

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HALINA BINDE DORIA

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA QUALIDADE DE ÁGUA DOS
RESERVATÓRIOS DE ALAGADOS E VOSSOROÇA COM O USO DE
BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO

CURITIBA

2014

HALINA BINDE DORIA

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA QUALIDADE DE ÁGUA DOS
RESERVATÓRIOS DE ALAGADOS E VOSSOROÇA COM O USO DE
BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia
Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Ferreira Randi

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

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Doria, Halina Binde

Avaliação preliminar da qualidade de água dos reservatórios de Alagados e Vossoroca com o uso de biomarcadores de contaminação. / Halina Binde Doria. – Curitiba, 2014.
80 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Marco Antonio Ferreira Randi

Co-orientador: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Reservatorios. 2. Contaminação. 3. Água – Qualidade. I. Título. II. Randi, Marco Antonio Ferreira. III. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

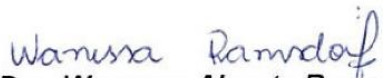
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Marco Antonio Ferreira Randi
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Daniel Bussolaro
Instituto Federal do Paraná - IFPR

Suplente:

Prof. Dra. Olga Meiri Chaim
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a mestranda **Halina Binde Doria**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Avaliação preliminar da qualidade de água dos reservatórios de Alagados e Vossoroca com o uso de biomarcadores de contaminação", são de parecer favorável à APROVAÇÃO..... da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2014


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Prof. Dr. Marco Antonio Ferreira Randi pela confiança, paciência, orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Ciro Alberto de Olivera Ribeiro, pelos conselhos e orientação.

Ao Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos e a UEPG pela parceria nas análises químicas.

À Carmen e toda sua família que me recebeu em Ponta Grossa e ajudou na coleta dos peixes até as três da manhã em um dia frio de primavera.

Aos meus pais pelo amor dedicado e pelo apoio incondicional à todas as minhas escolhas.

Às minhas amigas Renata, Flávia, Ana Carolina, Ana Luísa e Brenda e a todos meus colegas de laboratório que ajudaram no andamento do meu mestrado.

À todos os amigos e amigas que sempre estenderam a mão e se alegraram com minhas vitórias.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os reservatórios de Alagados e Vossoroca são considerados moderadamente poluídos, pelo Instituto Ambiental do Estado do Paraná (IAP), com base apenas em parâmetros físico-químicos da água. Sabe-se que apenas análises químicas podem não ser suficientes para caracterizar efeitos adversos de misturas complexas dos xenobióticos em ambientes aquáticos. Dessa forma, nesse estudo utilizou-se determinação dos níveis de metais na água e no sedimento e avaliação de saúde de uma espécie de peixe nativa (*Geophagus brasiliensis*) com o uso de diversos biomarcadores para avaliar a qualidade da água e avaliar a saúde da fauna aquática. Indivíduos de *Geophagus brasiliensis* foram capturados em um ponto de amostragem no reservatório de Vossoroca (VOS) e em três locais distintos do reservatório de Alagados (AL - A, AL - B, AL - C), visando a identificar diferentes tipos de poluição, doméstica e agrícola, do ambiente em estudo. Sangue, músculo, cérebro, fígado e brânquias foram coletados para análises bioquímicas (AChE, GST, GSH, SOD, CAT, PCO e LPO), análises morfológicas (microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz) e análise de desregulação endócrina em machos. Água e sedimentos foram coletados para análise dos níveis de metais em espectrometria de absorção atômica (FAAS). Embora não tenham sido encontradas diferenças nas frequências relacionadas às alterações morfológicas nas brânquias entre os dois reservatórios, Vossoroca apresentou menor concentração de todos os metais analisados e índice de lesão menor na análise histopatológica do fígado quando comparado com Alagados. Os valores encontrados nos peixes coletados em Vossoroca para a atividade SOD e níveis de GSH em *G. brasiliensis* foram semelhantes a resultados encontrados em áreas não poluídas. Alagados apresentou todas as concentrações de metais, exceto para Co e de Zn, acima do limite legal em pelo menos um dos pontos analisados. Além disso, o ponto AL - A indica ser mais impactado por atividades antrópicas, já que tem maior concentração de Cu, Mn, Co e Al na coluna d'água e maiores atividades de SOD e CAT no fígado, em comparação com os outros locais analisados no mesmo reservatório. Não foi detectada desregulação endócrina em machos coletados em Alagados. De acordo com os resultados apresentados, no presente estudo são expostas contribuições importantes para melhorar o conhecimento sobre a resposta ao estresse para a espécie nativa *Geophagus brasiliensis*. Os melhores biomarcadores para a avaliação dos danos causados pela exposição crônica a xenobióticos, especialmente metais, foram a atividade da AChE muscular e cerebral, avaliação histopatológica do fígado e contagem de centros de melanomacrófagos.

Palavras-chave: *Geophagus brasiliensis*, bioacumulação, bioconcentração, metais tóxicos, reservatórios.

ABSTRACT

Alagados and Vossoroça reservoirs are considered moderately polluted, by the environmental agency of the State of Paraná, based only on physical-chemical parameters of water. Regarding that chemical analysis alone may not be enough to describe adverse effects of complex mixtures of chemicals in aquatic environments, in this study we employed the determination of metal levels in water and sediment and health evaluation of a native fish species (*Geophagus brasiliensis*) through a multi biomarker approach to assess water quality and evaluate health of the aquatic fauna. Individuals of *Geophagus brasiliensis* were captured at one sampling point in Vossoroça (VOS) and at three distinct locals of Alagados (AL – A, AL – B, AL – C) aiming at a variety of environmental influence levels. Blood, muscle, brain, liver and gills were collected to biochemical (AChE, GST, GSH, SOD, CAT, PCO and LPO), morphological (light microscopy and scanning electron microscopy) and endocrine disrupting analyses. Water and sediment were collected for metal levels analysis in flame atomic absorption spectrometry (FAAS). Although no differences in frequencies related to the morphological changes in gills were found between the two reservoirs, smaller concentration of all metals analyzed and smaller lesion index in histopathological analysis of liver were observed in VOS when compared to Alagados reservoir. SOD activity and GSH levels in *G. brasiliensis* in VOS were similar to results observed in non-polluted areas. Alagados exhibited all metal levels, except for Co and Zn concentrations, above the legal limit in at least one of the points analyzed. In addition, AL – A indicated to be more impacted by anthropogenic activities, as it has higher concentration of Cu, Mn, Co and Al in water column and higher activities of SOD and CAT in liver compared to the other analyzed sites. No endocrine disruption was detected in males from Alagados reservoir. According to the present results, this work has important contributions to improve knowledge about the response to stressors presenting (performed by/shown by) *Geophagus brasiliensis* species. The best biomarkers for the assessment of damage caused by chronic exposure to xenobiotics, especially metals, were the activity of AChE in muscle and brain, histopathological evaluation of liver and counting of melanomacrophage centers.

