixo ponto de fusão (LMP-Low Melting Point). Esta suspensão foi depositada sob uma lâmina previamente preparada com agarose normal, e coberta com lamínula. Sendo mantida em geladeira por 10 min.

1. Preparo das lâminas com agarose normal:

Dissolveu-se a agarose normal (1.5g em 100ml de PBS) em um Erlenmeyer, deixando agitar por duas horas. Esta mistura foi fervida em microondas por cerca de 45s e agitada até a sua dissolução total. A agarose foi deixada para solidificar em temperatura ambiente. Após a solidificação, esta agarose foi totalmente picada e novamente levada para ferver em microondas. Esta etapa foi repetida mais uma vez. Após, a agarose foi mantida em banho maria 70°C. As lâminas, previamente limpas, foram mergulhadas na agarose quente e retiradas vagorosamente. Um dos lados da lâmina foi limpo com lenço de papel. Estas foram deixadas para secar overnight, para solidificar e depois foram guardadas em geladeira.

2. Preparo da agarose LMP:

Misturou-se 100mg de agarose LMP em 20 ml de PBS. Após a agitação, foi necessária apenas uma fervura em microondas. Para usá-la, esta foi mantida em banho maria 37°C.

- Após os 10 min em geladeira, as lamínulas foram retiradas gentilmente.

- As lâminas foram colocadas em cubetas porta-lâminas, com solução de lise previamente refrigerada (4°C) e foram mantidas no escuro, em geladeira por 1h.

- Após o tempo de lise, as lâminas foram retiradas da cubeta e transferidas para uma cuba de eletroforese, horizontal, preenchendo todos os espaços vazios; quando necessário estes espaços foram preenchidos com lâminas limpas.

- A cuba foi colocada em uma caixa plástica, a qual estava preenchida com gelo; para manter o material a $\pm 4^\circ\text{C}$.

- Na cuba de eletroforese foi adicionada solução de eletroforese (pH >13), de maneira que cobriu todas as lâminas. As lâminas foram mantidas nesta solução por 25 min, para permitir a desespiralização do DNA.
- Passado este tempo, iniciou-se a corrida de eletroforese a 25 V e 300 mA, por 25 min.
- Todo procedimento até aqui foi realizado protegido de luz, para evitar danos adicionais ao DNA.
- Após a eletroforese as lâminas foram gentilmente retiradas e neutralizadas com 5 ml de solução neutralizadora. Esta solução foi colocada diretamente sobre a lâmina em posição horizontal e deixada por 5 min, repetindo o procedimento por mais duas vezes.
- As lâminas foram colocadas para secar em temperatura ambiente, em posição inclinada.
- Após a secagem, as lâminas foram fixadas com etanol por 5 min.
- Para a coloração foram adicionados 30 µl de brometo de etídio em cada lâmina e cobertas com lamínulas.
- As lâminas foram analisadas com aumento de 400x em microscópio de epifluorescência equipado com filtro de excitação de 515 – 560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. Foram analisadas 100 células por lâmina em teste cego.
- A avaliação foi feita visualmente de acordo com o comprimento da cauda em cinco classes: 0 – sem dano aparente; 1- dano pequeno; 2 – dano médio; 3 – dano máximo e 4 – apoptose. Para cada lâmina foram atribuídos escores, multiplicando-se o número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

3.3.3 Atividade da Acetilcolinesterase

Após a extração do tecido e manutenção deste em freezer (-20°C); este foi levado em gelo para UFPR, onde foi processado.

- O material foi pesado (100mg) e homogeneizado em 2.0 ml de tampão fosfato (0.1M, pH 7.5) utilizando homogeneizador Potter-Elvehjem.

- O homogenado centrifugado por 10 min à 10.000 x g à 4° C.
- O sobrenadante foi diluído (1:5), e 50 µl desta diluição foi pipetada em microplaca, seguido de 200µl de DTNB (5,5-Ditio-bi8-2-nitrobenzoato) e 50µl de iodeto de acetil-β-(metil) tiocolina (9mM), segundo o método de ELLMAN et al. (1961), modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1998).
 - A leitura foi realizada em leitor de microplaca SLT 340 ATTC no comprimento de onda de 415nm, imediatamente após a adição de 50µl de acetiltiocolina.
 - A concentração de proteínas foi medida pelo método de BRADFORD (1976) modificado, consistindo na adição de 10µl da amostra em microplaca e posterior adição de 250 µl de reagente de Bradford, resultando em uma reação azul, que foi lida espectrofotometricamente em 595 nm.

3.3.4 HISTOPATOLOGIA

Após serem fixados em Alfac por 16h (85ml de álcool 80%, 10ml de formol 40% e 5ml de ácido acético glacial), o material foi lavado 2 vezes em álcool 70% e mantido no mesmo até o início da sua preparação na UFPR.

- Desidratação: Foi realizada pela troca sucessiva de soluções crescentes de álcool, com o material.
 - Álcool 80% por 1:30 hora
 - Álcool 90% por 1:30 hora
 - Álcool 95% por 1:30 hora
 - Álcool 100% por 30 minutos, 3 vezes.
- Diafanização: Foi realizada a troca do álcool pelo xilol, consistindo três etapas:
 - Xilol + álcool 1:1 por 1 hora
 - Xilol puro por 1 hora
 - Xilol puro por 15 min, podendo variar dependendo do tamanho da peça.

- Inclusão: Esta etapa foi realizada dentro de estufa. A parafina foi colocada um dia antes em estufa 56°C, para tornar-se líquida.
- Emblocagem: Com auxílio de uma pinça aquecida em chama, o material foi mergulhado em parafina no centro da forma, observando a posição correta para posterior corte.
- Corte: o bloco foi trimado e levado ao micrótomo, obtendo-se cortes de 5µm de espessura. Estes foram distendidos sobre lâminas cobertas com albumina 1%, e deixados em estufa por 15 min a 45°C.
- Desparafinização: As lâminas foram mergulhadas em 2 banhos sucessivos de xilol por 5 min cada.
- Hidratação: as lâminas foram lavadas em uma série decrescente de álcool.
 - Álcool 100%, 3 vezes por 5 min cada
 - Álcool 90% por 5 min
 - Álcool 70% por 5 min
 - Álcool 50% por 5 min
 - Água destilada
- Coloração: Foi utilizada a coloração em H.E. (hematoxilina alcoólica 10%, alúmen de potássio e 1g de óxido de Hg vermelho).

A análise foi feita em microscópio de luz, e as lesões quantificadas em índices segundo protocolo de BERNET, et al. (1999) e também por Tabela de Ocorrência. Foram contabilizados ainda Centros de Melanomacrófagos e Melanomacrófagos Livres por mm², com auxílio de ocular quadriculada segundo MELA (2004).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas para o teste do micronúcleo foram efetuadas pelo Teste de Kruskal-Wallis, para 2000 células por peixe.

Para o Ensaio Cometa foi aplicado o teste de Kruskal – Wallis, comparando os grupos simultaneamente. Foram analisadas 100 células por peixe.

Para análise da atividade da acetilcolinesterase, foi utilizado a ANOVA para Experimento Inteiramente Aleatorizado, seguido de Teste t.

Para contagem de Centro de Melanomacrófagos e Melanomacrófagos Livres foi utilizado Teste de Kruskal-Wallis.

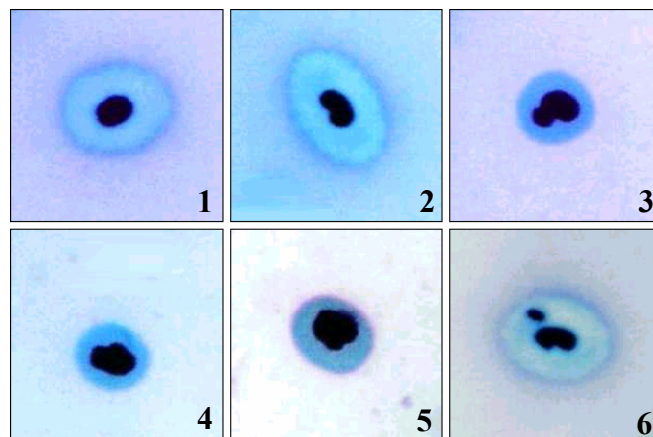
Para análise histopatológica, após o cálculo do índice de Bernet, foi utilizado Teste de Kruskal-Wallis. Para a Tabela de Ocorrência foi utilizado Teste do Qui-Quadrado.

4 RESULTADOS

4.1 FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS PÍSCIO (MNP) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN)

Foram analisadas 2.000 células com membrana celular intacta, por exemplar, em cada uma das coletas. Foram utilizadas para contagem de MNP e AMN as coletas de Novembro/2004, Junho/2005 e Novembro/2005 das Lagoas do Camacho e Santa Marta, de Janeiro/2005 (RF1) e Julho/2005 (RF2) do Parque Ecológico Costa (Ponto Referência), e as Concentrações I e II do Controle Positivo, pois os animais da Concentração III (10^{-4} g/l) morreram em 24h de exposição ao Sulfato de Cobre, impossibilitando a contagem das células. Foram contabilizados tanto presença de micronúcleos quanto alterações morfológicas nucleares (Figura 4). A soma dos resultados de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares foi analisada pelo Teste de Kruskal-Wallis.

FIGURA 4: IMAGEM DE CÉLULA SEM ALTERAÇÃO (1), ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA NUCLEAR (2, 3, 4 e 5) E MICRONÚCLEO (6).



4.1.1 Coleta Parque Ecológico Costa (Ponto Referência)

Foram analisadas um total de 120.000 células, sendo 60.000 em cada uma das coletas (Jan/2005 e Jul/2005). Foram encontradas um total de 31 células alteradas, sendo 6 na coleta de Jan/2005 e 25 na coleta de Jul/2005 (Apêndice 1). Não foi encontrada diferença entre as duas coletas ($p= 0,10$).

4.1.2 Controle Positivo

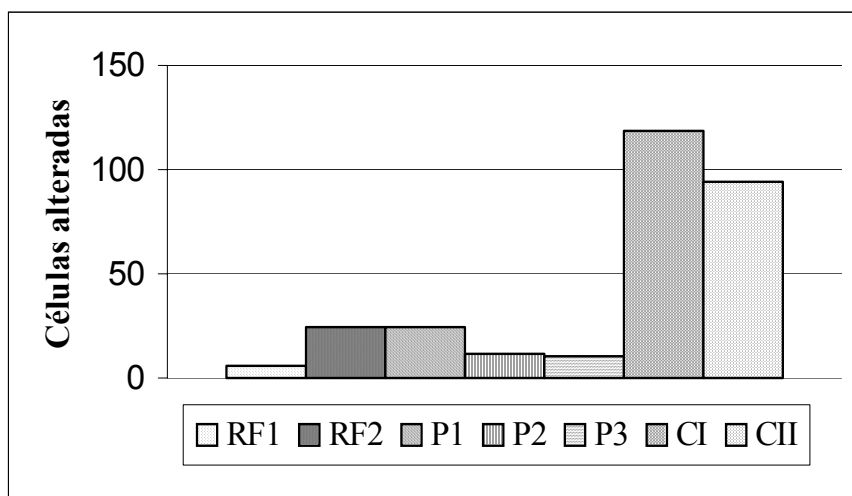
Foram analisadas um total de 84.000 células, sendo 44.000 na Concentração I (CI) e 40.000 na Concentração II (CII). Na CII 2 exemplares morreram em 24h. Foram encontradas após 72h de exposição ao Sulfato de Cobre um total de 119 células alteradas em CI e 94 em CII (Apêndice 1). Não foi encontrada diferença entre as concentrações ($p= 0,82$).

4.1.3 Coleta de Novembro/2004

Foram analisadas um total de 178.000 células (89 peixes), sendo 60.000 células em cada um dos pontos 2 e 3 e 58.000 no Ponto 1, do qual um dos exemplares não possuía o número suficiente de células para contagem.

Foram observadas 25 células alteradas na Lagoa de Santa Marta (P1), 12 no Ponto 2 (P2) e 11 no Ponto 3 (P3) da Lagoa do Camacho (Apêndice 1). Não foi encontrada diferença entre os pontos ($p> 0,30$).

FIGURA 5: FREQUÊNCIA DE MNP E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS NA COLETA DE NOVEMBRO/2004 (P1, P2 e P3), EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA (RF1 e RF2) E CONTROLE POSITIVO.



Considerando-se a soma do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares encontradas em cada um dos animais dos grupos coletados nos Pontos 1, 2, 3 e nos Pontos Referência RF1 e RF2 (Figura 5), não se evidenciou diferenças entre os grupos ($P > 0,15$).

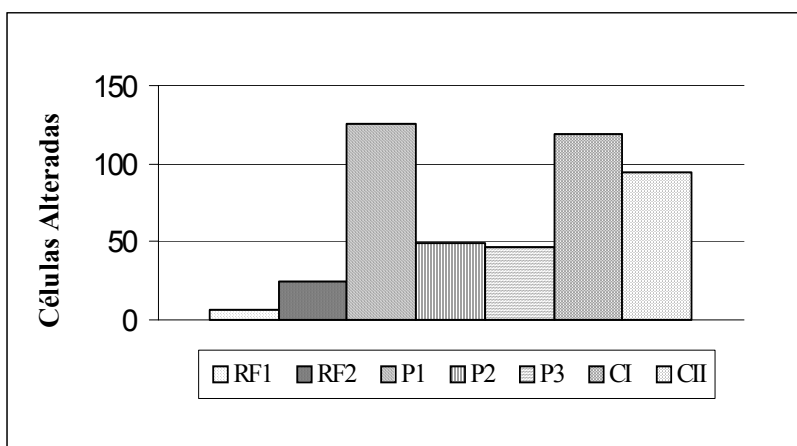
Quando comparados os Pontos 1, 2 e 3 com CI e CII do controle positivo, foi encontrada diferença entre os grupos ($p < 0,02$).

4.1.4 Coleta de Junho/2005

Foram analisadas um total de 156.000 células (78 peixes), sendo 56.000 células em P1, 52000 em P2 e 48000 em P3. Embora tenham sido coletados 30 exemplares em cada ponto, 12 não possuíram o número suficiente de células para contagem.

Foram observadas 125 células alteradas na Lagoa de Santa Marta (P1), 49 em P2 e 46 em P3 da Lagoa do Camacho (Apêndice 1). P1 apresentou mais células alteradas do que P2 ($p = 0,0007$) e P3 ($p = 0,016$). Não houve diferença entre P2 e P3 (Figura 6).

FIGURA 6: FREQUÊNCIA DE MN E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS NA COLETA DE JUNHO/2005, EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA E CONTROLE POSITIVO.



Considerando-se a soma do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares encontradas em cada um dos peixes dos grupos, quando comparados aos Pontos Referências não se evidenciou diferenças entre P2 e RF2 ($p= 0,54$), P3 e RF2 ($p= 0,37$). Foram encontradas diferenças entre P1 e RF1 ($p< 0,0001$), P1 e RF2 ($p= 0,0009$), entre P2 e RF1 ($p= 0,02$), e entre P3 e RF1 ($p= 0,01$).

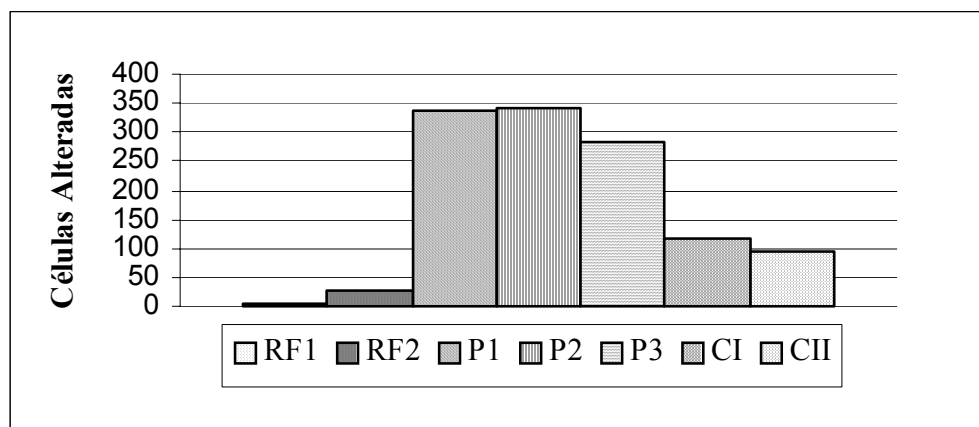
Quando comparados os Pontos 1, 2 e 3 com CI e CII do controle positivo, não foram encontradas diferença entre P1 e CI ($p= 0,63$), P1 e CII ($p= 0,48$), P2 e CII ($p= 0,09$), P3 e CI ($p= 0,08$), e P3 e CII ($p= 0,15$). Houve diferença apenas entre P2 e CI ($p= 0,045$).

4.1.5 Coleta de Novembro/2005

Foram analisadas um total de 178.000 células (89 peixes), sendo 60.000 em P1 e P3, e 58.000 em P2.

Foram observadas 337 células alteradas em P1 na Lagoa de Santa Marta, 341 em P2 e 285 em P3 da Lagoa do Camacho (Apêndice 1). Não foram encontradas diferenças entre eles ($p> 0,40$).

FIGURA 7: FREQUÊNCIA DE MNP E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS NA COLETA DE NOVEMBRO/2005 (P1, P2 e P3), EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA (RF1 e RF2) E CONTROLE POSITIVO (CI e CII).