Keywords: *Geophagus brasiliensis*, bioaccumulation, bioconcentration, toxic metals, reservoirs.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: EXEMPLAR ADULTO DE GEOPHAGUS BRASILIENSIS	15
FIGURA 2: SUGESTÃO DE RESPOSTA PROGRESSIVA DO ORGANISMO FRENTE À EXPOSIÇÃO A UM XENOBIÓTICO.....	16
FIGURA 3: POSSÍVEIS RESPOSTAS DOS ORGANISMOS À POLUIÇÃO AMBIENTAL.....	17
FIGURA 4: VISTA DA MARGEM DO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS.....	28
FIGURA 5: VISTA PARCIAL DO RESERVATÓRIO DE ALAGADOS.....	30
FIGURA 6: MAPA DA LOCALIZAÇÃO DOS RESERVATÓRIOS DE ALAGADOS E VOSSOROCA.....	34
FIGURA 7: BIOMARCADOR DE NEUROTOXICIDADE EM GEOPHAGUS BRASILIENSIS.....	46
FIGURA 8: BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO DE GEOPHAGUS BRASILIENSIS.....	46
FIGURA 9: BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE GEOPHAGUS BRASILIENSIS	47
FIGURA 10: ELETROMICROGRAFIAS DE BRÂNQUIAS DE GEOPHAGUS BRASILIENSIS COLETADOS EM ALAGADOS	50
FIGURA 11: ELETROMICROGRAFIA DE BRÂNQUIAS DE GEOPHAGUS BRASILIENSIS COLETADOS EM VOSSOROCA.....	51
FIGURA 12: ÍNDICE DE LESÃO HISTOPATOLÓGICA E CONTAGEM DE CMMs EM FÍGADO DE GEOPHAGUS BRASILIENSIS	52
FIGURA 13: CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE GEOPHAGUS BRASILIENSIS COLETADOS EM ALAGADOS	54
FIGURA 14: CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE GEOPHAGUS BRASILIENSIS COLETADOS EM VOSSOROCA.....	55
FIGURA 15: WESTERN BOLTING DE PLASMA DE GEOPHAGUS BRASILIENSIS COM PRESENÇA DE VTG	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ANALISADAS NO FÍGADO.	41
TABELA 2: DADOS GERAIS SOBRE OS ORGANISMOS COLETADOS.....	44
TABELA 3: ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS NA COLUNA D'ÁGUA.....	45
TABELA 4: ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS NOS SEDIMENTOS.	45
TABELA 5: BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM GEOPHAGUS BRASILIENSIS COLETADOS EM VOSSOROCA.....	48
TABELA 6: FREQUÊNCIAS RELATIVAS DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ENCONTRADAS EM BRÂNQUIAS DE GEOPHAGUS BRASILIENSIS.....	49
TABELA 7:ÍNDICE DE LESÃO E CONTAGEM DE CMMS EM FÍGADO DE GEOPHAGUS BRILIENSIS COLETADOS EM VOSSOROCA.....	53
TABELA 8: FREQUÊNCIAS RELATIVAS DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM FÍGADO DE GEOPHAGUS BRASILIENSIS.....	53

SUMÁRIO

1.1	POLUIÇÃO AQUÁTICA: METAIS	12
1.2	BIOINDICADOR: <i>Geophagus brasiliensis</i>	13
1.3	BIOMARCADORES	15
1.3.2	Neurotoxicidade – Acetilcolinesterase (AChE).....	17
1.3.3	Biotransformação de xenobióticos	18
1.3.4	Estresse Oxidativo.....	19
1.3.5	Histopatologia.....	25
1.3.6	Desregulação endócrina – Vitelogenina (VTG).....	25
1.4	ÁREAS DE ESTUDO	26
1.4.2	Represa do Alagados	27
1.4.3	Represa do Vossoroca	29
2.	JUSTIFICATIVA	30
3.	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4.	METODOLOGIA	32
4.1	COLETA DE MATERIAL.....	32
4.2	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	35
4.2.2	Neurotoxicidade – Acetilcolinesterase (AChE).....	35
4.2.3	Estresse Oxidativo e Biotransformação	36
4.3	HISTOPATOLOGIA	40
4.3.2	Microscopia eletrônica de varredura	40
4.3.3	Microscopia de luz.....	40
4.4	BIOMARCADOR MOLECULAR – PRESENÇA DE VITELOGENINA..	42
4.4.2	Separação eletroforética das proteínas do plasma	42
4.4.3	Western blotting.....	43
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5.	RESULTADOS	44

5.1	ANÁLISE QUÍMICA.....	44
5.2	ANÁLISE DOS BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	45
5.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	48
5.3.2	Microscopia eletrônica de varredura	48
5.3.3	Microscopia de luz.....	52
5.4	ANÁLISE DA PRESENÇA DE VITELOGENINA	55
6.	DISCUSSÃO	57
7.	CONCLUSÕES	65

1. INTRODUÇÃO

A noção de progresso e de crescimento ilimitado, difundida mundialmente a partir do período pós-guerra da década de 40, postulava que o bem-estar da sociedade somente seria atingido com um amplo e custoso crescimento econômico. Mesmo após o malogro dessa ideologia tanto na esfera social, na qual não houve a construção de uma sociedade igualitária, como também na esfera ambiental, em que o uso dos recursos naturais levaram à deterioração e escassez dos mesmos, a época em questão se tornou um marco histórico no qual o desenvolvimento da população humana passou a estar diretamente ligado aos riscos da degradação ambiental (SCOTTO et al., 2007). Nas décadas seguintes, irrompeu a necessidade da conciliação entre crescimento econômico, superação da pobreza e preservação do meio ambiente. Com suporte nesses três pilares surge uma nova proposta para gerir a sociedade chamada de desenvolvimento sustentável.

A água é um recurso fundamental e indispensável à vida, sendo que o uso irracional desta já configura como uma das principais preocupações da sociedade atual. Ainda que o Brasil apresente uma situação privilegiada, pois abriga aproximadamente 15% das reservas de água doce mundial, essa riqueza já está comprometida pelo acelerado crescimento populacional, do qual decorrem os aumentos da demanda por água potável e da poluição. Assim, se há o desejo de melhorar a qualidade da água destinada ao consumo humano, compreender como os reservatórios e a saúde da vida aquática são prejudicados pela atividade antrópica não é apenas necessário, mas também vital.

Nesse contexto, visando a questão do abastecimento e da qualidade da água disponibilizada à população, o presente estudo teve como principal finalidade avaliar, de forma preliminar, a qualidade da água das represas de Alagados e Vossoroca pela determinação de metais pesados no sedimento e na coluna d'água feita em parceria com o grupo de Química Analítica Ambiental e Sanitária – QAAS da UEPG. Ainda, considerando que a análise química por si só não é suficiente para avaliação dos efeitos adversos das

misturas complexas nos ecossistemas aquáticos, uma espécie nativa de peixe foi escolhida como bioindicador para avaliação de qualidade de água sendo empregada respostas de biomarcadores histológicos, bioquímicos e moleculares.