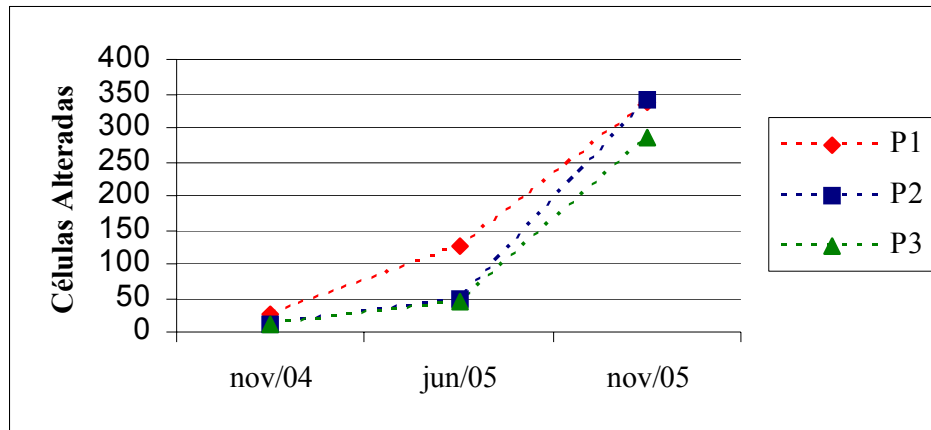


Para o Teste de Kruskal-Wallis, considerando-se a soma do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares encontradas em cada um dos peixes dos grupos, quando comparados aos Pontos Referências (Figura 7) foram encontradas diferenças entre todos os grupos, ($p < 0,0001$ em todos os contrastes) sendo o número de células alteradas maior em todos os pontos (P1, P2 e P3) que em RF1 e RF2. Quando comparados os Pontos 1, 2 e 3 com CI e CII do controle positivo, foram encontradas diferença entre todos os pontos ($p = 0,0007$ entre CI e P1, $p = 0,003$ entre CI e P2, $p = 0,007$ entre CI e P3, $p = 0,0005$ entre CII e P1, $p = 0,002$ entre CII e P2, $p = 0,005$ entre CII e P3).

4.1.6 Contraste entre as coletas

A Figura 8 demonstra graficamente os resultados totais de células com alterações encontradas nos pontos 1, 2 e 3 das coletas de Novembro/2004, Junho/2005 e Novembro/2005.

FIGURA 8: FREQUÊNCIA DE MN E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS ENTRE AS COLETAS.



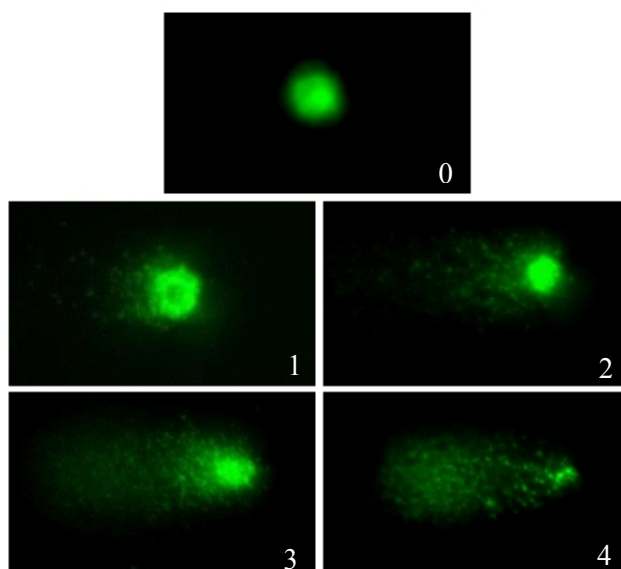
Quando comparados os Pontos (P1, P2 e P3) nas diferentes coletas, não foi encontrada diferença apenas para P2 da coleta de nov/04 e jun/05 ($p= 0,07$). Entre todos os outros pontos houve diferença em relação a todas as coletas ($p< 0,04$).

4.2 ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS

Foram utilizadas para o Ensaio Cometa de células sanguíneas as coletas de Novembro/2004, Junho/2005 e Novembro/2005 das Lagoas do Camacho (P2 e P3) e Santa Marta (P1), de Janeiro/2005 (RF1) e Julho/2005 (RF2) do Parque Ecológico Costa (Ponto Referência), e as Concentrações I, II e III do Controle Positivo, sendo atribuído escore máximo (400) a cada um dos animais que morreram durante a exposição ao Sulfato de Cobre, devido à toxicidade máxima (Apêndice 2).

Foram analisadas 100 células (nucleóides) de cada indivíduo utilizado no experimento, as quais foram classificadas individualmente em quatro classes de cometa de acordo com o tipo de dano identificado (dano 0 a dano 4) (Figura 9). Foi empregado o Teste de Kruskal-Wallis a partir dos escores calculados. Os escores são calculados multiplicando-se o número de nucleóides encontrados pela classe do tipo de dano identificado em cada exemplar. Esses escores são indicados como índices de dano.

FIGURA 9 – IMAGEM CAPTURADA DE COMETAS EM ERITRÓCITOS INDICANDO AS CLASSES 0, 1, 2, 3 E 4.



4.2.1 Coleta Parque Ecológico Costa (Ponto Referência)

Foram analisadas um total de 5800 células (nucleóides) (58 peixes) no grupo coletado no Ponto Referência, distribuídas em 2900 células em cada uma das duas coletas. Os escores e medianas das coletas de janeiro/2005 (RF1) e julho/2005 (RF2) estão colocadas na Tabela 2.

TABELA 2: ESCORES E MEDIANAS OBTIDAS EM ERITRÓCITOS NO PONTO REFERÊNCIA.

	JANEIRO/2005	JULHO/2005
Soma dos Escores	1334	2879
Mediana dos Escores	42	101

Quando comparados os escores entre as duas coletas do Ponto Referência (RF1 e RF2), não houve diferença entre eles ($p=0,12$), apesar de se verificar que a mediana dos escores em julho foi maior do que a de janeiro.

4.2.2 Controle Positivo

Foram analisadas um total de 3900 células (nucleóides) (39 peixes) no grupo Controle Positivo, distribuídas em 2100 células na CI (21 peixes), e 1800 na CII (18 peixes). Foi atribuído escore máximo (400) a 3 animais na CII, e aos 22 da CIII, que morreram em 24h de exposição ao Sulfato de Cobre. Os escores e medianas das concentrações I, II e III do controle positivo estão colocadas na Tabela 3.

TABELA 3: ESCORES E MEDIANAS OBTIDAS EM ERITRÓCITOS NO CONTROLE POSITIVO.

	CI	CII	CIII
Soma dos Escores	5154	5513	8800
Mediana dos Escores	247	254	400

Ao comparar os escores entre as concentrações do controle positivo não houve diferença entre a CI e CII ($p= 0,59$), mas entre a CIII e as demais houve diferença ($p< 0,0001$). Isto foi devido a CIII ter recebido escores máximos, pela morte dos peixes.

4.2.3 Coleta Novembro de 2004

Foram analisadas 100 células (nucleóides) (88 peixes) de cada indivíduo utilizado no experimento, perfazendo um total de 8800 células nos pontos. Em P1 foram analisadas 3000 células (30 peixes), em P2 e P3 2900 (29 peixes) para cada um deles. Os escores e medianas dos escores da coleta de novembro/2004 estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4: ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM ERITRÓCITOS NOS PONTOS DE COLETA (NOVEMBRO/2004).

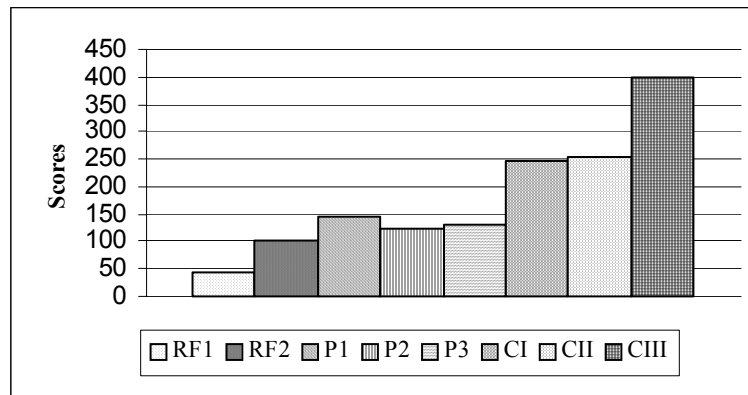
	PONTO 1	PONTO 2	PONTO 3
Soma dos Escores	4419	3847	3547
Mediana dos Escores	143.5	125	130

Quando comparados os escores entre os pontos de coleta não foi encontrada diferença entre eles ($p> 0,33$).

Ao comparar os pontos P1, P2 e P3 com RF1 e RF2 verifica-se que no mês de janeiro as diferenças foram: P1 x RF1, $p= 0,0006$; P2 x RF1, $p= 0,006$; P3 x RF1, $p= 0,035$. Em oposição a estes resultados, os pontos P1, P2 e P3 ao serem contrastados com RF2 nenhuma diferença foi encontrada, com $p= 0,585$, $p= 0,2246$ e $p= 0,3627$, respectivamente.

Já os controles positivos (CI, CII e CIII), ao serem contrastados com P1, P2 e P3, mostraram diferenças ($p< 0,01$), pois CI, CII e CIII apresentaram maiores danos (Figura 10).

FIGURA 10: MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE *Geophagus brasiliensis* - NOVEMBRO/2004 EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA (RF1 e RF2) E CONTROLE POSITIVO (CI, CII e CIII).



4.2.4 Coleta Junho/2005

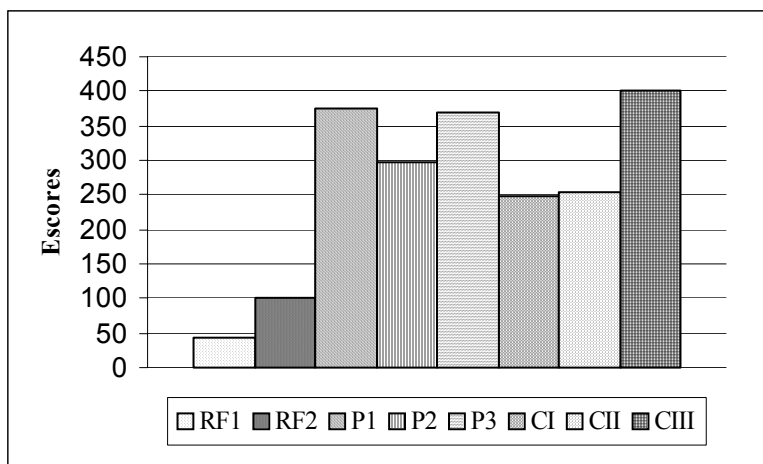
Foram analisadas 100 células (nucleóides) de cada indivíduo utilizado no experimento, perfazendo um total de 8700 células (87 peixes) nos pontos de coleta. Em P1 foram analisadas 3000 células (30 peixes), em P2 2800 (28 peixes), e em P3 2900 (29 peixes). Os escores e medianas da coleta de junho/2005 estão colocados na Tabela 5.

TABELA 5: ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM ERITRÓCITOS NOS PONTOS DE COLETA (JUNHO/2005).

	PONTO 1	PONTO 2	PONTO 3
Soma dos Escores	10836	7977	10588
Mediana dos Escores	375.5	297	368

Ao compararmos os pontos P1, P2 e P3 de junho/2005 com as RF1 e RF2, verificou-se que as diferenças foram significativas ($p < 0,0001$). Foi também significativa a diferença entre os P1 e P3 ($p = 0,0065$) e entre P3 e P2 ($p = 0,017$), mas não foi significativa a diferença entre P1 e P3 (Figura 11).

FIGURA 11: MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE *Geophagus brasiliensis* – JUNHO/2005 EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA (RF1 e RF2) E CONTROLE POSITIVO (CI, CII e CIII).



Em contraste as concentrações de sulfato de cobre do controle positivo, os Pontos 1 e 3 apresentaram escores maiores que as concentrações I e II ($p < 0,05$), mas não apresentaram diferença em relação a concentração III. Isto é apresentado na Figura 11, onde se pode notar que a mediana dos escores em CI e CII são menores do que P1 e P3. Já CIII se mostrou com dano máximo e, portanto maior do que P1, P2 e P3.

4.2.5 Coleta Novembro/2005

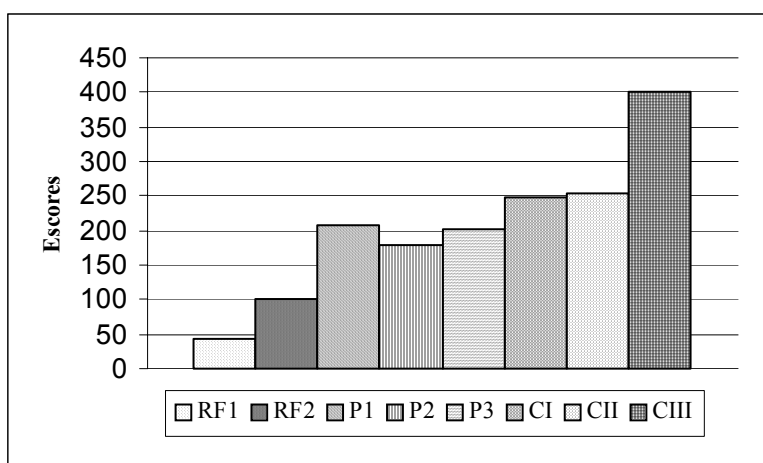
Foram analisadas 100 células (nucleóides) de cada indivíduo utilizado no experimento, perfazendo um total de 8600 células (86 peixes) nos pontos de coleta. Em P1 e P3 foram analisadas 2800 células (28 peixes) para cada um dos pontos, e em P2 3000 células (30 peixes). Os escores e medianas da coleta de novembro/2005 estão colocados na Tabela 6.

TABELA 6: ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM ERITRÓCITOS NOS PONTOS DE COLETA (NOVEMBRO/2005).

	PONTO 1	PONTO 2	PONTO 3
Soma dos Escores	5819	5684	5618
Mediana dos Escores	208.5	178	202

Não houve diferença entre os três pontos de coleta ($p > 0,05$). Este foi o único dos três períodos de coleta que se mostrou estatisticamente homogêneo para os locais P1, P2 e P3. Isto pode ser observado na Figura 12.

FIGURA 12: MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE *Geophagus brasiliensis* – NOVEMBRO/2005 EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA (RF1 e RF2) E CONTROLE POSITIVO (CI, CII e CIII).

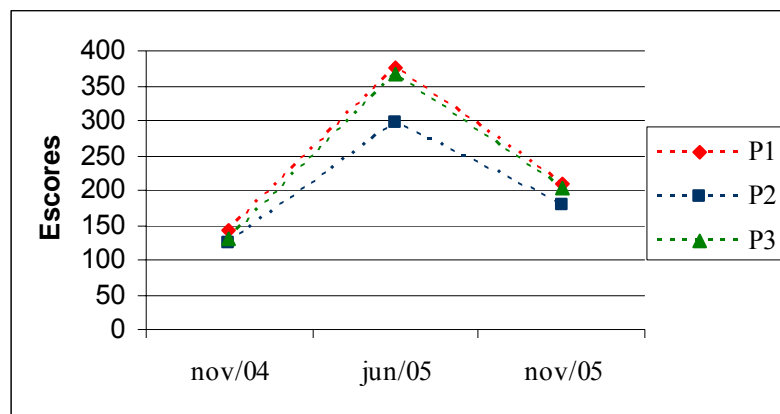


Os escores dos pontos de coleta (P1, P2 e P3) com os pontos referência (RF1 e RF2) foram diferentes quando comparados ($p < 0,0005$). Em contraste ao controle positivo, não foram encontradas diferenças entre os pontos e as concentrações CI e CII ($p > 0,05$), mas todos os pontos (P1, P2 e P3) apresentaram diferença com escores menores que CIII ($p < 0,0001$). As diferenças podem ser notadas ao se observar a Figura 12, onde CIII possui a maior mediana dos escores, devido à morte dos peixes.

4.2.6 Contraste entre as coletas

Ao comparar-se as 3 coletas (Nov/04, Jun/05 e Nov/05) (Figura 13) pode-se observar que Junho/05 foi a época de maior dano ao DNA, detectado pelo Ensaio Cometa em eritrócitos. Além disso, P2 em todas as coletas se mostra os pontos com menores escores. P2 e P3 apresentaram diferenças em todas as coletas, sendo que Nov/05 apresentou maiores escores que a de Nov/04 e P1 não apresentou diferença ($p= 0,079$) entre estas duas coletas.

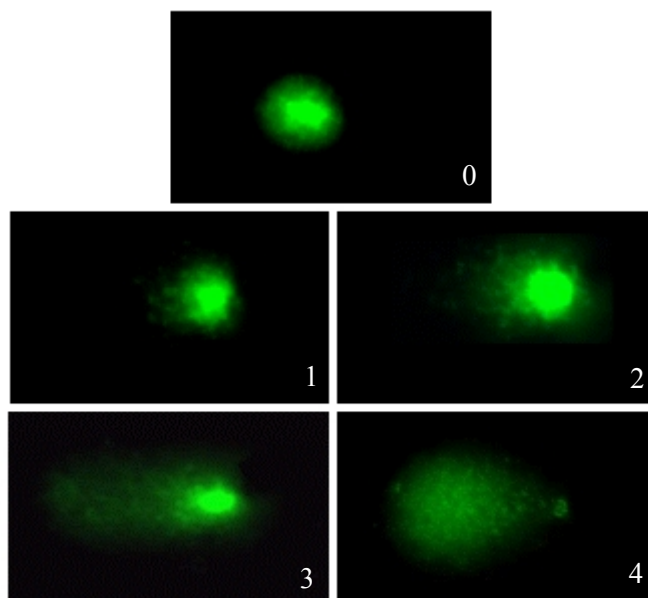
FIGURA 13: MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE *Geophagus brasiliensis* – COLETAS DE NOVEMBRO/2004, JUNHO/2005 E NOVEMBRO/2005.