1.1 POLUIÇÃO AQUÁTICA: METAIS

Ininterruptamente, xenobióticos provenientes de atividades antropogênicas como comunidades urbanas, propriedades rurais e indústrias são lançados no ambiente em grandes quantidades formando misturas complexas com grande poder de oxidação (RUAS et al., 2007). O destino final de todos esses contaminantes tanto por aporte direto como indireto, via processos atmosféricos e hidrológicos, são os corpos d'água. Uma vez nesses ambientes os xenobióticos causam a deterioração da qualidade da água que resulta em sérios problemas ambientais como, por exemplo, efeitos deletérios aos organismos aquáticos, que variam desde respostas celulares e bioquímicas até alterações de comportamento, crescimento e reprodução (CHOVANEC et al., 2003; VAN DER OOST et al., 2003; RUSSO et al., 2004; KAR et al., 2008). Pode-se ressaltar ainda as implicações diretas para a saúde humana quando da contaminação das águas destinadas ao abastecimento público, ou indiretas pela acumulação dos xenobiontes por organismos aquáticos que são alimento para a população (HEATH, 1995).

A poluição do ambiente por metais se deu desde muito cedo na história do homem. Com a domesticação do fogo e a deposição de pequenas quantidades de resíduos durante atividades de metalurgia, os níveis dessas substâncias já se alteravam nos ambientes de cavernas em que habitavam os primeiros hominídeos (NRIAGU, 1996). Além da metalurgia, os metais também eram usados como purificadores de água pelos egípcios em 3.000 a.C. e vários eram empregados na fabricação de medicamentos (BERALDO, 2005). Sabe-se que a toxicidade global anual dos metais mobilizados pela atividade antrópica excedeu, desde a década de 80, a toxicidade resultante dos desperdícios orgânicos e radioativos (NRIAGU & PACYNA, 1988).

Os metais diferem de outras substâncias tóxicas porque não são criados nem destruídos tanto por processos biológicos quanto químicos, porém devido às atividades antropogênicas e consequente manipulação destes sua biodisponibilidade no meio ambiente aumentou a níveis preocupantes (EPA, 2007; CASTRO-GONZÁLES & MÉNDEZ-ARMENTA, 2008). Assim, mesmo que a toxicocinética e toxicodinâmica dependam do metal, da forma ou valência em que é encontrado, das condições físico-químicas do ambiente em que ocorre e da capacidade do organismo em estudo para regular e/ou armazenar esses compostos (EPA, 2007), eles são considerados potencialmente perigosos, tóxicos e capazes de desencadear efeitos biológicos adversos quando em concentrações elevadas, além de serem bioacumuláveis e biomagnificáveis ao longo da cadeia alimentar devido sua persistência no ambiente (DALLINGER & RAINBOW, 1993; RAINBOW, 2007; SOLOMON, 2008). Os metais de maior importância para os estudos de toxicologia aquática são o cobre, zinco, prata, cádmio, mercúrio, manganês, cromo, chumbo, níquel, arsênico e alumínio (HEATH, 1995).

Metais como mercúrio, manganês e chumbo são amplamente conhecidos por desempenharem papéis importantes no desenvolvimento de diversas doenças neurodegenerativas e causarem disfunção neurológica em diversos organismos (CHARLET et al., 2012). Cobre, cádmio, zinco, prata, alumínio entre outros metais são considerados potencialmente genotóxicos e promotores de estresse oxidativo e problemas osmorregulatórios em diversos organismos (BOUSKILL et al., 2006; SANCHEZ et al., 2005; ATLI & CANLI, 2007; CAMARGO et al., 2009; COSTA et al., 2009).

1.2 BIOINDICADOR: *Geophagus brasiliensis*

Bioindicadores são organismos que carregam informações sobre a qualidade do meio ambiente e devem tanto descrever seu habitat natural quanto responder rapidamente a estágios iniciais de exposição à intervenção antrópica destrutiva, de forma que se possa detectar e avaliar os efeitos

causados por xenobiontes presentes no ambiente em estudo (ADAMS, 2002; CHOVANEC et al., 2003; FRANZLE, 2003; LI et al., 2010).

Um bioindicador ideal deve apresentar algumas características chave como: ser facilmente identificável por pessoas não especializadas e abundante no ambiente estudado, apresentar baixa mobilidade e características ecológicas bem conhecidas e, principalmente, relativa sensibilidade a estressores ambientais e capacidade para a quantificação e padronização (LI et al., 2010). Peixes são considerados ótimas espécies sentinelas, pois devido à maior longevidade em comparação a outros organismos bioindicadores, processos de bioacumulação são facilmente detectáveis. Além de que, como consumidores primários e secundários em diferentes níveis os peixes refletem também a biomagnificação ao longo da cadeia alimentar (CHOVANEC et al., 2003).

O cará (Figura 1), *Geophagus brasiliensis*, pertence à família dos ciclídeos, que é uma das famílias de vertebrados com maior número de espécies conhecidas e tem distribuição natural restrita a América do Sul e Central, África e Índia (MAZZONI & IGLESIAS-RIOS, 2002). A espécie distribui-se no sul, sudeste e nordeste brasileiros, sendo um dos peixes mais abundantes no período do verão em ambientes lênticos de reservatórios e lagos (PARAGUASSÚ et al., 2005; BENINCÁ, 2006). O cará é territorialista e apresenta cuidado parental, construindo ninhos e cuidando da prole; seu período reprodutivo em ambientes lacustres se dá entre final de verão e início de outono (LOWE-McCONNELL, 1999; MAZZONI & IGLESIAS-RIOS, 2002). Onívoro de hábito bentopelágico, forrageia o sedimento a procura de pequenos invertebrados, principalmente insetos e microcrustáceos (MORAES et al., 2004), porém também se alimenta de frutos e sementes, peixes e larvas de insetos (BENINCÁ, 2006; PARAGUASSU et al., 2005). Em seu ambiente natural, podem atingir de 25 a 30 centímetros.

Dessa forma, como o *Geophagus brasiliensis* já foi utilizado como bioindicador em diversos trabalhos de campo (WILHEM FILHO et al., 2001; BENINCÁ, 2006; RUAS et al., 2008; CLEMENTE, 2009; OSÓRIO, 2010) e é uma espécie que apresenta os requisitos chaves de um bioindicador ideal, foi a espécie escolhida para esse trabalho.