4.3 ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAIIS

Foi extraída a porção anterior do rim e obtidas células individualizadas dos mesmos animais dos quais foi coletado sangue. Destas, foram analisadas 100 células (nucleóides) de cada indivíduo utilizado no experimento (Apêndice 3), as quais foram classificadas individualmente em quatro classes de cometa de acordo com o tipo de dano identificado (dano 0 a dano 4) (Figura 14).

FIGURA 14 – IMAGEM CAPTURADA DE COMETAS EM CÉLULAS RENAIIS INDICANDO AS CLASSES 0, 1, 2, 3 E 4.



4.3.1 Coleta Parque Ecológico Costa (Ponto Referência)

Foram analisadas um total de 5700 células (nucleóides) (57 peixes) no grupo coletado no Ponto Referência, distribuídas em 2800 células (28 peixes) na coleta de janeiro/2005 (RF1) e 2900 na coleta de julho/2005 (RF2). Essa diferença numérica entre as duas coletas deve-se a algumas lâminas não possuírem células em bom estado para contagem. Os escores e medianas dos escores das coletas estão apresentados na Tabela 7.

TABELA 7: ESCORES E MEDIANAS OBTIDAS EM CÉLULAS RENAIIS NO PONTO REFERÊNCIA.

	JANEIRO/2005	JULHO/2005
Soma dos Escores	863	2022
Mediana dos Escores	34	58

Ao se comparar às épocas de coleta, janeiro/05 (RF1) e julho/05 (RF2), obtiveram-se diferenças entre elas ($p= 0,0145$). Isto mostra que no inverno houve um acréscimo de danos às células renais quando comparado com o verão (Tabela 6).

4.3.2 Controle Positivo.

Foram analisadas um total de 4100 células (nucleóides) (41 peixes) no grupo Controle Positivo, distribuídas em 2200 células (22 peixes) em CI, e 1900 (19 peixes) em CII. Foi atribuído escore máximo (400) a 3 animais em CII, e aos 22 de CIII, que morreram em 24h de exposição ao Sulfato de Cobre. Os escores e medianas das concentrações I, II e III do controle positivo estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8: ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM CÉLULAS RENAIIS NO CONTROLE POSITIVO.

	CI	CII	CIII
Soma dos Escores	5047	5499	8800
Mediana dos Escores	230	260.5	400

Ao comparar os escores entre as concentrações do controle positivo, não houve diferença entre a CI e CII ($p> 0,05$), mas entre a CIII e as demais houve diferença ($p< 0,0001$). Isto devido CIII ter recebido escore máximo, pela morte dos peixes.

4.3.3 Coleta Novembro de 2004

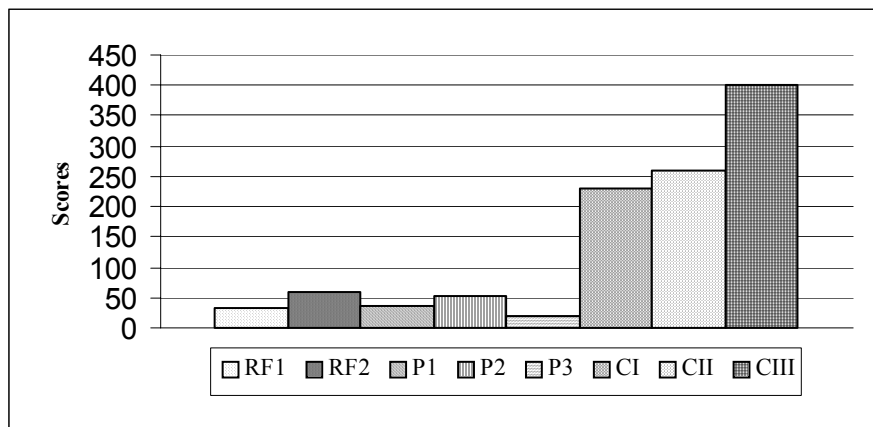
Foram analisadas 100 células renais (nucleóides) de cada indivíduo, perfazendo um total de 8900 células (89 peixes) nos pontos de coleta. Em P1 e P3 foram analisadas 3000 células (30 peixes), e em P2 2900 células (29 peixes). Os escores e medianas dos escores da coleta de novembro/2004 estão colocados na Tabela 9.

TABELA 9: ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM CÉLULAS RENAIIS NOS PONTOS DE COLETA (NOVEMBRO/2004).

	PONTO 1	PONTO 2	PONTO 3
Soma dos Escores	1541	1757	774
Mediana dos Escores	36	54	19.5

Ao comparar os escores entre os pontos de coleta, foi encontrada diferença entre P2 e P3, pois P2 apresentou maiores escores ($p= 0,02$) (Tabela 8 e Figura 15), o mesmo acontecendo ao se comparar P2 com RF1 ($p= 0,04$). Já quando se compara P2 com RF2 não houve diferença ($p= 0,66$). P3 não mostrou diferença quando comparado com RF1 ($p= 0,75$), mas sim com RF2 onde este último se mostra com maior número de células com dano ($p= 0,006$). Pode-se observar que a Referência de Julho/05 (RF2) apresentou mais danos ao DNA das células renais do que o P3 de Nov/04.

FIGURA 15: MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAIIS DE *Geophagus brasiliensis* - NOVEMBRO/2004 EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA (RF1 e RF2) E CONTROLE POSITIVO (CI, CII e CIII).



Em relação à comparação de P1, P2 e P3 com CI, CII e CIII, observou-se que os 3 locais de coleta apresentaram escores menores do que todas as concentrações de sulfato de cobre, com diferença entre eles ($p < 0,0001$).

4.3.4 Coleta Junho/2005

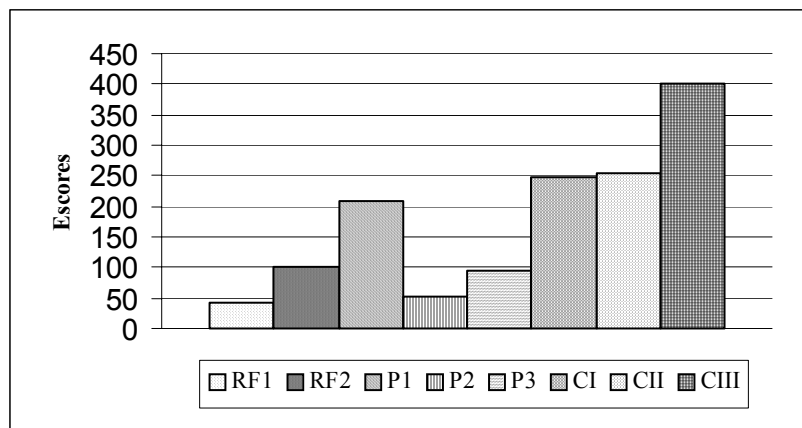
Foram analisadas 100 células renais (nucleóides) de cada indivíduo, perfazendo um total de 8700 células (87 peixes) nos pontos de coleta. Em P1 foram analisadas 3000 células (30 peixes), em P2 2900 células (29 peixes) e em P3 2800 células (28 peixes). Os escores e medianas da coleta de junho/2005 estão colocados na Tabela 10.

TABELA 10: ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM CÉLULAS RENAIIS NOS PONTOS DE COLETA (JUNHO/2005).

	PONTO 1	PONTO 2	PONTO 3
Soma dos Escores	6273	1709	3481
Mediana dos Escores	208.5	51.5	96

Ao comparar os escores entre os pontos de coleta (P1, P2 e P3), foi encontrada diferença entre todos eles ($p < 0,01$). O ponto 1 apresentou os maiores escores, seguidos por P3 e P2 (Figura 16).

FIGURA 16: MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAIAS DE *Geophagus brasiliensis* – JUNHO/2005 EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA (RF1 e RF2) E CONTROLE POSITIVO (CI, CII e CIII).



Ao comparar os escores dos pontos de coleta com os pontos referência (RF1 e RF2), apenas P2 não apresentou diferença ($p=0,07$).

Em relação às CI, CII e CIII, P2 e P3 apresentaram escores menores que todos os controles positivos ($p < 0,0005$). Não foi encontrada diferença entre P1 e as concentrações I e II, sendo que em relação a CIII seus escores foram menores ($p=0,02$). Estes resultados evidenciam que P2 de junho/05 não apresenta diferença dos resultados de Nov/04 ($p=0,82$), mas o inverso acontece para P2 e P3, os quais se mostraram mais comprometidos em junho/05 do que em Nov/04 ($p < 0,0001$) (Figura 15 e Figura 16).

4.3.5 Coleta Novembro/2005

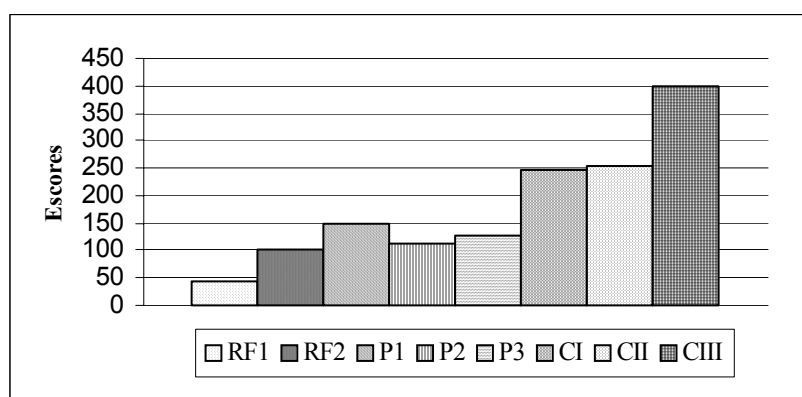
Foram analisadas 100 células renais (nucleóides) de cada indivíduo, perfazendo um total de 8800 células (88 peixes) nos pontos de coleta. Em P1 foram analisadas 2900 células (29 peixes) e em P1 e P3 3000 células (30 peixes). Os escores e medianas da coleta de novembro/2005 estão colocados na Tabela 11.

TABELA 11: ESCORES E MEDIANAS OBTIDOS EM CÉLULAS RENAIIS NOS PONTOS DE COLETA (NOVEMBRO/2005).

	PONTO 1	PONTO 2	PONTO 3
Soma dos Escores	4267	3668	3718
Mediana dos Escores	148	113	127

Ao comparar os escores entre os pontos de coleta (P1, P2 e P3) não foi encontrada diferença entre eles ($p > 0,05$), mostrando uma homogeneidade entre os 3 pontos de coleta.

FIGURA 17: MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAIIS DE *Geophagus brasiliensis* – NOVEMBRO/2005 EM CONTRASTE COM OS PONTOS REFERÊNCIA (RF1 e RF2) E CONTROLE POSITIVO (CI, CII e CIII).



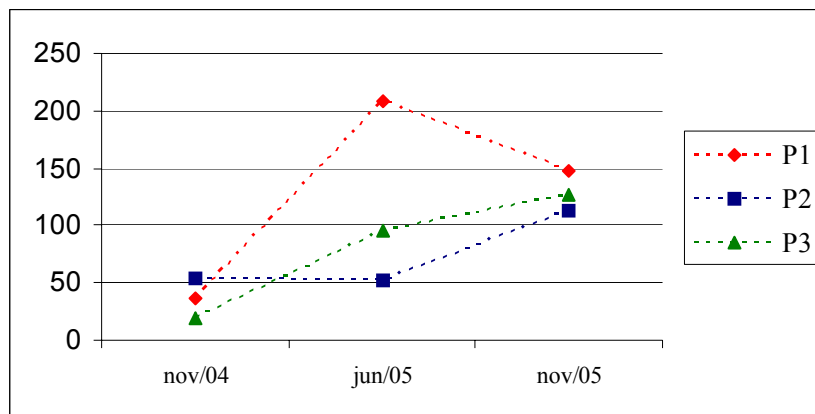
Ao comparar os escores dos pontos de coleta com os pontos referência (RF1 e RF2), a diferença foi significativa ($p < 0,005$) visto que nos 3 pontos as medianas dos escores foram maiores do que de RF1 e RF2 (Tabela 11, Figura 17). O contrário aconteceu com relação aos controles positivos, onde CI, CII e CIII se mostraram estatisticamente significantes ao serem comparados com P1, P2 e P3 ($p < 0,05$).

4.3.6 Contraste entre as coletas

A Figura 18 demonstra graficamente as medianas dos escores encontrados nos pontos 1, 2 e 3 em células renais das coletas de Novembro/2004, Junho/2005 e Novembro/2005.

Ao se contrastar os resultados dos 3 pontos de coletas nas 3 épocas do ano, através das medianas dos escores, pode-se observar que entre as coletas de nov/04 e nov/05 houve diferença ($p < 0,001$), o mesmo aconteceu com estas duas épocas para P2 e P3 no Ensaio Cometa do eritrócitos.

FIGURA 18: MEDIANA DOS ESCORES OBTIDOS PARA O ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAS DE *Geophagus brasiliensis* – COLETAS DE NOVEMBRO/2004, JUNHO/2005 E NOVEMBRO/2005.



Entre nov/04 e jun/05 apenas P2 não apresentou diferença, os demais pontos (P1 e P3) apresentaram um aumento nos valores dos escores em jun/05 ($p < 0,0001$). Em relação à jun/05 e nov/05, P3 não apresentou diferença, P1 apresentou menores escores em nov/05 ($p < 0,05$), e P2 aumentou os escores em nov/05 ($p = 0,0003$).

4.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE

Foram utilizados 10 exemplares (os 10 primeiros também utilizados para as análises genotóxicas e histopatológicas) de *Geophagus brasiliensis* proveniente de cada ponto de coleta. As coletas incluídas na análise da atividade da acetilcolinesterase foram: Novembro/2004, Junho/2005 e Novembro/2005 das Lagoas do Camacho e Santa Marta e de Janeiro /2005 e Julho/2005 do Parque Ecológico Costa (Ponto Referência).

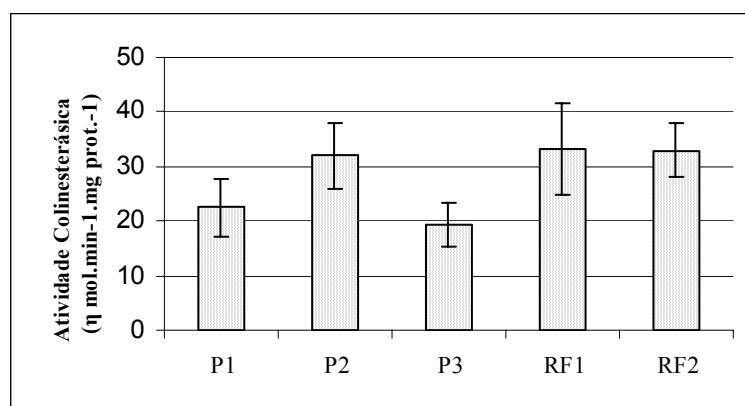
4.4.1 Coleta Parque Ecológico Costa (Ponto Referência)

O grupo coletado no ponto referência em janeiro/2005 apresentou média \pm desvio padrão da atividade da acetilcolinesterase $33.31 \eta \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1} \pm 8.44$, e o de julho/2005 apresentou média de $33.03 \eta \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1} \pm 4.8$. Não houve diferença entre as duas coletas.

4.4.2 Coleta Novembro/2004

Os resultados da atividade da acetilcolinesterase muscular em *Geophagus brasiliensis*, coletados em P1, P2 e P3 e os pontos referências nos períodos de Janeiro/05 (RF1) e Julho/05 (RF2) são representados na Figura 19. A média \pm desvio padrão da atividade da acetilcolinesterase em P1 foi de $22.45 \eta \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1} \pm 5.4$, em P2 foi $32.03 \eta \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1} \pm 5.98$, e em P3 de $19.35 \eta \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1} \pm 3.93$. Utilizando ANOVA (Teste t) foram obtidas diferenças entre os grupos coletados em P1 e P3 ($p < 0,0005$ e $p < 0,0001$ respectivamente) quando comparados a RF1 e RF2. Não houve diferença entre P2 e RF1 e RF2.

FIGURA 19: ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM *Geophagus brasiliensis*, COLETA DE NOVEMBRO/2004 (P1, P2 e P3) X PONTOS REFERÊNCIA DE JANEIRO/2005 (RF1)E JULHO/2005 (RF2).

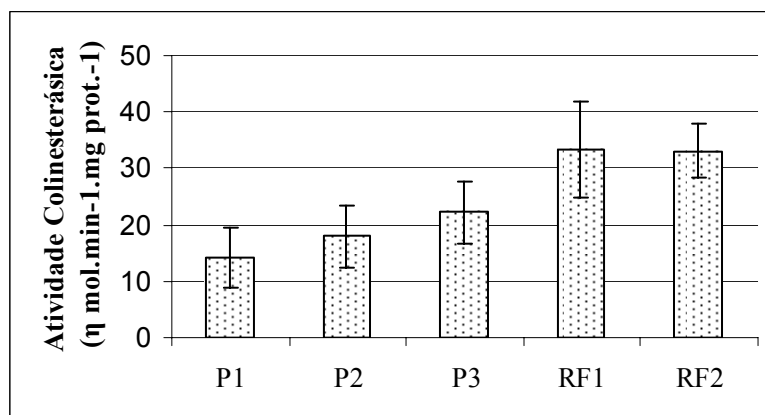


Ao comparar os grupos coletados nos pontos 1, 2 e 3 entre eles, houve diferença entre P1 e P2 ($p= 0,002$) e entre P2 e P3 ($p= 0,0001$), sendo a atividade da acetilcolinesterase mais inibida nos pontos 1 e 3.