Figura 1: Exemplar adulto de *Geophagus brasiliensis*. Fonte: Internet <<http://www.flickr.com/photos/27354184@N02/11123156773>>

1.3 BIOMARCADORES

Por definição da National Academy of Sciences dos Estados Unidos (1977), biomarcadores são “variações em compostos celulares ou bioquímicos ou processos, estruturas ou funções induzidos por um xenobiótico, que são mensuráveis num sistema biológico”. Assim, o uso desses é o meio mais efetivo para prever efeitos adversos de poluentes, provendo informações sobre os efeitos biológicos de xenobióticos em vez de apenas quantificar seus níveis no meio ambiente (VAN DER OOST et al., 2003).

Existem três categorias para classificação de biomarcadores: os de efeito, os de exposição e os de susceptibilidade. Biomarcadores de exposição podem confirmar apenas se ocorreu ou está ocorrendo a exposição individual ou de um grupo à substâncias nocivas, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna, sem permitir qualquer inferência a respeito do grau de efeitos adversos causados; metalotioneínas podem ser citadas como exemplo. Já os classificados como de efeito podem ser usados para documentar as alterações ou efeitos adversos à saúde dos organismos avaliados decorrentes da exposição e absorção de xenobióticos, refletindo a interação da substância com os receptores biológicos (IPCS, 1993; AMORIM, 2003). Geralmente, as alterações bioquímicas podem ser consideradas marcadores tanto de exposição como de efeito. O terceiro

tipo é chamado biomarcador de susceptibilidade, que indica quais fatores podem aumentar ou diminuir um risco individual no desenvolvimento da resposta do organismo decorrente da exposição aos agentes químicos ambientais, como exemplo a enzima glutationa-S-transferase (RUDIGER, 1999; AMORIM, 2003).

Alguns biomarcadores apresentam vantagens únicas de muitas vezes fornecerem resposta rápida à exposição e permitirem a quantificação apenas dos xenobióticos biologicamente disponíveis; como monitores de efeito, permitem também a avaliação da integração dos efeitos de múltiplos estressores (FRANZLE, 2003). Isso estabelece uma melhor articulação entre a exposição e o efeito biológico, principalmente em estudos de campo. Avaliar a toxicidade e o impacto de poluentes no meio ambiente com estudos macroecológicos de populações e comunidades além de complexos, tendem a manifestar efeitos observáveis após longos períodos de exposição, quando os distúrbios ecológicos já são graves e praticamente irreversíveis (MOORE et al., 2002; AMORIM, 2003). No presente estudo o foco foi dado à avaliação de biomarcadores nos níveis celular, tecidual e de órgãos (Figuras 2 e 3).

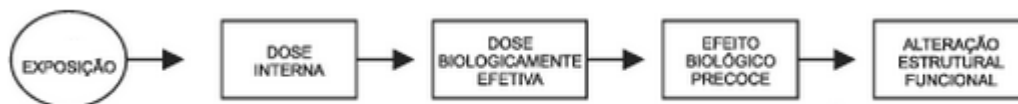


Figura 2: Sugestão de resposta progressiva do organismo frente à exposição a um xenobiótico. Fonte: AMORIM, 2003 modificado pela autora.



Figura 3: Possíveis respostas dos organismos à poluição ambiental. Agentes biológicos mais simples possuem rápida resposta à perturbação (biomarcadores), com capacidade de previsibilidade, fundamental para estudos ecotoxicológicos. Fonte: A autora, 2013.

1.3.2 Neurotoxicidade – Acetilcolinesterase (AChE)

As enzimas usadas como biomarcadores de neurotoxicidade são as colinesterases, sendo o principal tipo a acetilcolinesterase (AChE) que é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. A AChE encontra-se distribuída na superfície externa da membrana pós-sináptica dos neurônios e a hidrólise ocorre logo após a ligação acetilcolina-receptor, sendo o receptor nicotínico da membrana pós-sináptica seu alvo. Isso desencadeia a abertura de canais de íons Na^+ , e a posterior despolarização da membrana, o que gera um potencial de ação, e permite a propagação do impulso. Assim, enquanto há a diminuição da quantidade de neurotransmissor, há também a diminuição do potencial pós-sináptico (SHIMIDT-NIELSEN, 1996); esse mecanismo previne a passagem contínua de impulsos nervosos.

Com a inibição dessa enzima não ocorre a degradação da acetilcolina na fenda sináptica e há sobreposição de impulsos causados pela permanência dos canais de Na^+ abertos, então comportamentos como hiperatividade, asfixia e morte podem ocorrer (ROEX et al., 2003).

Na década de 1950, a AchE foi proposta como biomarcador específico para compostos organofosforados e carbamatos (WEISS, 1958), pois eles são inibidores específicos do sítio ativo da AChE. Porém, nas últimas décadas tem sido relatada a inibição das colinesterases, em várias espécies, por outros contaminantes ambientais, inclusive metais. (GUILHERMINO et al., 2000; MONTSERRAT et al., 2007).

1.3.3 Biotransformação de xenobióticos

A biotransformação é uma etapa importante na detoxificação e eliminação de substâncias nocivas, pois a transformação metabólica de compostos é fundamental para que a atividade biológica destes seja alterada de modo a cessar a interação entre o elemento químico e a célula (FLORIO, 2002). Existem duas fases nesse processo: Na fase I podem ocorrer oxidação, redução e hidrólise. A primeira fase fornece os grupos funcionais que possibilitam as reações da próxima fase. As reações de fase II podem ser precedidas ou não pelas de fase I, e incluem glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com glutathione, aminoácidos e ácidos graxos (PARKINSON, 2001; ROCHA, 2004).

Esse processo ocorre principalmente no tecido hepático, mas as enzimas responsáveis pelo processo existem em diversos órgãos, sobretudo nos tecidos situados nas principais vias de entrada, como trato gastrointestinal, pele, pulmão e mucosa nasal, e normalmente consiste na conversão de substâncias lipofílicas em metabólitos finais mais hidrossolúveis e, por consequência, mais facilmente excretáveis (VAN DER OOST et al., 2003; ROCHA, 2004). Entretanto, esse processo pode também alterar a toxicidade de um composto, o que pode ser benéfico ou prejudicial para o organismo. No caso de uma reação de desintoxicação, a toxicidade dos compostos é reduzida enquanto que a excreção deste é geralmente elevada. No caso de bioativação, no entanto, o composto é transformado num metabólito secundário mais reativo que o composto original (VAN DER OOST et al., 2003).

1.3.3.1 Glutationa- S- transferase (GST)

A GST representa uma importante família de isoenzimas pertencentes à fase II de biotransformação. São multifuncionais, diméricas, estão presentes no citosol das células e tem papel como catalisadoras da conjugação do tripeptídeo glutationa reduzida (GSH) com vários compostos eletrofílicos oriundos da fase I (VAN DER OOST et al., 2003).

Dentre inúmeras funções dessa enzima, uma das mais importantes é a defesa contra danos oxidativos e produtos da peroxidação do DNA e de lipídios (VAN DER OOST et al., 2003). Ligando-se covalentemente a compostos eletrofílicos, as GSTs reduzem a probabilidade desses compostos se ligarem a outras moléculas celulares (HUGGETT et al., 1992). Assim, a toxicidade de muitos compostos exógenos pode ser modulada pela indução da atividade da GST (VAN DER OOST et al., 2003).