4.4.3 Coleta Junho/2005

Os resultados da atividade da acetilcolinesterase muscular em *Geophagus brasiliensis*, coletados em P1, P2 e P3 e RF1 e RF2 estão representados na Figura 20. A atividade média \pm desvio padrão da acetilcolinesterase em P1 foi de $14.17 \eta \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1} \pm 5.48$, em P2 foi de $17.96 \eta \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1} \pm 6.63$, e em P3 de $22.23 \eta \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1} \pm 4.26$. Utilizando ANOVA (Teste t), foram obtidas diferenças entre todos os grupos coletados (P1, P2 e P3) em junho/2005 ($p < 0,0005$) quando comparados a RF1 e RF2.

FIGURA 20: ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE DE *Geophagus brasiliensis*, COLETA DE JUNHO/2005 (P1, P2 e P3) X PONTOS REFERÊNCIA DE JANEIRO/2005 (RF1) E JULHO/2005 (RF2).

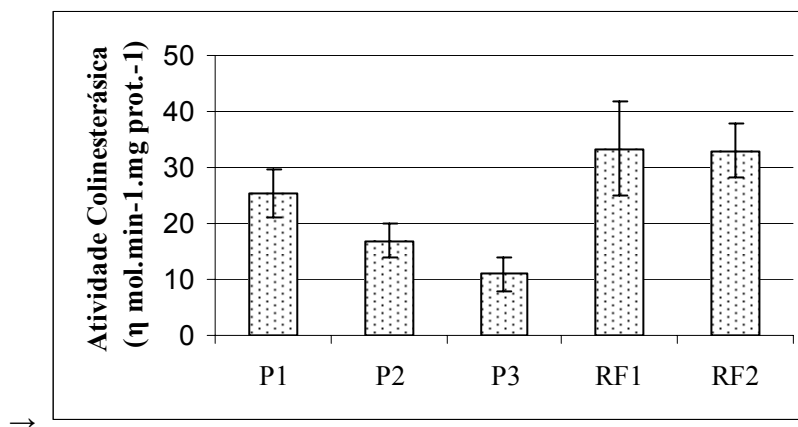


Ao comparar os grupos coletados nos pontos 1, 2 e 3 entre eles, apenas entre P1 e P3 houve diferença ($p= 0,008$), sendo P1 o que apresentou maior inibição na atividade da acetilcolinesterase.

4.4.4 Coleta Novembro/2005

Os resultados da atividade da acetilcolinesterase muscular em *Geophagus brasiliensis*, coletados em P1, P2 e P3 e os pontos referências nas épocas de janeiro/05 (RF1) e julho/05 (RF2) estão representados na Figura 21. A atividade média \pm desvio padrão em P1 foi de $25.5 \eta \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1} \pm 4.25$, em P2 foi de $16.86 \eta \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1} \pm 3.1$, e em P3 de $10.94 \eta \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1} \pm 2.94$. Utilizando ANOVA (Teste t) foram obtidas diferenças entre todos os grupos coletados em novembro/2005 ($p < 0,01$) quando comparados a RF1 e RF2.

FIGURA 21: ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE DE *Geophagus brasiliensis*, COLETA DE NOVEMBRO/2005 (P1, P2 e P3) X PONTOS REFERÊNCIA DE JANEIRO/2005 (RF1) E JULHO/2005 (RF2).



Ao comparar os grupos coletados nos pontos 1, 2 e 3 entre eles, todos os pontos apresentaram diferença ($p < 0,05$), sendo P3 o que apresentou maior inibição na atividade da enzima, seguidos por P2 e P1, respectivamente.

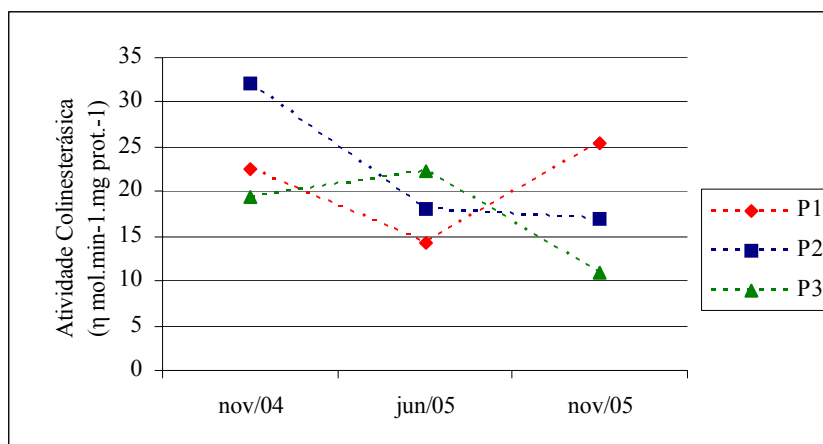
4.4.5 Contraste entre as coletas

A comparação entre os resultados obtidos das coletas de novembro/2004, junho/2005 e novembro/2005 está representada na Figura 22. Para o ponto 1, a maior inibição da atividade da acetilcolinesterase ocorreu em junho/2005, o qual apresentou diferenças quando comparado as outras coletas ($p < 0,01$). Entre as coletas de nov/04 e nov/05 não houve diferença.

Para o ponto 2, a maior inibição da enzima ocorreu em novembro/2005, o qual apresentou diferenças com a coleta de junho/05 e de novembro/05 ($p < 0,0001$). Entre nov/04 e jun/05 ocorreu uma diminuição na atividade da acetilcolinesterase ($p < 0,0001$), que permaneceu a mesma na coleta de nov/05.

Para o ponto 3, a maior inibição da atividade da enzima também ocorreu em novembro/2005, o qual apresentou diferenças quando comparado as outras coletas ($p < 0,005$). Entre as coletas de nov/04 e jun/05 não houve diferença. Entre jun/05 e nov/05 ocorreu uma diminuição na atividade da acetilcolinesterase ($p < 0,0002$).

FIGURA 22: ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM *Geophagus brasiliensis*, COLETA DE NOVEMBRO/2004 X JUNHO/2005 X NOVEMBRO/2005.

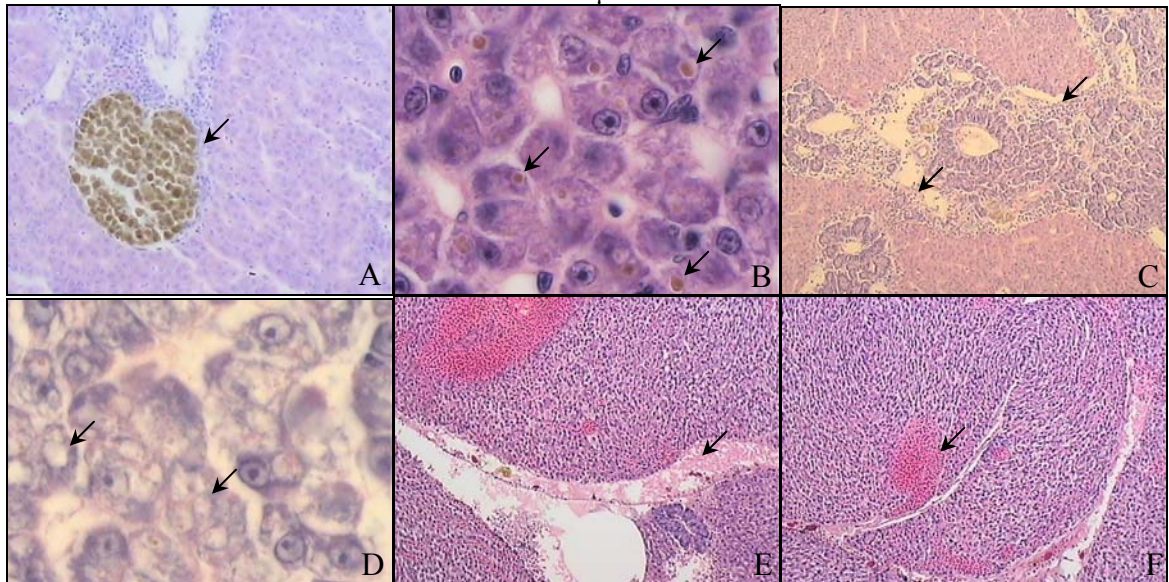


4.5 HISTOPATOLOGIA

Foram utilizados 10 exemplares de *Geophagus brasiliensis* de cada ponto de coleta. As coletas incluídas na análise histopatológicas foram: Novembro/2004, Junho/2005 e Novembro/2005 das Lagoas do Camacho e Santa Marta e de Janeiro/2005 do Parque Ecológico Costa (Ponto Referência – RF1).

Foram consideradas para avaliação histopatológica as seguintes lesões encontradas (Figura 23): Centro de Melanomacrófagos (CMM), Melanomacrófagos Livres (ML), Hemorragia, Infiltração Leucocitária, Vacuolização e Necrose.

FIGURA 23: MICROSCOPIA DE LUZ DO FÍGADO DE *Geophagus brasiliensis*. COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA. CORTES COM 5 μ m DE ESPESSURA.



A - CMM (seta) 200x. B - ML (seta) 400x. C - Infiltração Leucocitária (seta) 200x. D - Vacuolização (seta) 1000x. E - Necrose (seta) 200x. F - Hemorragia (seta) 200x.

4.5.1 Coleta Parque Ecológico Costa (Ponto Referência)

4.5.1.1 *Quantificação de Centro de Melanomacrófagos (CMM) e Melanomacrófagos Livres (ML);*

Para o Ponto Referência foi encontrada uma média de 0.001 CMM/mm² e 0.0074 ML/mm².

4.5.1.2 *Avaliação histopatológica das lesões*

Os resultados para o Ponto Referência estão demonstrados na Tabela 12 por ocorrência de cada lesão, e para o índice de Bernet a mediana encontrada foi 0.

TABELA 12: OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE *Geophagus brasiliensis* NO PONTO REFERÊNCIA.

LESÕES CONSIDERADAS	PONTO REFERÊNCIA
Hemorragia	10(10)
Infiltração Leucocitária	6(10)
Necrose	8(10)
Vacuolização	1(10)

4.5.2 Coleta de Novembro/2004

4.5.2.1 *Quantificação de Centro de Melanomacrófagos (CMM) e Melanomacrófagos Livres (ML);*

As médias dos CMM e ML da coleta de novembro/2004, em contraste com o Ponto Referência estão apresentadas na Tabela 13.

TABELA 13: MÉDIAS DE CMM E ML DA COLETA DE NOVEMBRO/2004 E PONTO REFERÊNCIA.

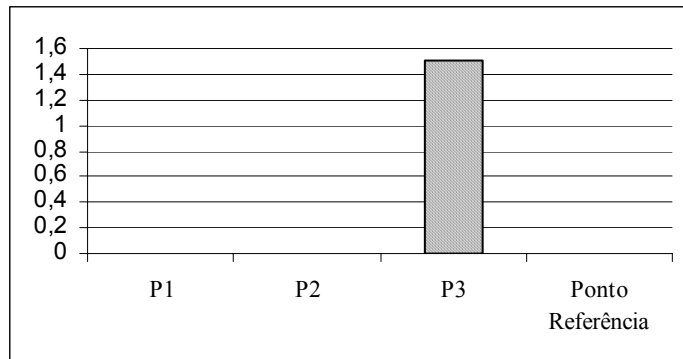
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto Referência
CMM	0.0024	0.00094	0.00213	0.001
ML	0.0069	0.0013	0.00204	0.0074

Não foram encontradas diferenças em quaisquer dos contrastes para o Teste de Kruskal-Wallis.

4.5.2.2 Avaliação histopatológica das lesões

O contraste entre os índices de Bernet dos Pontos (1, 2 e 3) da coleta de novembro/2004 e com o Ponto Referência está ilustrado graficamente na Figura 24, as ocorrências de cada lesão estão inseridas na Tabela 14.

FIGURA 24: MEDIANAS ENCONTRADAS PARA O ÍNDICE DE BERNET NA COLETA DE NOVEMBRO/2004 EM CONTRASTE COM O PONTO REFERÊNCIA.



Não foram encontradas diferenças para o Teste de Kruskal-Wallis entre os pontos, para o índice de Bernet.

TABELA 14: OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE *Geophagus brasiliensis* NA COLETA DE NOVEMBRO/04, EM CONTRASTE AO PONTO REFERÊNCIA.

LESÕES CONSIDERADAS	P1	P2	P3	RF1
Hemorragia	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)
Infiltração Leucocitária	10(10)	9(10)	10(10)	6(10)
Necrose	10(10)	10(10)	10(10)	8(10)
Vacuolização	1(10)	0(10)	3(10)	1(10)

Foram obtidas diferenças para o Teste do Qui-Quadrado apenas para Infiltração Leucocitária, onde todos os pontos possuem mais infiltrações que RF1, mas não se diferenciam entre si ($p < 0,01$)

4.5.3 Coleta de Junho/2005

4.5.3.1 *Quantificação de Centro de Melanomacrófagos (CMM) e Melanomacrófagos Livres (ML);*

As médias dos CMM e ML da coleta de junho/2005, em contraste com o Ponto Referência estão apresentadas na Tabela 15.

TABELA 15: MÉDIAS DE CMM E ML DA COLETA DE JUNHO/2005 E PONTO REFERÊNCIA.

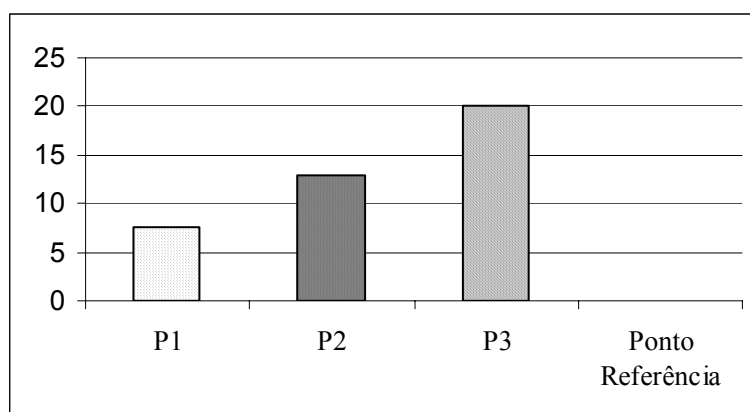
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto Referência
CMM	0.0015	0.0027	0.0014	0.001
ML	0	0	0.0007	0.0074

Foram encontradas diferenças apenas para CMM quando comparado o Ponto 2 com o Ponto Referência ($p = 0,03$). Nenhum dos outros contrastes apresentou diferença.

4.5.3.2 *Avaliação histopatológica das lesões*

O contraste entre os índices de Bernet dos Pontos (1, 2 e 3) da coleta de junho/2005 e com o Ponto Referência está ilustrado graficamente na Figura 25, as ocorrências de cada lesão estão inseridas na Tabela 16.

FIGURA 25: MEDIANAS ENCONTRADAS PARA O ÍNDICE DE BERNET NA COLETA DE NOVEMBRO/2004 EM CONTRASTE COM O PONTO REFERÊNCIA.



Não foram encontradas diferenças entre os pontos da coleta de junho/2005, mas quando comparados ao Ponto Referência todos os pontos (1, 2 e 3) apresentaram maiores índices de lesão em fígado ($p < 0,001$).

TABELA 16: OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE *Geophagus brasiliensis* NA COLETA DE JUNHO/05, EM CONTRASTE AO PONTO REFERÊNCIA.

LESÕES CONSIDERADAS	P1	P2	P3	RF1
Hemorragia	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)
Infiltração Leucocitária	9(10)	10(10)	10(10)	6(10)
Necrose	10(10)	10(10)	10(10)	8(10)
Vacuolização	10(10)	1(10)	7(10)	1(10)

Foram obtidas diferenças para o Teste do Qui-Quadrado para Infiltração Leucocitária, onde todos os pontos possuem mais infiltrações que RF1, mas não se diferenciam entre si ($p < 0,01$). Para vacuolização, onde P1 e P3 possuem maior quantidade de vacuolizações que RF1 e que P2 ($p < 0,01$), mas não se diferenciam entre si.

4.5.4 Coleta de Novembro/2005

4.5.4.1 Quantificação de Centro de Melanomacrófagos (CMM) e Melanomacrófagos Livres (ML);

As médias dos CMM e ML da coleta de novembro/2005, em contraste com o Ponto Referência estão apresentadas na Tabela 17.

TABELA 17: MÉDIAS DE CMM E ML DA COLETA DE NOVEMBRO/2005 E PONTO REFERÊNCIA.

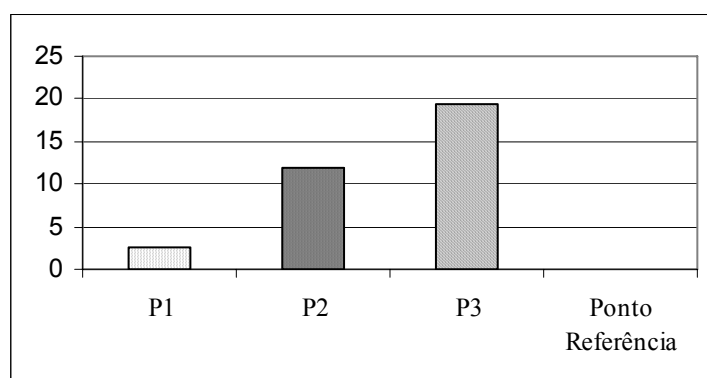
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto Referência
CMM	0.00053	0.0069	0.0025	0.001
ML	0	0.0013	0.0013	0.0074

Não foram encontradas diferenças na coleta de novembro/2005 para quantificação de ML. Foram encontradas diferenças apenas para CMM. Entre os pontos de coleta, P2 apresentou maior quantidade de CMM/mm², seguido por P3 e P1 com menores quantidades ($p < 0,05$). Em contraste ao Ponto Referência apenas P2 apresentou diferença ($p = 0,0001$).