Enzimas de biotransformação, como a GST, são consideradas muito sensíveis a variações no ambiente celular e por isso, sua atividade é empregada como um biomarcador de biotransformação (COSTA et al., 2012).

1.3.4 Estresse Oxidativo

O oxigênio é fundamental para os organismos aeróbios, pois é utilizado na transdução de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos, ou na membrana celular de muitas bactérias, além da essencialidade em várias outras vias metabólicas. Porém, seu consumo gera substâncias tóxicas intra e extracelulares. Isso ocorre porque quando o oxigênio molecular consumido pela célula é reduzido à água, acoplado à oxidação de alimentos e transformação de energia como, por exemplo, durante o transporte de elétrons, pode ocorrer a redução parcial do O₂. Isso resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que compreendem espécies não radicais, como o peróxido de hidrogênio, e radicais livres que são

moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. (NORDBERG & ARNÉR, 2001; LIVINGSTONE, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

As EROs são continuamente produzidas pelo metabolismo celular normal, e desempenham papéis fisiológicos importantes como na sinalização intracelular, regulação do estado redox (NORDBERG & ARNÉR, 2001), controle da ventilação respiratória, apoptose, diferenciação e desenvolvimento celular, aderência de leucócitos a células endoteliais ou mesmo na ativação da resposta imunológica específica contra patógenos no processo inflamatório (DRÖGE, 2002). Mais recentemente foi descrito, em *Danio rerio*, o controle do ritmo circadiano pelo peróxido de hidrogênio e da enzima que o degrada, a catalase (HIRAYAMA et al., 2007).

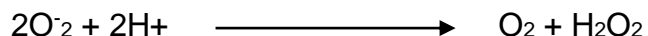
Entretanto, a taxa de produção de EROs pode elevar-se na presença de diversos xenobióticos (LIVINGSTONE, 2001). Quando essa situação acontece as EROs, por serem muito reativas, podem interagir com uma gama de biomoléculas como e proteínas e lipídios prejudicando o funcionamento celular. Porém, vários mecanismos de defesa existem para prevenir danos causados por EROs. Elas podem ser neutralizadas ou degradadas pelos organismos por defesas antioxidantes como a vitamina C e a glutatona reduzida (GR), ou por enzimas antioxidantes específicas como superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona-peroxidase (GPX). Quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e os sistemas antioxidantes, pode acontecer uma situação denominada estresse oxidativo (LIVINGSTONE, 2001), definido como uma perturbação na homeostase do organismo, resultado das ações de estímulos intrínsecos ou extrínsecos, comumente definidos como estressores (WENDELAAR BONGA, 1997).

A taxa de produção de EROs pode elevar-se na presença de diversos xenobióticos (LIVINGSTONE, 2001), tornando-os importantes objetos de estudo na toxicologia ambiental. Vários mecanismos de defesa celular existem para prevenir danos causados por EROs. Elas podem ser neutralizadas ou degradadas pelos organismos por defesas antioxidantes como a vitamina C e a glutatona reduzida (GR), ou por enzimas antioxidantes específicas como superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona-peroxidase (GPX). Entretanto, quando há desequilíbrio entre a produção de EROs e os sistemas antioxidantes, pode acontecer uma situação denominada estresse oxidativo

(LIVINGSTONE, 2001), definido como uma perturbação na homeostase do organismo, resultado das ações de estímulos intrínsecos ou extrínsecos, comumente definidos como estressores (WENDELAAR BONGA, 1997). Nesse caso é comum que as defesas antioxidantes da célula falhem no sentido de proteção contra as EROs e essas reajam com diversas proteínas, carbonilando-as ou com a membrana plasmática tornando-a mais rígida e comprometendo processos de transporte através da membrana.

1.3.4.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD é uma metaloenzima que desempenha papel antioxidante central e tem grande importância, pois é observada em todos os organismos aeróbicos. Age sobre o radical do ânion superóxido (O_2^-) dismutando-o a H_2O_2 (VAN DER OOST et al., 2003; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

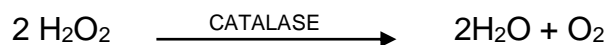


Existem diferentes formas de SOD que podem variar quanto à estrutura e localização. Em eucariotos são encontradas duas principais isoformas no citosol, que também podem estar presentes nos lisossomos, peroxissomos, núcleo e espaço intermembranoso das mitocôndrias na forma SOD-CuZn (possui cobre e zinco em seu sítio ativo), enquanto que na mitocôndria se encontra a forma SOD-Mn, com manganês em seu sítio ativo (HERMES- LIMA, 2004).

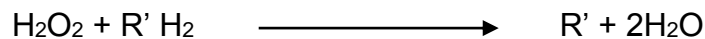
Em relação à presença de contaminantes, em diversos estudos foi demonstrado que a atividade da SOD tende a ser maior em peixes expostos a poluentes, de forma que a atividade dessa enzima pode ser usada para mensuração de efeitos adversos resultantes da exposição a xenobióticos. Ela é induzida muito rapidamente (poucas horas), especialmente se a produção de EROs não for muito alta (VAN DER OOST et al., 2003).

1.3.4.2 Catalases (CAT)

As catalases são enzimas que tem um grupamento heme e estão localizadas principalmente nos peroxissomos de células eucarióticas. Elas catalisam a eliminação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), liberando como produtos água e oxigênio molecular (VAN DER OOST et al, 2003). A reação predominante depende da concentração de doadores de H e da concentração ou taxa de produção de H_2O_2 no sistema. Entretanto, enquanto a reação peroxidativa é relativamente lenta, a decomposição do H_2O_2 ocorre rapidamente (AEBI, 1984; VENTURA, 2004)



As catalases também atuam na detoxificação de diferentes substratos na oxidação de doadores de H, como fenóis e alcoóis, via redução acoplada de peróxido de hidrogênio:



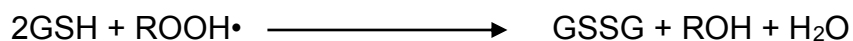
Uma das funções antioxidantes da catalase é reduzir o risco da formação do radical hidroxil a partir da H_2O_2 via reação de Fenton, catalisada por íons metálicos de cobre e ferro principalmente (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

1.3.4.3 Glutationa Reduzida (GSH) e glutaciona oxidada (GSSG)

A glutaciona é um tripeptideo linear constituído por ácido glutâmico, glicina e cisteína (VAN DER OOST et al., 2003). É encontrada nas formas reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG) agindo de maneira significativa na manutenção celular.

A glutaciona atua na defesa antioxidante de três maneiras distintas: como substrato da glutaciona peroxidase (GPX) na eliminação de peróxidos, na

redução da forma oxidada da vitamina C, permitindo a manutenção da vitamina E na sua forma reduzida e funcional e, por último, atua como substrato da GST na biotransformação de fase II (KIDD, 1997; VAN DER OOST et al., 2003; JESWINDER et al., 2004). Durante o processo de detoxificação a GSH é oxidada a GSSG, e por isso, a relação GSH/GSSG pode ser utilizada para estimar o estado redox de um sistema biológico e como um indicador de estresse oxidativo.



Onde: ROOH• é um hidroperóxido.

Após a formação da GSSG, a ação da glutathione redutase (GR) a reduz para a forma GSH, disponibilizando-a novamente e fechando o ciclo (HAYES et al., 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

Como atua na síntese de DNA e de proteínas diversas, a depleção de GSH provocada pela ação de poluentes pode afetar a transcrição de enzimas de detoxificação, o que pode provocar danos irreversíveis à célula e levar ao processo apoptótico (VAN DER OOST et al., 2003).

1.3.4.4 Carbonilação de proteínas (PCO)

A carbonilação de proteínas é um dos principais marcadores de estresse oxidativo devido diretamente aos radicais livres (PANTKE et al., 1999). A principal modificação proteica originada pelo aumento da concentração de EROs relaciona-se diretamente à oxidação de aminoácidos contendo um grupo tiol. Assim, a carbonilação é a presença de grupos carbonilas, tais como aldeídos e cetonas, nas proteínas quando da interação dessas com açúcares reduzidos ou substâncias oxidadas como os carboidratos e lipídios peroxidados durante o processo da glicolisação (HERMES-LIMA, 2004; ASHRAF & REGNIER, 2010).

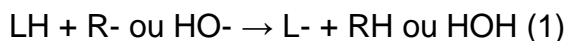
Proteínas carboniladas são mais hidrofóbicas e resistentes a proteólise. Estão associadas a processos de injúrias e envelhecimento de células e

tecidos (PANTKE et al., 1999).

1.3.4.5 Lipoperoxidação (LPO)

O processo de lipoperoxidação, ou oxidação de lipídios tem grande potencial como biomarcador porque a oxidação de ácidos graxos polinsaturados é uma consequência do estresse oxidativo. Ela ocorre por uma cadeia de reações envolvendo três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. Iniciada pela retirada de um átomo de hidrogênio de um grupo metil (-CH₂) de um ácido graxo polinsaturado através do ataque de uma molécula reativa, como EROs ou metais, formando um radical de carbono. Oxirradicais, particularmente -OH, podem realizar essa abstração (VAN DER OOST, 2003).

Início da peroxidação lipídica:

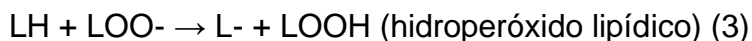


LH = lipídeo polinsaturado

Propagação da lipoperoxidação:



Término da lipoperoxidação



O término da peroxidação lipídica é o resultado da interação de radicais lipídicos e/ou formação de espécies não radicais por radicais lipídicos peroxil. Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O LOOH resultante pode facilmente se decompor em espécies reativas, sendo muitos desses agentes tóxicos e mutagênicos. As membranas lipídicas peroxidadas

tornam-se rígidas e perdem sua permeabilidade e, eventualmente, a integridade (SEVANI & MCLEOD, 1997; VALAVANIDIS et al., 2006).

1.3.5 Histopatologia

Alterações histopatológicas resultam de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, representando um nível intermediário de organização biológica. Essas mudanças podem levar a formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos. A histologia é uma ferramenta conveniente porque alterações histopatológicas não apenas são uma resposta a baixas concentrações de agentes tóxicos, indicando contaminações ou situações de estresse precocemente, como também representam uma integração dos efeitos cumulativos dos estressores (HINTON et al., 1992; BERNET et al., 1999; MYERS & FOURNIE, 2002).

Quando há a exposição de peixes a xenobióticos é provável que haja indução de lesões em diferentes órgãos (BERNET et al., 1999), sendo que alguns são considerados alvos para a análise histopatológica. O fígado desempenha papel principal no metabolismo e é o principal órgão envolvido na detoxificação de xenobióticos nos vertebrados. Ele produz a maioria do vitelo transferido aos óvulos e pode ter função hematopoiética (HEATH, 1995; BERNET et al., 1999). As brânquias, por estarem em contato direto com a água, são extremamente vulneráveis a danos causados por fatores externos como os xenobióticos, especialmente quando dissolvidos na água (PAWERT et al., 1998).

1.3.6 Desregulação endócrina – Vitelogenina (VTG)

Várias espécies ovíparas, como os teleósteos, expressam a vitelogenina, uma lipofosfoglicoproteína de elevado peso molecular, precursora do vitelo (SPECKER, 1994). A síntese dela é regulada pelo eixo

neuroendócrino, principalmente pela presença do hormônio estradiol, onde um estímulo externo condiciona um estímulo interno, havendo um *feedback* positivo do eixo endócrino (NAGLER & IDLER, 1990; SINGH & SINGH, 1991; ARUKWE & GOKSOYR, 2003).

A vitelogenese é o processo onde a vitelogenina é produzida pelo fígado de fêmeas em época reprodutiva e transportado para os ovários via corrente sanguínea, onde ele é armazenado como vitelo para reserva alimentar dos embriões, sendo essencial para o desenvolvimento dos ovócitos durante o processo de oogênese (SUMPTER & JOBLING, 1995).

Machos também possuem o gene para VTG, mas ele é normalmente inativo devido aos baixos níveis de estradiol circulantes. Entretanto, a síntese de VTG em machos pode ser induzida pelo tratamento com estrógeno exógeno (FLOURIOT et al., 1997; WAHILI et al., 1998). O tratamento com compostos estrogênicos pode resultar em danos para a função gonadal, como a diminuição da quantidade de esperma, alterações celulares severas e diminuição do índice gonadossomático (ORLANDO et al., 1999; KINNBERG et al., 2000; SHIODA & WAKABAYASHI, 2000). Estudos demonstram a produção de VTG em machos através da exposição ao 17 α -Estradiol (ANDERSEN et al., 2003; BRAATHEN et al., 2009), ao 17 β -Estradiol (COSTA, 2009) e aos PCBs (VEGA-LÓPEZ et al., 2006).

Para detectar a expressão desta proteína em machos expostos a desreguladores endócrinos, é possível utilizar técnicas como o ensaio de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (VEGA-LÓPEZ et al., 2006), e o *Western blotting* (WATTS et al., 2003) que envolvem a utilização de anticorpos antivitelogenina.