4.5.4.2 Avaliação histopatológica das lesões

O contraste entre os índices de Bernet dos Pontos (1, 2 e 3) da coleta de novembro/2005 e com o Ponto Referência está ilustrado graficamente na Figura 26, as ocorrências de cada lesão estão inseridas na Tabela 18.

FIGURA 26: MEDIANAS ENCONTRADAS PARA O ÍNDICE DE BERNET NA COLETA DE NOVEMBRO/2005 EM CONTRASTE COM O PONTO REFERÊNCIA.



Foram encontradas diferenças entre os pontos 1 e 2 ($p = 0,02$), e entre 1 e 3 ($p = 0,01$) da coleta de junho/2005, sendo o Ponto 1 com menores índices de lesão em fígado e os pontos 2 e 3 com os maiores índices. Quando comparados ao Ponto

Referência todos os pontos (1, 2 e 3) apresentaram maiores índices de lesão em fígado ($p < 0,05$).

TABELA 18 OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE *Geophagus brasiliensis* NA COLETA DE NOVEMBRO/05, EM CONTRASTE AO PONTO REFERÊNCIA.

LESÕES CONSIDERADAS	P1	P2	P3	RF1
Hemorragia	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)
Infiltração Leucocitária	10(10)	10(10)	10(10)	6(10)
Necrose	10(10)	10(10)	10(10)	8(10)
Vacuolização	10(10)	5(10)	10(10)	1(10)

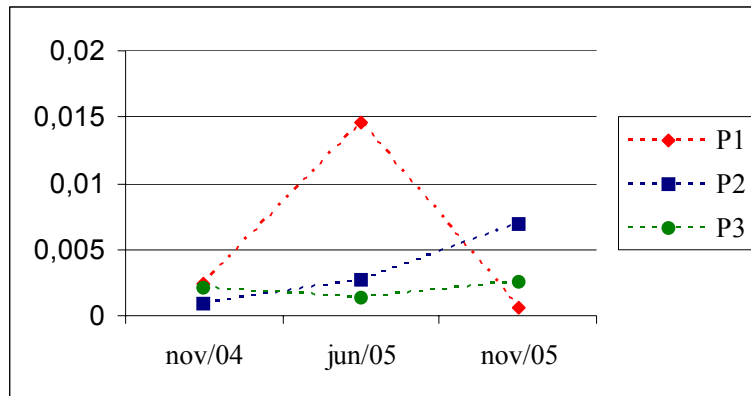
Foram obtidas diferenças para o Teste do Qui-Quadrado apenas para Infiltração Leucocitária, onde todos os pontos possuem mais infiltrações que RF1, mas não se diferenciam entre si ($p < 0,01$). Para vacuolização, onde P1 e P3 possuem maior quantidade de vacuolizações que RF1 e que P2 ($p < 0,01$), mas não se diferenciam entre si.

4.5.5 Contraste entre as coletas

4.5.5.1 *Quantificação de Centro de Melanomacrófagos (CMM) e Melanomacrófagos Livres (ML);*

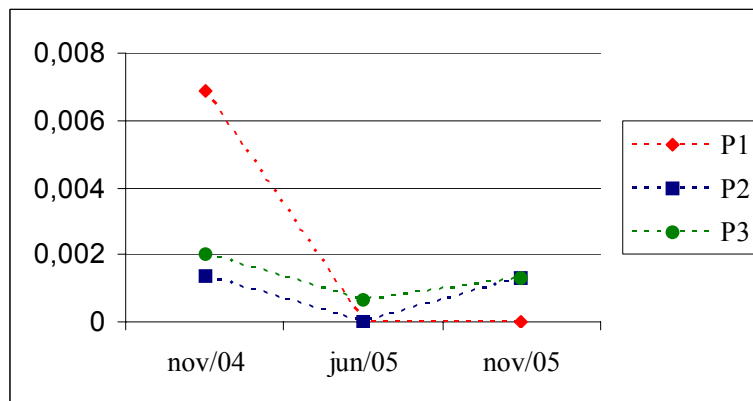
Os contrastes entre as médias dos CMM e ML das coletas de novembro/2004, junho/2005 e novembro/2005 estão apresentados nas Figuras 27 e 28.

FIGURA 27: CONTRASTES DE MÉDIAS DE CMM ENTRE AS COLETAS.



Foram encontradas diferenças entre as coletas apenas entre as coletas de novembro/04 e novembro/2005, nos pontos 1 e 2. Em P1 ocorre uma queda na quantidade de CMM entre nov/04 e nov/05 ($p= 0,01$), em P2 há um aumento no número de CMM entre nov/04 e nov/05 ($p= 0,0001$)

FIGURA 28: CONTRASTES DE MÉDIAS DE ML ENTRE AS COLETAS.

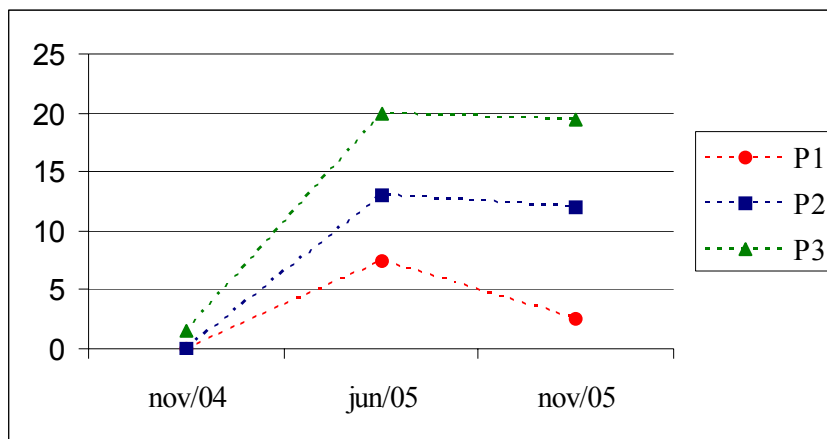


Não foram encontradas diferenças entre as coletas para Melanomacrófagos livres.

4.5.5.2 Avaliação histopatológica das lesões

O contraste entre as medianas dos índices de Bernet dos Pontos (1, 2 e 3) entre as coletas de Novembro/2004, Junho/2005 e Novembro/2005 está ilustrado na Figura 29.

FIGURA 29: CONTRASTE ENTRE AS MEDIANAS ENCONTRADAS PARA O ÍNDICE DE BERNET ENTRE AS COLETAS.



Foram encontradas diferenças entre todos os pontos (1, 2 e 3) entre as coletas de nov/04 e jun/05, sendo que todos os pontos aumentaram seus índices de lesão em fígado ($p < 0,005$). Entre as coletas de jun/05 e nov/05 não houve diferenças. As coletas de nov/04 e nov/05, apresentaram diferenças entre os pontos 2 e 3, apresentando também um aumento nos índices de lesão em fígado de ambos ($p < 0,005$).

A união de todas as lesões consideradas para tabela de ocorrência de todas as coletas está representada na Tabela 19.

TABELA 19: OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE *Geophagus brasiliensis* EM TODAS AS COLETAS, EM CONTRASTE AO PONTO REFERÊNCIA.

LESÕES CONSIDERADAS	COLETA NOV/04			COLETA JUN/05			COLETA NOV/05			RF1
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	
Hemorragia	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)
Infiltração Leucocitária	10(10)	9(10)	10(10)	9(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	6(10)
Necrose	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	10(10)	8(10)
Vacuolização	1(10)	0(10)	3(10)	10(10)	1(10)	7(10)	10(10)	5(10)	10(10)	1(10)

4.6 Contrastes entre os Biomarcadores

A Tabela 20 apresenta todos os resultados de cada coleta para cada Biomarcador, sendo + representando diferença quando comparado ao Ponto Referência (RF1) e – quando não apresenta diferença. Devido ao Ponto Referência de Janeiro/2005 ser o único a ser utilizado em todos os biomarcadores, este será a referência para os dados.

TABELA 20: COMPARAÇÃO ENTRE OS BIOMARCADORES PARA CADA PONTO DE COLETA.

COLETAS	PONTOS	MN	BIOMARCADORES			HISTOPATOLOGIA
			COMETA (eritrócitos)	COMETA (célis renais)	AChE	
Novembro/2004	P1	-	+	-	+	-
	P2	-	+	+	-	-
	P3	-	+	-	+	-
Junho/2005	P1	+	+	+	+	+
	P2	-	+	-	+	+
	P3	-	+	+	+	+
Novembro/2005	P1	+	+	+	+	+
	P2	+	+	+	+	+
	P3	+	+	+	+	+

+ diferença significativa em relação a RF1.

- diferença não significativa em relação a RF1.

5 DISCUSSÃO

Diferentes cenários relativos a fatores ambientais que possam ter interferido nos resultados do presente trabalho foram observados durante as coletas nas Lagoas do Camacho e de Santa Marta. Quanto à diluição de poluentes e salinidade ocasionada principalmente pela Barra do Camacho (uma das principais ligações das Lagoas ao mar), apenas na coleta de junho/05 essa se encontrava fechada por assoreamento desde março/05, abrindo novamente em novembro/05 devido ao excesso de chuvas na região e o conseqüente rompimento da barragem natural formada. Quanto ao nível d'água observado nas lagoas entre as coletas em ordem decrescente (do período mais cheio para o mais seco) novembro/05, novembro/04 e junho/05. E quanto às condições do tempo observadas, em junho/05 ocorreu um longo período de estiagem, em novembro/04 ocorreram chuvas com níveis normais para a época e em novembro/05 ocorreu um longo período de chuvas e tempestades. Além disso, devido à pequena profundidade das Lagoas (30 a 200cm), o fundo é facilmente remexido pelos ventos, que são fortes no inverno, ou pela movimentação de embarcações de pescadores. Sabe-se que condições do tempo, como tempestades podem causar turbulência dos sedimentos, transportando os poluentes para locais distantes de suas fontes e que a sedimentação primária ou movimentos de sedimentos são fatores que podem influenciar os níveis de poluição e são difíceis de prever. (RANK, JENSEN e JESPERSEN, 2005).

Para o Teste do Micronúcleo Písceo (MNP) foram utilizadas as duas coletas do Ponto Referência (jan/05 – RF1 e jul/05 – RF2) e as duas concentrações do controle positivo. Levando em consideração que entre as concentrações não houve diferença e que todos os animais que morreram foram retirados da amostra, para discussão dos resultados será utilizada a Concentração I (CI).

Para o Ponto Referência, quando comparado aos pontos das Lagoas, não foram encontradas diferenças no número de alterações na coleta nov/04. Na coleta de jun/05 todos os pontos (P1, P2 e P3) apresentaram mais alterações que pelo menos uma das coletas do Ponto Referência. Na coleta de nov/05 todos os pontos

(P1, P2 e P3) apresentaram maior quantidade de alterações que RF1 e RF2, sendo esta coleta que mais células alteradas apresentou em relação às outras.

A baixa frequência de alterações (soma de alterações morfológicas nucleares e MNP) encontrados na espécie *Geophagus brasiliensis* em nov/04, pode ter ocorrido devido aos tipos de poluentes ou à baixa concentração de dos mesmos nas Lagoas, o que pode estar relacionado ao fato de que às coletas foram realizadas após o período de chuvas na região, além da Barra do Camacho que estava aberta durante o ano todo (Molhe). Diferentes autores acreditam que as frequências de Micronúcleos serão elevadas dependendo da dose de contaminantes quando comparadas com controles relevantes (BABICH et al., 1990; AL-SABTI, 1994; NEPOMUCENO et al., 1997; SANCHEZ-GALÁN et al., 2001; AYLLON e GARCIA-VASQUEZ, 2000; SWARTZ et al., 2003 *apud* PORTO, ARAÚJO e FELDBERG, 2005). Alguns tipos de contaminantes encontrados em ambientes aquáticos aumentam significativamente o número de MN e alterações morfológicas nucleares, quando os peixes são utilizados como bioindicadores., tais como mercúrio orgânico (PORTO, ARAÚJO e FELDBERG, 2005), hidrocarbonetos clorados (DDTs e PCBs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HOSE et al., 1987),

Há uma contradição entre os autores quanto ao uso do teste do MN para detecção de genotoxicidade *in situ*. Alguns consideram que este teste não demonstra sensibilidade para detecção de poluentes em ambientes aquáticos (PORTO, ARAÚJO e FELDBERG, 2005). Outros confirmam a utilidade do teste do MN em peixes para estudos *in situ* (AL-SABTI e METCALFE, 1995; MINISSI et al., 1996; SANCHEZ-GALAN et al., 1998, *apud* RODRIGUEZ-CEA, AYLLON e GARCIA-VASQUEZ, 2003) e AYLLON e GARCIA-VASQUEZ (2000) utilizaram as alterações morfológicas nucleares em peixe juntamente com a contagem de MNP como indicador de genotoxicidade.

No presente trabalho nota-se que houve um aumento gradativo no número de alterações durante as coletas, chegando ao máximo na coleta de nov/05. Isso pode ter ocorrido devido ao acúmulo de substâncias clastogênicas ou aneugênicas na região, devido ao fechamento da Barra do Camacho.

Contrastando o controle positivo (CI) com os resultados de P1, P2 e P3, observou-se o aumento gradual de alterações. Em nov/04 todos os pontos tinham menor número de células alteradas que no CI; em jun/05 apenas P2 manteve-se com número menor de alteração, provavelmente porque este ponto está mais próximo à Barra do Camacho e demorou mais para acumular contaminantes; em nov/05 todos os pontos apresentaram número maior de alterações que CI, levando-nos a concluir que o potencial genotóxico das Lagoas ultrapassa o potencial genotóxico do sulfato de cobre nesta coleta.

Segundo SANCHEZ-GALAN et al. (1999), no teste do MNP, diferentes espécies respondem de maneira diferente em locais poluídos e não poluídos, sugerindo que algumas delas são mais ou menos adequadas para estudos *in situ*. *Geophagus brasiliensis* mostrou ser um bom bioindicador do ambiente para o biomarcador MNP e alterações morfológicas nucleares, considerando as diferenças encontradas entre os pontos das Lagoas e o Ponto Referência. As frequências de MNP dentro de uma população celular também são altamente dependentes da cinética e da proporção da proliferação celular, e isto depende da espécie e do tecido alvo (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Em relação aos pontos de coleta, não houve diferença na quantidade de alterações encontradas em ambas as coletas de novembro, o que era esperado. Já na coleta de Junho/05, P1 apresentou maior número de alterações que os demais pontos, concordando com os resultados da mesma coleta para o Ensaio Cometa. Alguns autores demonstram haver concordância entre o teste do MN e o Ensaio Cometa, apesar de concordarem que o Ensaio Cometa é mais sensível que o MN (HARTMANN et al., 2001; DIXON et al., 2002; KLOBUCAR et al., 2003; *apud* KIM e HYUN, 2005).

O Ensaio Cometa tem sido proposto como uma ferramenta de monitoramento de genotoxicidade em águas continentais e oceânicas, utilizando peixes para detecção de dano no DNA induzido pela ação direta de mutágenos e pró-mutágenos dissolvidos na água (AL-SABTI e METCALFE, 1995; MINISSI, CICCOTTI e RIZZONI, 1996; MITCHLEMORE e CHIPMAN, 1998a, b; LEE e STEINERT, 2003).

Diferentes respostas são possíveis quando diferentes tipos celulares são usados para o Ensaio Cometa. A extensão do dano no DNA pode ser influenciada pelas características das células, tais como processos de reparo, suscetibilidade a oxidantes e permeabilidade de membranas (ANDRIGHETTI-FROHNER et al., 2005). No presente estudo, o Ensaio Cometa foi utilizado como biomarcador do potencial genotóxico agudo (células sanguíneas) e crônico (células renais) das águas das Lagoas do Camacho (Jaguaruna) e Santa Marta (Laguna) (P1, P2 e P3), do Parque Costa (Ponto Referência para controle negativo - RF1 e RF2), e três concentrações de Sulfato de Cobre (controle positivo – CI, CII e CIII). Considerando que em CIII, todos os animais morreram e foi atribuído a eles escore máximo, e que entre CI e CII (onde morreram 3 animais) não obtivemos diferença, utilizaremos para a discussão os resultados de CI, onde não houve morte e os escores são reais.

Em eritrócitos, os índices de dano encontrados nas Lagoas foram maiores em todas as coletas que os encontrados no Ponto Referência de Janeiro/2005, indicando um aporte de contaminantes nos meses próximos as coletas.

Já para o Ponto Referência de Julho/2005, apenas a coleta de Novembro/2004 não apresentou diferença, todas as outras coletas apresentaram índices de dano maiores que RF2.

Foram observados maiores danos na coleta do Ponto Referência de Julho/2005 que em Janeiro/2005, mesmo não apresentando diferença estatística entre eles. Essa diferença pode ser atribuída a sazonalidade, sendo que julho é um dos meses com as mais baixas temperaturas do ano no Parque Costa (Ponto Referência). Para os pontos de coleta, os maiores danos encontrados foram na coleta de Junho/2005, também com baixas temperaturas em relação aos outros meses. Sabe-se que diferenças sazonais podem interferir nos resultados (BUSCHINI et al, 2003). PELLACANI et al (2005), encontraram diferenças na migração do DNA em eritrócitos de *Cyprinus carpio* (peixe) e hemolinfa de *Dreissena polymorpha* (mexilhão), em variações sazonais de temperatura e nível de oxigênio, demonstrando um aumento nos danos no período de inverno nos eritrócitos do peixe. Em peixes, baixas temperaturas induzem uma baixa tradução de RNA,

portanto um aumento na temperatura estimula diretamente a síntese de proteínas. Como mecanismos de reparo podem ser estimulados com o aumento na quantidade de intermediadores (proteínas) de reparo, a hipertermia pode se mostrar hábil a modular o reparo do DNA, em um tempo mais curto que o tempo requerido para o mesmo (GOOLISH et al., 1984, de la HIGUERA et al., 1998, BLASIAK et al., 2003 *apud* PELLACANI et al., 2005).

Além das diferenças sazonais, na coleta de Junho/2005 as Lagoas estavam com baixos níveis de água, devido à época de poucas chuvas e a Barra do Camacho se encontrava fechada, com isso um aumento nas concentrações dos poluentes também pode ter ocorrido. Podemos considerar ainda a baixa profundidade das Lagoas e o aumento nos ventos decorrentes ao período.

Quando comparados os danos em eritrócitos dos pontos P1, P2 e P3 com CI, em Nov/04 os danos em todos os pontos foram menores. Em Jun/05 P1 e P3 apresentaram danos maiores e P2 danos iguais, e em Nov/05 todos os pontos apresentaram danos estatisticamente não significantes em relação com CI.

Com esses dados podemos inferir novamente que houve variação sazonal nos resultados. Mas como em nov/05 obtivemos um grau de dano comparável ao controle positivo podemos sugerir que o Ensaio Cometa em *Geophagus brasiliensis* demonstrou a existência de contaminantes com potencial genotóxico comparável ao do Sulfato de Cobre nas águas das Lagoas, mas não podemos indicar os tipos de contaminantes existentes no local. SASAKI et al. (1997) sugeriu que a determinação de genotoxicidade em contaminações ambientais pode ser feita diretamente nas águas contaminadas e não necessariamente com cada tipo de contaminante existente no local, sendo o cometa um bom teste para este tipo de monitoramento. Devido à dificuldade de mensurar todos os tipos de químicos em ambientes aquáticos, o uso de bioindicadores para medir os níveis de poluição é muito importante. (RANK, JENSEN e JESPERSEN, 2005).

Com base nas diferenças dos índices de dano encontrados nas Lagoas quando comparados com o Parque Costa e o controle positivo podemos sugerir que *Geophagus brasiliensis* está sendo um bom bioindicador de genotoxicidade.

Não podemos esquecer que o Ensaio Cometa é altamente sensível, detectando quebras no DNA de células individuais, e que estas quebras podem ser relacionadas também a um reparo eficiente por excisão de bases (COLLINS et al., 1997). Além do que o tipo de dano detectado pelo Ensaio Cometa pode ser reversível, como foi observado após a incubação em condições controladas sem contaminantes em laboratórios de animais retirados de locais contaminados (NACCI et al., 1992 *apud* LEMOS et al., 2005; PANDRANGI et al., 1995).

Além disso, a variabilidade genética individual em resposta ao ambiente pode ser observada através do Ensaio Cometa (LEE e STEINERT, 2003). Essa variabilidade dos indivíduos pode interferir na análise de genotoxicidade, sendo necessário o uso de um grande número de repetições por grupo. Na avaliação do potencial genotóxico das Lagoas, o uso de aproximadamente 30 exemplares por ponto de coleta se demonstrou suficiente para evitar que a variabilidade interferisse nos resultados.

Quando comparados os danos em eritrócitos entre P1, P2 e P3, nas coletas de nov/04 e nov/05 não se observou diferença, podendo-se inferir uma contaminação genotóxica aguda igualitária em todos os pontos nestas épocas. Na coleta de jun/05 os pontos 1 e 3 apresentaram maior contaminação que P2. Além das diferenças sazonais já discutidas, sabemos que o P1 é o mais próximo à saída do Rio Tubarão, contaminado por metais pesados e esgotos domésticos e industriais. Já P3 era o ponto mais eutrofizado, com saídas de esgotos domésticos. Três parâmetros são geralmente correlacionados em corpos de água poluídos e eutrofizados, nitrato (NO_3), nitrito (NO_2) e oxigênio dissolvido (OD). Atividades biológicas convertem NO_2 em NO_3 na reação de consumo de oxigênio, e o NO_3 pode ser considerado um dos genotóxicos mais eficientes (PRÁ et al., 2005). Muita pesquisa tem estudado a genotoxicidade dos nitratos. Nitrato de sódio induz MN em eritrócitos de mamíferos (MAVOURNIN et al., 1990). Terapias com nitrato por longos períodos para pacientes hipertensos induzem formação de MN (ANDREASSI et al., 2001). TSEZOU et al. (1996) *apud* PRÁ et al (2005) reportou também quebras cromossômicas em crianças expostas a altos níveis de nitrato na água potável.

Para estimar efeitos genotóxicos no tecido renal foi utilizada uma técnica nova para dissociação do tecido em células individualizadas. Por isso o uso de um controle negativo para comparação dos resultados foi importante, onde estes nos mostraram a exequibilidade da técnica. Para o uso de tecidos no Ensaio Cometa um nível basal de dano ao DNA deve ser mantido. Muitas técnicas têm sido aplicadas para vários organismos aquáticos, mas nenhum método foi validado até o momento (KIM e HYUN, 2005).

Em células renais, os índices de dano encontrados nas Lagoas em relação ao Parque Costa, variaram. Na coleta de nov/04 apenas P2 apresentou danos maiores que RF1, e P3 menores que RF2. Na coleta de jun/05 P1 e P3 apresentaram danos maiores que RF1 e RF2, e na coleta de nov/05 todos apresentaram índices de dano maiores que RF1 e RF2.

Nota-se que houve uma contaminação crônica gradual entre as coletas, sendo a última (nov/05) a que apresentou maiores danos para P3 e P2. Para P1 os maiores índices de dano foram encontrados na coleta de junho/05, o que podemos atribuir à alta concentração de metais pesados provenientes do Rio Tubarão, principalmente nesta época, como já foi discutido anteriormente. Poluição por metais pesados é um problema importante, pois estes elementos possuem estabilidade, têm existência persistente no ambiente e bioacumulam na cadeia trófica. Como ambientes aquáticos são depósitos de poluentes produzidos por forças naturais e antropogênicas, a acumulação e persistência de metais pesados neste ambiente constituem uma ameaça à vida (CAVAS, GARANKO e ARKHIPCHUK, 2005).

Quando comparados os danos em células renais dos pontos P1, P2 e P3 ao controle positivo (CI e CII), em Nov/04 e Nov/05 todos os pontos apresentaram danos menores, em Jun/05 os Pontos 2 e 3 também tiveram danos menores e P1 danos iguais. Com esses dados podemos sugerir que houve uma contaminação crônica em células renais menor que a provocada pelo sulfato de cobre.

BICKHAM et al. (2000), hipotetizaram os efeitos da poluição crônica química sobre a genética das populações naturais de duas maneiras: ou a variabilidade genética pode ser aumentada pelo aparecimento de novas mutações,

ou a variabilidade é diminuída pelo efeito gargalo de garrafa sobre a população. Esse efeito pode ocorrer devido às alterações nas frequências alélicas, às vezes resultantes de seleção sobre o *locus* importante para sobrevivência em ambientes contaminados ou pela fixação de alelos deletérios.

Para a medida da atividade da acetilcolinesterase foram utilizados como controle negativo, para comparação das coletas nas Lagoas do Camacho e Santa Marta (P1, P2 e P3), as duas coletas (jan/05 – RF1 e jul/05 – RF2) no Parque Costa (Ponto Referência), que não demonstraram influência sazonal.

Neste biomarcador foi utilizado o tecido muscular para medir a atividade da acetilcolinesterase. Outros tecidos têm sido utilizados em peixes, incluindo fígado, coração, plasma e cérebro. O músculo oferece algumas vantagens sobre outros tecidos, incluindo a fácil obtenção de uma grande quantidade de material. No entanto, ele não possui somente Acetilcolinesterase (AChE) para medida de neurotoxicidade, mas também possui Butirilcolinesterase (BChE), cuja função em peixes ainda é pouco entendida, apesar de se demonstrar sensível a Organofosforados (OPs) e Carbamatos (CBs) (KIRBY et al., 2000).

OPs e CBs são grupos de compostos químicos bastante estudados e que apresentam a capacidade de causar a inibição da atividade da acetilcolinesterase, pois esta enzima é o alvo de ação destas substâncias. No entanto, outros compostos, incluindo metais pesados, hidrocarbonetos e detergentes, parecem ter a capacidade de inibir colinesterases (GILL et al., 1990; ZINKL et al., 1991; PAYNE et al., 1996). Porém, segundo STURM, SILVA DE ASSIS e HANSEN (1999), as concentrações necessárias para que estas substâncias promovam efeitos sobre a Acetilcolinesterase seriam comparativamente altas em relação a OPs e CBs. Embora OPs e CBs sejam relativamente não-persistentes em ambientes aquáticos, sua aplicação constante é necessária, e sua detecção por programas de monitoramento pela atividade da acetilcolinesterase apresenta bons resultados (KIRBY et al., 2000).

Os resultados observados para AChE demonstram que a atividade da enzima em tecido muscular da espécie *Geophagus brasiliensis* sofreu inibição nos pontos 1 da Lagoa de Santa Marta e no 3 da Lagoa do Camacho quando comparados aos Pontos Referência, na coleta de novembro/2004. Podendo indicar a

presença de OPs e CBs nos locais de coleta, e também de metais pesados no Ponto 1, onde são encontrados resíduos de carvão do Rio Tubarão. A inibição da atividade da acetilcolinesterase em organismos expostos a metais sobre condições *in vivo* e *in vitro* também foram demonstradas por BOCQUENÉ et al., 1990 e GUILHERMINO et al., 1998.

O ponto 2 da Lagoa do Camacho também apresentou uma atividade da acetilcolinesterase menor que o Ponto Referência, mas não apresentou diferença. Entre os pontos a atividade da acetilcolinesterase da coleta de nov/04 decresce na seguinte ordem: P2>P1>P3.

Quando comparados os resultados da atividade da enzima da coleta de junho/2005 com o Ponto Referência, todos os pontos de coleta apresentaram inibição da atividade da acetilcolinesterase. Sendo P1, o que apresentou maior inibição, seguidos de P2 e P3 que se igualaram, indicando uma distribuição homogênea de compostos potencialmente neurotóxicos na Lagoa do Camacho.

A presença de grandes cultivares de arroz na região desta Lagoa evidencia a presença de substâncias neurotóxicas vindas destes cultivares. MIRON et al. (2005), confirma a inibição da atividade da AChE em peixes da espécie *Rhamdia quelen* para três pesticidas (Clomazone, Quinclorac e Metil-Metsulfuron), amplamente utilizados em culturas de arroz no sul do Brasil. Por muitas razões as ocorrências mais severas ocasionadas pelo uso de pesticidas são registradas em países de Terceiro Mundo. No Brasil, resíduos de pesticidas excedem os limites toleráveis, principalmente em frutas (13.6%) e em vegetais (3.7%), demonstrando o uso indevido destes agrotóxicos (MANSOUR, 2004).

A existência de limiares extremamente baixos para indução dos efeitos inibitórios sobre a AChE, sugerem que a detecção em peixes é possível após a exposição a uma concentração mínima de pesticidas, por volta de 0.1 - 1µg l⁻¹ (HABIG et al., 1986).

A inibição da AChE pode ser perigosa para peixes, principalmente por atingir a atividade natatória, que comprometerá a alimentação e a fuga de predadores (BÁLINT et al., 1995).

Para a coleta de novembro/2005, novamente todos os pontos apresentaram maior inibição da atividade da acetilcolinesterase em relação ao Ponto Referência. Novamente o ponto 3 apresenta a maior inibição entre os pontos, como na coleta de nov/04, seguidos por P2 e P1, respectivamente.

Outra característica que pode influenciar na atividade da AChE é a variabilidade genética, que pode variar os níveis de atividade neural (KIRBY et al., 2000).

Entre as coletas, P1 apresentou sua maior inibição na atividade da acetilcolinesterase em junho/05, P2 e P3 em nov/05, o que pode estar relacionado a variação sazonal. MATOZZO, TOMEI e MARIN (2005), observaram uma variação sazonal em seus resultados para AChE em bivalvos coletados em períodos diferentes no Lago de Veneza.

Embora não tenha encontrado nenhum dado na literatura sobre atividade da acetilcolinesterase em *Geophagus brasiliensis*, esta espécie se mostrou um bom bioindicador para o uso deste biomarcador.

Na histopatologia de fígado em *Geophagus brasiliensis*, utilizou-se para comparação das lesões encontradas, como Centro de Melanomacrófagos – CMM, Melanomacrófagos Livres – ML, lesão total em fígado pelo índice de Bernet e ainda, cada lesão por Tabela de Ocorrência, os Pontos das Lagoas do Camacho e Santa Marta, e o Ponto Referência de janeiro/2005 (RF1).

Extensivos estudos nos EUA (*National Status and Trends Program*) e Europa (*International Council for the Exploration of the Sea, e North Sea Task Force Monitoring Master Plan*) têm estabelecido uma relação causal entre patologias em peixes e níveis de poluição em ambientes aquáticos. Nestes programas lesões histopatológicas em peixes servem como indicadores primários de exposição a contaminantes (AU, 2004).

Na análise de Melanomacrófagos livres não foram encontradas quaisquer diferenças entre os grupos. Macrófagos são grandes e irregulares células que ingerem partículas por fagocitose. No fígado eles fagocitam “lixo” celular e micróbios dentro do órgão. Centros de Melanomacrófagos em peixes têm se

provado sensíveis, mas não específicos como indicadores de exposição a contaminantes ambientais (RICE, 2001 *apud* AU, 2004).

Na coleta de Novembro/04 em relação ao Ponto Referência, foram encontradas diferenças apenas na Tabela de Ocorrência para Infiltração Leucocitária, onde todos os pontos (1, 2 e 3) apresentaram mais infiltração que RF1. Uma resposta inflamatória parece ter ocorrido neste período de coleta.

Entre os pontos de coleta não foram encontradas diferenças para nenhuma das análises.

Na coleta de Junho/05 em relação ao Ponto Referência, foram encontradas diferenças para todas as análises consideradas. Para contagem de CMM, P2 apresentou maior número de CMM/mm² que RF1. Para lesão total em fígado pelo índice de Bernet, todos os pontos (1, 2 e 3) apresentaram mais lesões que RF1. Para as lesões da Tabela de Ocorrência, todos os pontos apresentaram mais Infiltrações Leucocitárias que RF1 e P1 e P3 apresentaram maior quantidade de vacuolizações que RF1. A presença de vacuolizações nestes pontos pode ser resultado de uma dieta não balanceada (excesso de triglicerídeos, deficiência de proteínas) ou, mais provavelmente, pela disrupção enzimática da regulação lipídica causada por intoxicação (AKCHA, HUBERT e PFHOL-LESZKOWICZ, 2003). A indução de vacuolizações em peixes tem sido demonstrada *in vivo* após exposição a certos pesticidas (BRAUNBECK et al, 1990). *In situ*, vacuolizações são citadas em áreas contaminadas por HPA (LANDAHL et al, 1990). Neste estudo, a mistura de diversos contaminantes nas Lagoas pode ter causado este tipo de alteração.

Entre os pontos de coleta não obtivemos quaisquer diferenças.

Na coleta de Novembro/05 em relação ao Ponto Referência, P2 apresentou maior quantidade de CMM, todos os pontos apresentaram maiores índices de Bernet e número de Infiltrações Leucocitárias que RF1, e P1 e P3 maior número de vacuolizações. Para HINTON (1994) *apud* AU (2004), vacuolizações podem ser utilizadas como biomarcadores de avaliação de toxicidade crônica em peixes.

Uma das lesões que mais contribuíram para elevar o índice de lesão total em fígado entre os pontos de coleta foi a necrose. Necrose é uma típica lesão aguda, identificada em outros peixes expostos a diferentes contaminantes (OLIVEIRA

RIBEIRO et al., 1996 e 2002). A morte celular associada a este tipo de lesão não somente induz a resposta inflamatória, mas também diminui o número de células funcionais no tecido com conseqüências deletérias para a função do órgão (AKAISHI et al., 2004). Necrose pode ser resultado de diversos mecanismos, incluindo ruptura lisossomal, hipoxia tecidual e/ou aumento de peroxidase lipídica (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002).

Apenas na coleta de Novembro/05 foi evidenciada diferença entre os Pontos de Coleta para CMM e índice de Bernet, onde para contagem de CMM os pontos obedeceram a seguinte ordem (decrecente) P2>P3>P1; e para Bernet P2 e P3 se igualaram, mas tiveram maior índice de lesão total em fígado que P1.

Um alto número de CMM em peixes pode ser relacionado a um alto número de lixo celular resultante de necrose/degeneração de tecidos e/ou alta susceptibilidade a infecções bacterianas (AU, 2004).

Entre as coletas observamos diferenças para CMM e Bernet. Para CMM, P1 teve uma queda no número de CMM entre nov/04 e nov/05; e P2 aumentou a quantidade de CMM entre nov/04 e nov/05. Para índice total em fígado (Bernet), todos os pontos aumentaram o total de lesões entre nov/04 e jun/05, e se mantiveram iguais à jun/05 em nov/05.

O fígado é um órgão muito sensível a contaminantes ambientais, devido sua alta capacidade de acumular estes contaminantes, muitas vezes mais do que no próprio ambiente ou em outros órgãos (HEALTH, 1995 *apud* AU, 2004). Muitas pesquisas reportam mudanças histopatológicas em fígado de peixes expostos a um grande número de compostos orgânicos e metais pesados (HINTON e LAUREN, 1990 *apud* AU, 2004; RABITTO et al, 2005; BRAUNBECK et al, 1998 *apud* AU, 2004). Por exemplo, a maioria dos inseticidas são transformados em metabólitos pelo fígado, e em alguns casos os metabólitos são mais tóxicos que o produto original (FANTA et al., 2003).