1.4 ÁREAS DE ESTUDO

A construção de reservatórios de água a partir do represamento de rios tornou-se corrente no Brasil a partir da década de 60, época em que a capacitação tecnológica e de mão de obra foi atingida (ALBUQUERQUE FILHO, et al., 2010). Os reservatórios apresentam uma série de benefícios

como: produção de energia elétrica renovável e não poluente, fonte de água para abastecimento, geração de oportunidades para o turismo e o esporte, desenvolvimento da aquicultura, navegação e implantação de corredores hidroviários, aumento do potencial de irrigação e desenvolvimento da agropecuária local, controle de enchentes e inundações e regularização de vazões (ALBUQUERQUE FILHO, et al., 2010; MANNICH et al., 2011).

Porém, quando de seu uso indevido, muitas dessas vantagens acabam intimamente ligadas a progressiva degradação da qualidade de água desses ambientes. Os despejos de esgotos urbanos, industriais e agrícolas e o uso indevido da terra às margens dos lagos são os principais problemas que acarretam prejuízos, muitas vezes irreversíveis aos ecossistemas aquáticos e à qualidade das águas, tornando-as impróprias para o abastecimento público e comprometendo a qualidade de vida da população local (ANDREOLI et al., 2000).

1.4.2 Represa do Alagados

Em 1929, com o represamento do Rio Pitangui, foi formada a represa de Alagados, situada entre os municípios de Ponta Grossa, Castro e Carambeí, nas coordenadas geográficas 24° 52' a 25° 05' S e 49° 46' a 50 ° 06' W, distante 20 km do centro de Ponta Grossa. Construída pela Companhia Prada de Electricidade S/A e inicialmente destinada ao aumento da capacidade de geração de energia pela Usina Pitangui, a represa passou, em 1977, a abastecer a cidade de Ponta Grossa, sendo hoje responsável por aproximadamente 40% do abastecimento de água da cidade. Atualmente, abastece também as cidades de Castro e Carambeí e é considerada um dos principais recursos hídricos do estado do Paraná e da região dos Campos Gerais. Tem extensão aproximada de 15 km, largura média de 500 metros e profundidade variando de 15 metros na região próxima à barragem e de 2 a 5 metros no restante da área (NUCLEAM, 2002; MORAES, 2007; IAP, 2009).

Além de atividades de lazer, balneário, pesca, prática de esqui aquático e passeios de barcos a motor serem corriqueiros no lago (NUCLEAM, 2002),

atividades agrícolas como o cultivo de soja, milho, feijão, trigo, cevada, aveia e sorgo, e pecuárias tendo como exemplo a suinocultura, avicultura e bovinocultura são praticadas no entorno do reservatório (Figura 4). Já foi observado que áreas de preservação permanente estão, em parte, comprometidas com o avanço da agricultura e das criações de animais próximas às nascentes, corpos hídricos e às margens do reservatório, que não raro não estão adequadas à legislação ambiental em vigência (CLEMENTE, 2009). Há também o acúmulo de dejetos de bovinos e equinos, que são conduzidos diretamente aos corpos hídricos, devido ao excessivo volume e falta de manejo adequado por parte dos pecuaristas (WIECHETECK et al., 1999).

A cobertura florestal original, nomeada como Campos Gerais, estrutura fisionômicas correspondente à vegetação gramínea nativa e matas de araucária, foi amplamente substituída pelas plantações e pastagens. Atualmente, a vegetação ciliar ao longo da margem do reservatório é composta por pequenas áreas arbóreas dispersas, predominantemente compostas de espécies exóticas como o pinus (ABELHA & GOULART, 2008).



Figura 4: Vista da margem do Reservatório de Alagados. Destaque para a plantação de soja ao fundo e construções na margem. Fonte: CLEMENTE, 2009.

Ainda, há registros de inúmeras áreas de exploração minerária caracterizada pela extração de bens minerais de utilização imediata na construção civil como areia, brita, cascalho e saibro, de baixo valor agregado. A maior parte dessa atividade é realizada à céu aberto, de forma clandestina e sem planejamento técnico, contribuindo com processos erosivos acentuados, resultando em considerável assoreamento no leito dos rios e da represa (WIECHETECK et al., 1999; ANDRADE FILHO et al., 2011).

Nos relatórios do Instituto Ambiental do Paraná (IAP), divulgados em 2004 e 2009, o reservatório Alagados chegou a ser considerado criticamente degradado a poluído nos anos de 2006 e 2007. Porém, atualmente, é considerado como moderadamente degradado por apresentar altos valores de fósforo total e ser considerado eutrófico a hipertrófico. Ainda, pode-se destacar a presença de uma floração permanente de *Cylindospermopsis raciborskii*, mantida principalmente pelas altas concentrações de fósforo na água. Essas algas são capazes de produzir diversas toxinas como a cilindrospermopsina, a saxitoxina e a anatoxina (CHORUS & BARTRAM, 1999), porém as cepas encontradas no território brasileiro são principalmente produtoras de saxitoxina, que apresenta ação neurotóxica (JONES & SAUTER, 2005; CLEMENTE et al., 2009).

Há registros de diversos problemas e irregularidades ambientais da bacia já identificados por estudos anteriores (WIECHETECK et al., 1999; MORAES et al., 2007; VIANNA & MENDES, 2008; CLEMENTE, 2009).

1.4.3 Represa do Vossoroca

Pertencente à bacia do Rio São João, e formado pelo represamento do mesmo, o Reservatório do Vossoroca foi construído em 1949, abrange uma área de 5,1 km² e possui profundidade média de 8 m e máxima de 17 m. Situado no município de Tijucas do Sul, está localizado nas coordenadas geográficas 25° 52' S e 49° 00' W, tem como função principal regularizar a vazão para a usina hidrelétrica de Chaminé, situada a 7,1 km à jusante, e não é utilizada para abastecimento público (IAP, 2009; MANNICH et al., 2011). O

reservatório está inserido na Área de Preservação Ambiental (APA) de Guaratuba (Figura 5), com exceção de duas pequenas porções ao sul da rodovia BR-376. Entretanto, considera-se a possibilidade da presença de contaminantes derivados das atividades agrícolas que ocorrem no à montante da represa (BLUM et al., 2005; MANNICH et al., 2011).



Figura 5: Vista parcial do Reservatório de Alagados. Fonte: A autora, 2013.

Segundo o relatório do IAP de 2009, Vossoroca é, igualmente a Alagados, considerado como moderadamente degradado, porém em anos anteriores ele foi classificado como até criticamente degradado. O relatório ressalta ainda o aumento da intervenção antrópica a partir de 2006, época em que houve aumento considerável nas concentrações de fósforo total.

2. JUSTIFICATIVA

Frente à crescente preocupação sobre a capacidade de abastecimento e a qualidade da água disponibilizada à população, nesse estudo foram avaliadas, de maneira preliminar, a concentração de metais no sedimento, água e também a saúde de peixes expostos cronicamente às águas dos reservatórios de Alagados e Vossoroca.