Em muitas espécies a idade pode afetar a ocorrência de certas lesões hepáticas, incluindo neoplasmas, vacuolização, alteração celular, lesões proliferativas não-neoplásicas (MYERS et al., 1993 *apud* AU, 2004).

Algumas variações podem ter ocorrido durante as coletas, provavelmente de combinações de condições naturais e geradas pelo homem, tais como rápidas mudanças ocasionadas pela chuva ou pela entrada da água do mar (quando a Barra se encontrava aberta), ou pela variação de descargas de esgoto, pulverização de inseticidas e fertilizantes, ou mesmo pela variação de contaminantes gerada pelo Rio Tubarão.

6 CONCLUSÕES

A espécie *Geophagus brasiliensis* foi considerada sensível aos contaminantes existentes nas Lagoas do Camacho (SC) e Santa Marta (SC) mostrando-se um bom bioindicador para a região estudada;

Com base nos resultados obtidos para o ensaio cometa em eritrócitos, pode-se detectar a presença de substâncias com potenciais genotóxicos agudo nas Lagoas nos períodos próximos as coletas.

Um aumento gradual sazonal de substâncias com potenciais genotóxicos crônicos ou mesmo de suas concentrações foi observado através do ensaio cometa em células renais, bem como de substâncias aneugênicas e clastogênicas pelo teste do micronúcleo.

A inibição na atividade da acetilcolinesterase encontrada em todas as coletas indica uma contaminação por pesticidas; possivelmente vinda de agrotóxicos dos cultivos de arroz ao redor das Lagoas.

Os dados obtidos através do estudo histopatológico do fígado demonstraram a capacidade dos compostos presentes nas Lagoas de provocar lesões agudas e crônicas neste tecido na espécie *Geophagus brasiliensis*.

Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que a qualidade ambiental das Lagoas do Camacho (SC) e Santa Marta (SC) encontra-se comprometida, necessitando medidas emergenciais de controle de lançamento de contaminantes nas mesmas. Em contrapartida a qualidade da água do Parque Ecológico Costa (PR) não mostrou estar comprometida nos testes realizados no presente estudo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABILHOA, V.; DA SILVA, P.A. A alimentação de duas espécies de Ciclídeos (Perciformes, Cichlidae) em um reservatório eutrofizado na região metropolitana de Curitiba e sua relação com o aparelho digestório. IV Seminário do Projeto Interdisciplinar sobre Eutrofização de Águas de Abastecimento Público na Bacia do Altíssimo Iguaçu (IV.:2003 : Curitiba - PR). **Anais do IV Seminário do Projeto Interdisciplinar de Pesquisa em Eutrofização de Águas de Abastecimento – Curitiba**. p.149. 2003.

AKAISHI, F.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; JAKOBI, S.C.G.; EIRAS-STOFELLA, D.R.; ST-JEAN, S.D.; COURTENAY, S.C.; LIMA, E.F.; WAGENER, A.L.R., ESCOFIELD, A.L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Environ.Contam.Toxicol**. V. 46 p. 244 –253. 2004.

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

ALE, E.; FENOCCHIO, A.S.; PASTORI, M.C.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.; CESTARI, M.M.; ZACHARZEWSKI, C. Evaluation of the effects of (NO₃)₂ Pb on *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) by Means of Cytogenetic Techniques. **Cytologia**. V.69. p.453-458. 2004.

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

ANDREASSI, M.G.; PICANO, E.; DELRY S.; BOTTO, N.; COLOMBO, M.G.; GIANNESI, D.; LUBRANO, V.; VASSAALLE, C.; BIAGINI, A. Chronic-long term nitrate therapy: possible cytogenetic effect in humans? **Mutagenesis**. V.16. P.517–521. 2001.

ANDRIGHETTI-FROHNER, C.R.; KRATZ, J.M.; ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. *In vitro* testing for genotoxicity of violacein assessed by comet and micronucleus assay. **Mutation Research**. Article in press. 2005.

AOYAMA, K.; IWAHORI, K.; MIYATA; N. Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair. **Mutation Research**. v. 538 p.155-162. 2003.

AYLLON, F.; GARCIA-VASQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia*

latipinna: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**. V.467. p.177-186. 2000.

AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**. V. 48. p. 817-834. 2004.

BÁLINT, T.; SZEGLETES, T.; SZEGLETS, Zs.; HALASY, K.; NEMCSÓK, J. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. **Aquatic Toxicology**. V.33. p.279-295. 1995.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research** v.415 p.167-184 1998

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases** v.22 p.25-34 1999.

BHUNYA, S.P.; JENA, G.B. Clastogenic effects of copper sulphate in chick *in vivo* test system. **Mutation Research**. V.367. p.57-63. 1996.

BICKHAM, J. W.; SHABEG, S.; HEBERT, P.D.N.; CHIKHI, L.; ATHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**. v. 463 p. 33–51 2000.

BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F.; TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. **Mar. Environ. Res.** V. 30. p.75 –89. 1990.

BOMBAIL, V.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocyts from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere** v.44 p.383-392. 2001

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anat. Biochem.** V.72 p.248-254. 1976.

BRAUNBECK, T.; GÖRGE, G.; STORCH, V.; NAGEL, R. Hepatic steatosis in zebra fish (*Brachydanio rerio*) induced by long-term exposure to gamma-hexachlorocyclohexane, **Ecotoxicol. Environ. Safety**. V. 19. p. 355–374. 1990.

BUSCHINI, A.; CARBONI, P.; MARTINO, A.; POLI, P.; ROSSI, C. Effects of temperature on baseline and genotoxicant induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. **Mutation Research**. V.537. p.81-92. 2003.

CALZA, C.; ANJOS, M.J.; CASTRO, C.R.F.; BARROSOS, R.C.; ARAUJO, F.G.; LOPES, R.T. Evaluation of heavy metals levels in the Paraíba do Sul River by SRTXRF in muscle, gonads and gills of *Geophagus brasiliensis*. **Radiation Physics and Chemistry** 2004.

CARVALHO, C.S.; FERNANDES, M.N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquaculture**. 2005.

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

CESTARI, M.M.; LEMOS, P.M.M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; COSTA, J.R.M.A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M.V.M.; MANTOVANI, M.S.; FENOCCHIO, A.S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**. V.27. p.270-274. 2004.

COLLINS, A.R.; DOBSON, V.L.; DUSINSKA, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can really tell us? **Mutation Research** v.375 p.183-193. 1997.

COTELLE, S.; FERARD, J.F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environmental and Molecular Mutagenesis** v. 34 p.246-255. 1999.

DA SILVA, J. HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. **Genética Toxicológica** p.167-178. 2003.

DE LA SIENRAA, E.; ARMIENTAB, M.A.; GONSEBATTA, M.E. Potassium dichromate increases the micronucleus frequency in the crayfish *Procambarus clarkii*. **Environmental pollution**. v. 126 p. 367-370. 2003.

DE LEMOS, C.T.; TERRA, N.R. Poluição: Causas, efeitos e controle. **Genética Toxicológica** p.119-137. 2003

DEVAUX, A.; FLAMMARION, P; BERNARDON, V.; GARRIC, J.; MONOD, G. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). **Mar. Environ. Res.** v. 46 p.257-267. 1998

ELLMAN, G.L.; COUTNEY, K.O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v.7 p.88-95. 1961.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEIL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research** v.339 p. 37-59. 1995.

FANTA, E.; RIOS, F.S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A.C.C.; FREIBERG, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. 54. p. 119-130. 2003.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research** v.455 p.81-95. 2000

FERGUSON, H.W. **Systemic pathology of fish**. Iowa: Ames, 1989.

FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; CESTARI, M.M. Mutagenic effects of trybutyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**. V.27. p.103-107. 2004.

FERRARO, M.V.M. **Avaliação do efeito mutagênico do tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (PB II) em *Hoplias malabaricus* (piscis) através dos ensaios: cometa, micronúcleo e de aberrações cromossômicas**. 2003. Dissertação de mestrado: Departamento de Genética – Universidade Federal do Paraná

GAETKE, L.M.; CHOW, C.K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**. V.189. p.147-163. 2003.

GILL, T.S.; TEWARI, H.; PANDE, J.; Use of fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. **Comp.Biochem.Physiol**. V. 97C. p. 287 – 292. 1990.

GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detect by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research** v.426 p.183-188. 1999.

GUECHEVA, T.; HENRIQUES, J.A.P.; ERDTMANN, B. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian *in vivo*, studied with the single-cell gel test (comet assay). **Mutation Research** v.497 p.19-27. 2001.

GUILHERMINO, L.; BARROS, P.; SILVA, M.C.; SOARES, A.M.V.M. Should the use of inhibition of cholinesterases as a species biomarker for organophosphates and carbamate pesticides be questioned? **Biomarkers**. V. 3. p. 157 –163. 1998.

HABIG, C.; DI GIULIO, R.T.; NOMEIR, A.A.; ABOU-DONIA, A.M.B. Comparative toxicity, cholinergic effects and tissue levels of S, S, S-tri-n-butyl phosphorotrithioate (DEF) to Chanel cat fish (*Ictalurus punctatus*) and blue crab (*Callinectes sapidus*). **Aquatic Toxicology**. V. 9. p.193. 1986.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. 2^a ed. Boca Raton: CRC. 1995

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G.W.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research** v.123 p.61-118. 1983

HINTON, D.E.; LAUREN, D.J. integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American fisheries society symposium**. V. 8. p.51-66. 1990.

HOSE, J.E., CROSS, J., SMITH, S.G., DICHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminates sites off Southern California. **Mar. Environ. Res.**v. 22. p.167–176. 1987.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research** v.277 p.91-138. 1992.

INZUNZA, B.; ORREGO, R.; PEÑALOSA, M.; GAVILÁN, J.F.; BARRA, R. Analysis of CYP4501A1, PAHs metabolites in bile, and genotoxic damage in *Oncorhynchus mykiss* exposed to Biobío River sediments, Central Chile. **Ecotox. And Environ. Safety**. Article in press. 2005.

KAMMANN, U.; RIGGERS, J.C.; THEOBALD, N.; STEINHART, H. Genotoxic potential of marine sediments from the north sea. **Mutation Research**. v.467 p.161-168. 2000.

KIM, I.Y.; HYUN, C.K. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotox. And Environ. Safety**. Article in press. 2005.

KIRBY, M.F.; MORRIS, S.; HURST, M.; KIRBY, S.J.; NEALL, P.; TYLOR, T.; FAGG, A. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**. V. 40. p.780-791. 2000.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMAC, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLES, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Mutation Research**. v. 540 p.153-163. 2003.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖN, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research** v.453 p.45-50. 1996

KLEMZ, C. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus sp* (cascudo)**. 2002. Dissertação de Mestrado: Departamento de Farmacologia – UFPR.

KRUMSCHNABEL, G.; MANZL, C.; BERGER, C.; HOFER, B. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V.209. p.62-73. 2005.

LANDAHL, J.T.; MCCAIN, B.B.; MYERS, M.S.; RHODES, L.D.; BROWN, D.W. Consistent associations between hepatic lesions in english sole (*Parophrys vetulus*) and polycyclic aromatic hydrocarbons in bottom sediment. **Environ. Health Perspect.** V. 89. p. 195–203. 1990.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research** v.544 p.43-64. 2003

LEMO, N.G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUZA, A.T.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental, toxicology and pharmacology**. v. 19. p. 197-201. 2005.

LOUREIRO, M.A. **Análise citogenética em quatro espécies da família Cichlidae (Pisces, Perciformes)**. 1999. Dissertação de Mestrado: Departamento de Genética e Melhoramento – Universidade Estadual de Londrina.

MANSOUR, S.A. Pesticide exposure – Egyptian scene. **Toxicology**. V.198. p.91-115. 2004.

MANZL, C.; ENRICH, J.; EBNER, H.; DALLINGER, R.; KRUMSCHNABEL, G. Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. **Toxicology**. V.196. p.57-64. 2004.

MATOZZO, V.; TOMEI, A.; MARIN, M.G. Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. **Marine Pollution Bulletin**. Article in press. 2005.

MAVOURNIN, K.H.; BLAKEY, D.H.; CIMINO, M.C.; SALAMONE, M.F.; HEDDLE, J.A. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat. Res.** V.239. p.29–80. 1990.

MELA, M. **Uso de biomarcadores na avaliação dos efeitos do metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK,1974) (Traíra)**. 2004. Dissertação de Mestrado: Departamento de Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal do Paraná.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**. v. 367 p.245-251. 1996.

MIRON, D.S.; CRESTANI, M.; SHETTINGER, M.R.; MORSH, V.M.; BALDISSEROTTO, B.; TIerno, M.A.; MORAES, G.; VIEIRA, V.L.P. effects of the herbicide clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotox. And Environ. Safety**. V.61. p.398-403. 2005.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. **Aquatic Toxicology** v. 41 p.161-182. 1998a.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research** v.399 p.135-147. 1998b.

NACCI, D.E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology** v.35 p.197-210. 1996

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FANTA, E.; TURCATTI, N.M.; CARDOSO, R.J.; CARVALHO, C.S. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis*. **Biocell**. V. 20 p.171 –178. 1996.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; SCHARTZMANN, M.; DE ASSIS, H.C.S.; SILVA, P.H.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F.M. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.51 p.161-167. 2002.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environ Mol Mutagen**. v. 26. p.345–356. 1995.

PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L.L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Mar.Pollut.Bull**. v. 32. p. 225 –231. 1996.

PELLACANI, C.; BUSCHINI, A.; FURLINI, M.; POLI, P.; ROSSI, C. A battery of *in vivo* and *in vitro* tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. **Aquatic Toxicology**. Article in press. 2005.

PHELPS, B.J.; GARRIOTT, M.L.; HOFFMAN, W.P. A protocol for the *in vitro* micronucleus test II Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from na examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. **Mutation Research**. v. 521 p. 103-112. 2002

PORTO, J.I.R.; ARAUJO, C.S.O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**. v. 97. p. 287-292. 2005.

POUGH, H.F.; HEISSER, B.J.; McFARLAND, W.N. **A vida dos vertebrados**. 2^a ed. São Paulo. Editora Atheneu. 1999

PRÁ, D.; LAU, A.H.; KNAKIEVICZ, T.; CARNEIRO, F.R.; ERDTMANN, B. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. **Mutation Research**. V.585. p.79-85. 2005.

RABITTO, I.S. **Análise dos efeitos tóxicos do TBT (tributilestanho) e chumbo inorgânico (Pb⁺⁺) em *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) (traíra) após exposição trófica e subcrônica: aspectos morfológicos e neurotóxicos**. 2003. Dissertação de Mestrado: Departamento de Biologia Celular – Universidade Federal do Paraná.

RABITTO, I.S.; COSTA, J.R.M.A.; DE ASSIS, H.C.S.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F.M.; ANJOS, A.; RANDI, M.A.F.; RIBEIRO, C.A.O. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 60 p. 147-h156. 2005.

RANK, J.; JENSEN, K.; JESPERSEN, P.H. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled in costal sites from Denmark. **Mutation Research**. V.585. p.33-42. 2005.

RASGAMAR, Ong. **Panfleto de divulgação**. Laguna – SC. 2005.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas- RS. Editora da ULBRA. 2003. 356p.

RODRIGUEZ-CEA, A.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: na evaluation of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V.56 p.442–448. 2003.

ROLLA, A.P.P.R.; SIMIONATTO, K.B.; DA SILVA, M.E.P.A.; NETO, F.B.R.; FERREIRA, L.I. Biologia de *Geophagus brasiliensis* no reservatório de Jaguari, Sistema Cantareira, SP. **XV Encontro Brasileiro de Ictiologia**. São Paulo. 2003.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A.R.; IZQUIERDO, J.I.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity test: differential sensitivity to heavy metals. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 43. p.301–304. 1999.

SASAKI, Y.F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOMO, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research.** V.393. p.133-139. 1997.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente.** São Paulo. 5ª ed. Editora Santos. 1996

SCHWANTES, A.R.; BARTLETTI, G.R.; SCHWANTES, M.L.B. The hemoglobin of *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 998 p.157-160. 1991.

SILVA DE ASSIS, H.C. **O uso de biomarcadores para avaliação de poluição aquática.** 1998. Tese de Doutorado: Technische Universität Berlin.

SILVANO, J. **Avaliação de metais na água, no sedimento e nos peixes, da Lagoa Azul, formada por lavra de mineração de carvão a céu aberto, Siderópolis (SC).** 2003. Dissertação de Mestrado: Departamento de Ecologia – UFRGS.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research.** v.175 p.184-191. 1988.

STENESH, J. **Biochemistry.** New York. Editora Plenum. 1998.

STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.D. Cholinesterase of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination nature. **Environmental Research** v.47 p.189-198. 1999.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features.** 2ª ed. New York. 1995

TICE, R.; VASQUEZ, M. Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. **Environmental Mutagenesis** p.315-339 1999

VILLELA, I.V.; LAU, A.; SILVEIRA, J.; PRÁ, D.; ROLLA, H.C.; SILVEIRA, J.D. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. **Genética Toxicológica.** p.147-161. 2003

WILLIAMS, R.C.; METCALFE, C.D. Development of an *in vitro* hepatic micronucleus assay with rainbow trout. **Aquatic Toxicology** v.23 p.193-202. 1992

WINTER, M.J.; DAY, N.; HAYES, R.A.; TAYLOR, E.W.; BUTLER, P.J.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. **Mutation Research** v.552 p.163-175. 2004

YENDLE, J.E.; TINWELL, H.; ELLIOT, B.M. ASHBY, J. The genetic toxicity of time: importance of DNA – unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. **Mutation Research** v.375 p.125-136. 1997

ZINKL, G.J.; LOCKHART, W.L.; KENNY, S.A.; WARD, F.J. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. **Cholinesterase inhibiting insecticides**. p. 233. Ed. P.Mineau. Elsevier, Amsterdam. 1991.

8 APÊNDICES

APÊNDICE 1: SOMA DE MN E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES ENCONTRADAS EM *Geophagus brasiliensis*.

Animal	Coleta Laguna Novembro/2004			Coleta Costa Janeiro/2005 PR	Coleta Laguna Junho/2005			PR	Coleta Costa Agosto/2005			Coleta Laguna Novembro/2005		
	P1	P2	P3		P1	P2	P3		Controle Positivo I	Controle Positivo II	Controle Positivo III	P1	P2	P3
1	1	2	0	0	5	1	1	1	40	12	Morreram	18	2	4
2	3	0	0	0	3	0	0	0	6	3	Morreram	8	11	26
3	0	0	1	0	1	6	4	1	1	15	Morreram	17	19	3
4	3	0	0	0	10	0	0	0	7	1	Morreram	9	21	4
5	1	0	0	0	3	10	3	1	9	21	Morreram	9	26	15
6	1	0	0	0	1	1	1	1	0	2	Morreram	6	4	9
7	0	3	1	0	16	0	4	0	3	4	Morreram	6	5	10
8	2	3	0	0	7	2	1	0	0	0	Morreram	9	12	5
9	0	1	1	0	3	4	0	1	2	0	Morreram	15	7	9
10	1	0	0	0	1	0	0	3	6	0	Morreram	7	14	17
11	2	1	0	0	3		3	2	13	6	Morreram	15	5	2
12	0	0	0	0	2	4	1	0	5	0	Morreram	23	4	3
13	0	1	0	1	4	6		1	3	2	Morreram	7	28	17
14	0	0	0	0		2	2	1	10	0	Morreram	21	3	2
15	0	0	0	0	13		0	0	0	18	Morreram	3	9	13
16	0	0	1	1	3	0	0	0	1	7	Morreram	11	35	1
17	0	0	0	0	4	0	2	0	0	1	Morreram	7	18	22
18	0	0	0	0	0	2		1	2	0	Morreram	7	9	7
19	1	1	1	0		0	2	2	10	2	Morreram	1	5	11
20	0	0	0	0	11	2	1	0	0	morreu	Morreram	9	12	8
21	1	0	0	2	2	1	2	1	0	morreu	Morreram	22	3	3
22	6	0	3	0	0		3	0	1	morreu	Morreram	9	4	24
23	0	0	1	1	1	2		0				25	12	5
24	0	0	0	0	1	0	0	0				5	15	26
25	1	0	0	0	3	2		0				19	28	16
26	0	0	0	0	1	0		5				9	4	4
27	0	0	2	0	8		1	2				8	15	5
28	1	0	0	0	4		3	1				8	8	3
29		0	0	0	7	4	3	1				13		6
30	1	0	0	1	8	0	9	0				11	3	5

APÊNDICE 2: ESCORES ENCONTRADOS PARA O ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE *Geophagus brasiliensis*.

Animal	Coleta Laguna Novembro/2004			Coleta Costa Janeiro/2005	Coleta Laguna Junho/2005			Coleta Costa Agosto/2005						Coleta Laguna Novembro/2005		
	P1	P2	P3	PR	P1	P2	P3	PR	Controle Positivo I	Controle Positivo II	Controle Positivo III	P1	P2	P3		
1	181	56	354	26	382	144	390	159	314	152	400	102	334	297		
2	205	99	134		344	192	392	103		228	400		174	188		
3	209	125	210	47	351	360	364	96	204	281	400	244	182	139		
4	58		183	42	302	360	368	134	194	242	400	327	219	166		
5	169	101	157	24	382	377	393	64	268	202	400	303	239	180		
6	109	86	122	42	388	314	387	60	225	284	400	222	255	182		
7	98	62	142	37	388	304	388	148	338	250	400	262	183			
8	255	60	199	42	370	228	383	124	131	304	400	194	139	235		
9	327	141	81	57	396	324	279	88	267	256	400	95	188	199		
10	254	105	163	51	385	242	377	117	172	193	400	177	169	235		
11	215	236		51	289	385	343	52	134	254	400	187	272	275		
12	88	109	18	64	331	274	365	110	245		400	316	282	295		
13	59	102	127	46	264	347	314	112	247	269	400	205	177	246		
14	56	145	2	1	396		368	16	203	180	400	269	110	268		
15	57	163	14	120	392		355	79	301	238	400	232	147	224		
16	115	198	45	43	357	174	396	139	289	233	400		122	126		
17	139	241	40	26	379	232	367		214	204	400	175	247	100		
18	148	255	61	18	269	278	336	80	313	260	400	184	161	211		
19	129	97	51	81	374	202	385	144	323	283	400	247	167	140		
20	137	54	71	98	375	358	334	120	265	400	400	293	166	261		
21	177	155	155	57	400	290	353	83	294	400	400	184	181	153		
22	154	167	171	5	371	377	363	145	213	400	400	153	150	252		
23	158	124	177	29	389	177	390	24				138	167	146		
24	190	168	147	13	381	343		85				212	214	205		
25	116	144	144	30	376	315	388	112				262	204	261		
26	154	230	164	96	388	186	351	79				93	201	206		
27	124	68	130	12	334	206	383	132				258	156	149		
28	116	55	103	82	327	365	368	101				59	179	183		
29	59	137	92	10	373	335	357	72				248	142	96		
30	163	164	90	84	383	288	351	101				178	157			
Soma	4419	3847	3547	1376	10836	7977	10588	2879	5154	5513	8800	5819	5684	5618		
Mediana	143,5	125	130	42	375,5	297	368	101	247	254	400	208,5	178	202		

APÊNDICE 3: ANÁLISE ESTATÍSTICA – TESTE DE KRUSKAL-WALLIS – PARA ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS

H =	276,7712	
Graus de liberdade =	13	
(p) Kruskal-Wallis =	0	
<p>p (1 e 2) = 0,4982</p> <p>p (1 e 3) = 0,3263</p> <p>p (1 e 4) = 0,0006</p> <p>p (1 e 5) = 0</p> <p>p (1 e 8) = 0,0585</p> <p>p (1 e 9) = 0,0051</p> <p>p (1 e 10) = 0,0007</p> <p>p (1 e 11) = 0</p> <p>p (1 e 12) = 0,0799</p> <p>p (2 e 3) = 0,761</p> <p>p (2 e 4) = 0,0055</p> <p>p (2 e 6) = 0</p> <p>p (2 e 8) = 0,2246</p> <p>p (2 e 9) = 0,0006</p> <p>p (2 e 10) = 0,0001</p> <p>p (2 e 11) = 0</p> <p>p (2 e 13) = 0,0228</p> <p>p (3 e 4) = 0,0135</p> <p>p (3 e 7) = 0</p> <p>p (3 e 8) = 0,3627</p> <p>p (3 e 9) = 0,0002</p> <p>p (3 e 10) = 0</p> <p>p (3 e 11) = 0</p> <p>p (3 e 14) = 0,0066</p> <p>p (4 e 5) = 0</p> <p>p (4 e 6) = 0</p> <p>p (4 e 7) = 0</p> <p>p (4 e 8) = 0,1185</p> <p>p (4 e 12) = 0</p> <p>p (4 e 13) = 0</p> <p>p (4 e 14) = 0</p> <p>p (5 e 6) = 0,0065</p> <p>p (5 e 7) = 0,7374</p> <p>p (5 e 8) = 0</p> <p>p (5 e 9) = 0,0012</p> <p>p (5 e 10) = 0,0078</p> <p>p (5 e 11) = 0,131</p> <p>p (5 e 12) = 0</p> <p>p (6 e 7) = 0,0171</p> <p>p (6 e 8) = 0</p> <p>p (6 e 9) = 0,464</p> <p>p (6 e 10) = 0,874</p> <p>p (6 e 11) = 0,0001</p> <p>p (6 e 13) = 0,0249</p> <p>p (7 e 8) = 0</p> <p>p (7 e 9) = 0,0034</p>	<p>Legenda:</p> <p>2 (P2nov/04)</p> <p>3 (P3nov/04)</p> <p>4 (RF1)</p> <p>5 (P1jun/05) Não significativo</p> <p>6 (P2jun/05) Significativo</p> <p>7 (P3jun/05)</p> <p>8 (RF2)</p> <p>9 (CI)</p> <p>10 (CII)</p> <p>11 (CIII)</p> <p>12 (P1nov/05)</p> <p>13 (P2nov/05)</p> <p>14 (P3nov/05)</p>	<p>p (7 e 10) = 0,0186</p> <p>p (7 e 11) = 0,069</p> <p>p (7 e 14) = 0</p> <p>p (8 e 12) = 0,0003</p> <p>p (8 e 13) = 0,0005</p> <p>p (8 e 14) = 0,0003</p> <p>p (9 e 10) = 0,5933</p> <p>p (9 e 11) = 0</p> <p>p (9 e 12) = 0,2337</p> <p>p (9 e 13) = 0,1832</p> <p>p (9 e 14) = 0,2397</p> <p>p (10 e 11) = 0,0001</p> <p>p (10 e 12) = 0,0776</p> <p>p (10 e 13) = 0,0568</p> <p>p (10 e 14) = 0,0809</p> <p>p (11 e 12) = 0</p> <p>p (11 e 13) = 0</p> <p>p (11 e 14) = 0</p> <p>p (12 e 13) = 0,8791</p> <p>p (12 e 14) = 0,9942</p> <p>p (13 e 14) = 0,8744</p>

APÊNDICE 4: ESCORES ENCONTRADOS PARA O ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAIIS DE *Geophagus brasiliensis*.

Animal	Coleta Laguna Novembro/2004			Coleta Costa Janeiro/2005	Coleta Laguna Junho/2005			Coleta Costa Agosto/2005				Coleta Laguna Novembro/2005		
	P1	P2	P3	PR	P1	P2	P3	PR	Controle Positivo I	Controle Positivo II	Controle Positivo III	P1	P2	P3
1	24	45	19	71	397	41	61	141	195	112	400	166	184	172
2	16	30	64	14	222	58	107	138	354	259	400		157	152
3	20	31	61	5	214	12	81	64	201	308	400	226	95	195
4	59		60	35	79	107	35	134	294	254	400	174	143	152
5	138	108	53	29	252	20	61	118	333	262	400	97	142	122
6	216	62	48		132	36	103	30	181	287	400	122	160	146
7	138	54	16	29	187	32	198	45	27	273	400	142	93	156
8	41	51	24	47	219		73	49	152	291	400	148	102	145
9	37	8	13	41	109	43	17		214	195	400	160	111	100
10	115	22	24	1	160	42	78	76	163	152	400	214	72	127
11	117	49	12	51	281	81	32	83	287	84	400	101	110	80
12	18	88	21	45	124	56	30	68	279	239	400	231	107	63
13	8	36	12	34	148	89	112	133	247	332	400	120	166	147
14	25	109	9	17	282	40	95	55	193	170	400	86	114	127
15	25	52	54	47	189	86	88	77	139	285	400	220	85	122
16	10	75	19	7	217	56	125	99	217	271	400	249	88	109
17	36	12	18	25	188	82	337	112	306	136	400	157	122	90
18	48	63	25	25	219	47	96	22	243	143	400	156	98	109
19	35	120	10	34	244	77	88	129	263	246	400	160	128	136
20	14	34	12	13	227	24	53	43	255	400	400	102	170	130
21	88	52	14	34	203	33	64	58	310	400	400	148	77	136
22	46	152	26	48	203		363	19	194	400	400	180	123	147
23	36	94	18	4	203	23	309	92				110	132	86
24	49	56	23	45	216	96	107	43				90	183	105
25	31	57	25	36	197	20	151	42				119	229	126
26	53	62	15	2	355	23	159	52				142	112	116
27	26	88	36	67	280	99	165	9				119	75	144
28	18	65	7	37	155	152		21				158	120	108
29	41	42	20		215	157	145	41				80	80	170
30	13	40	16	20	156	77	148	29				90	90	
Soma	1541	1757	774	863	6273	1709	3481	2022	5047	5499	8800	4267	3668	3718
Mediana	36	54	19,5	34	208,5	51,5	96	58	230	260,5	400	148	113	127

APÊNDICE 5: ANÁLISE ESTATÍSTICA – TESTE DE KRUSKAL-WALLIS –
PARA ENSAIO COMETA EM CÉLULAS RENAIIS.

H = 282,8606			
Graus de liberdade = 13			
(p) Kruskal-Wallis = 0			
p (1 e 2) =	0,4717	Legenda: 1 (P1nov/04) 2 (P2nov/04) 3 (P3nov/04) 4 (PRF1) 5 (P1jun/05) Significativo 6 (P2jun/05) Não significativo 7 (P3jun/05) 8 (RF2) 9 (CI) 10 (CII) 11 (CIII) 12 (P1nov/05) 13 (P2nov/05) 14 (P3nov/05)	
p (1 e 3) =	0,1072		
p (1 e 4) =	0,1974		
p (1 e 5) =	0		
p (1 e 8) =	0,2476		
p (1 e 9) =	0		
p (1 e 10) =	0		
p (1 e 11) =	0		
p (1 e 12) =	0		
p (2 e 3) =	0,0198		
p (2 e 4) =	0,0446		
p (2 e 6) =	0,8224		
p (2 e 8) =	0,6625		
p (2 e 9) =	0		
p (2 e 10) =	0		
p (2 e 11) =	0		
p (2 e 13) =	0,0006		
p (3 e 4) =	0,7477		
p (3 e 7) =	0	p (7 e 11) =	0
p (3 e 8) =	0,0057	p (7 e 14) =	0,1626
p (3 e 9) =	0	p (8 e 12) =	0,0002
p (3 e 10) =	0	p (8 e 13) =	0,0027
p (3 e 11) =	0	p (8 e 14) =	0,0009
p (3 e 14) =	0	p (9 e 10) =	0,8322
p (4 e 5) =	0	p (9 e 11) =	0,0589
p (4 e 6) =	0,0744	p (9 e 12) =	0,0375
p (4 e 7) =	0	p (9 e 13) =	0,0061
p (4 e 8) =	0,0145	p (9 e 14) =	0,0169
p (4 e 12) =	0	p (10 e 11) =	0,0936
p (4 e 13) =	0	p (10 e 12) =	0,021
p (4 e 14) =	0	p (10 e 13) =	0,003
p (5 e 6) =	0	p (10 e 14) =	0,0089
p (5 e 7) =	0,0002	p (11 e 12) =	0
p (5 e 8) =	0	p (11 e 13) =	0
p (5 e 9) =	0,7978	p (11 e 14) =	0
p (5 e 10) =	0,6285	p (12 e 13) =	0,4724
p (5 e 11) =	0,0223	p (12 e 14) =	0,7251
p (5 e 12) =	0,0474	p (13 e 14) =	0,7182
p (6 e 8) =	0,5087		
p (6 e 9) =	0		
p (6 e 10) =	0		
p (6 e 11) =	0		
p (6 e 13) =	0,0003		
p (7 e 8) =	0,05		
p (7 e 9) =	0,0002		
p (7 e 10) =	0,0001		

APÊNDICE 6: VALORES ENCONTRADOS PARA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM MÚSCULO DE *Geophagus brasiliensis*.

Animal	Coleta Laguna Novembro/2004			Coleta Costa Janeiro/2005	Coleta Laguna Junho/2005			Coleta Costa Agosto2005	Coleta Laguna Novembro/2005		
	P1	P2	P3	PR	P1	P2	P3	PR	P1	P2	P3
1	25,78353	31,28603	23,73595	48,73615946	19,74955	18,29999	20,45453398	32,54936073	29,6696	15,64716	13,8444
2	8,935013	26,82648	19,40405	41,28167891	9,892221	9,568643	21,60412241	26,27065013	22,43329	17,0094	6,663193
3	25,21551	47,040	15,342	23,49072741	11,024	8,008	32,36779115	43,39104685	21,42316	22,13025	11,37051
4	20,44517	32,324	14,436	43,26028686	20,016	6,463	24,75036074	32,500704	31,68567	19,8102	8,246854
5	21,49878	29,353	11,924	42,17521176	29,298	23,530	23,96582688	33,01801728	26,31923	20,72932	8,866633
6	31,452	30,649	22,861	20,896	6,597	27,158	24,51139329	27,63968062	31,1719	15,02202	8,199027
7	32,160	24,895	21,034	28,660	5,821	24,483	18,81793012	41,95459845	22,16106	18,53609	8,011971
8	14,177	19,266	16,065	33,173	10,158	18,36889	26,83741494	37,71749548	14,70375	12,4595	16,97369
9	24,629	39,79902	22,75371	24,922	15,02021	26	10,14795416	29,85351382	29,77055	10,37091	14,27563
10	20,172	38,86615	25,95895	26,479	14		18,79768534	25,36902906	25,58595		12,9408

APÊNDICE 7: ÍNDICE DE LESÃO TOTAL EM FÍGADO SEGUNDO BERNET
ENCONTRADO EM *Geophagus brasiliensis*.

Animal	Coleta Laguna Novembro/2004			Coleta Costa Janeiro/2005	Coleta Laguna Junho/2005			Coleta Laguna Novembro/2005		
	P1	P2	P3	PR	P1	P2	P3	P1	P2	P3
1	0	0	0	0	13	5	17	0	7	6
2	0	0	1	0	6	21	18	4	10	10
3	0	0	0	0	9	16	21	2	19	8
4	3	0	2	0	18	14	11	0	13	0
5	0	0	2	0	9	4	21	3	21	21
6	3	1	2	0	6	4	34	4	12	25
7	1	0	2	0	6	19	30	0	16	29
8	0	0	0	0	9	10	23	12	11	34
9	0	0	2	0	1	12	19	14	7	24
10	0	0	0	0	4	24	4	1	12	18