A quantificação de poluentes nas águas é uma prática comum, porém pouco efetiva para avaliação da saúde dos ecossistemas aquáticos, porque não permite avaliar efeitos destes nos sistemas biológicos. Portanto, se há o desejo de melhorar a qualidade da água não apenas para o consumo humano, mas também para a proteção da fauna aquática, é necessária a popularização do uso de biomarcadores e a obtenção de tais dados para o desenvolvimento de diferentes e mais precisas ferramentas de biomonitoramento e geração de bancos de dados. Isso permitirá às autoridades competentes um maior controle sobre a qualidade da água disponibilizada à população.

Outro objetivo foi o de gerar dados mais consistentes sobre a espécie nativa estudada, ajudando a aplicação destes parâmetros em outras regiões de ocorrência dessa espécie.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade da água e a saúde da ictiofauna dos reservatórios de Alagados e Vossoroca pelo uso de biomarcadores de contaminação ambiental e pela determinação da concentração de metais em água e sedimentos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir da coleta de órgãos e tecidos de peixes expostos cronicamente às águas dos reservatórios de Alagados e Vossoroca:

- Determinar concentrações de diferentes metais nas águas e sedimentos dos dois reservatórios estudados por espectrometria de absorção atômica;

- Avaliar aspectos neurotóxicos pela quantificação da atividade específica da enzima AchE em músculo e cérebro dos exemplares analisados;
- Verificar a existência de estresse oxidativo em fígado e cérebro dos animais expostos cronicamente às águas dos reservatórios de Alagados e Vossoroca, com ajuda de análises bioquímicas;
- Com auxílio da microscopia de luz para fígado e microscopia eletrônica de varredura para brânquias, verificar se a morfologia de órgãos alvos é alterada pela exposição crônica às águas dos reservatórios;
- Verificar a existência de desregulação endócrina em peixes machos pela análise molecular da presença de vitelogenina no sangue.
- Correlacionar os resultados obtidos com fontes impactantes do local e gerar dados que possam auxiliar as autoridades nas tomadas de decisões, com o objetivo de proteger a fauna local e melhorar a qualidade da água para a utilização humana e animal.

4. METODOLOGIA

4.1 COLETA DE MATERIAL

Foram capturados entre 15 e 20 indivíduos de *Geophagus brasiliensis* em cada um dos quatro pontos de coleta: três pontos distintos da represa de Alagados sendo estes escolhidos buscando uma variedade de níveis de impacto ambiental, AL - A) início do reservatório, AL - B) margens com agricultura, AL - C), margens com habitação, e um ponto na represa de

Vossoroça (Figura 6). Os peixes foram capturados em uma única coleta, em seu período reprodutivo, com auxílio de tarrafas e rede de espera.

Todos os peixes coletados foram anestesiados com MS-222 (1gr/L) no local e, após coleta de sangue por punção da veia caudal, sacrificados por secção medular. A seguir foram coletadas amostras de músculo, cérebro e fígado para as análises bioquímicas; todas essas foram acondicionadas em nitrogênio líquido até o retorno ao laboratório, onde ficaram guardadas em freezer -80°C até as análises.

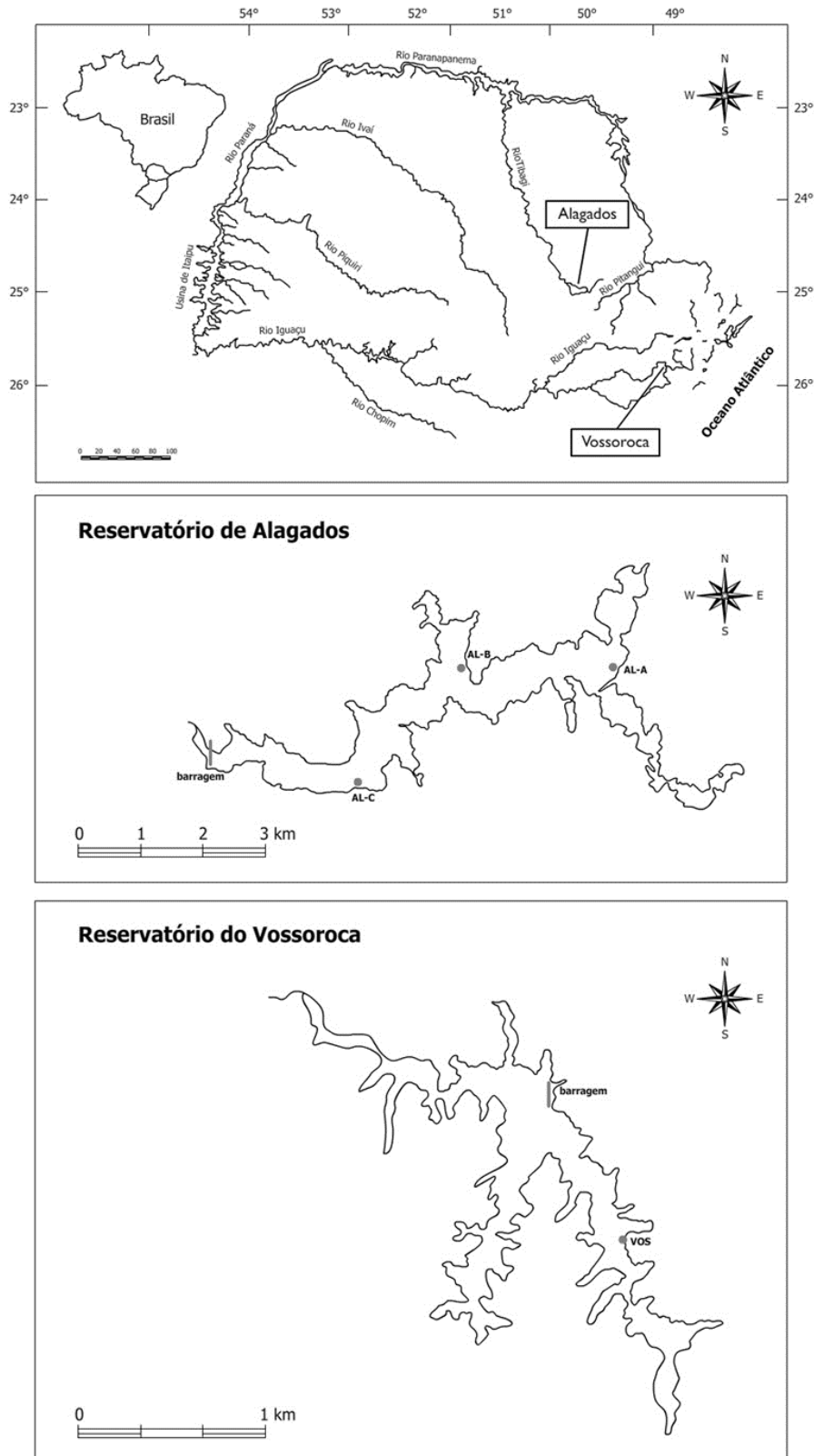


Figura 6: Mapa da localização dos Reservatórios de Alagados e Vossoroca no estado do Paraná. Fonte: A autora, 2013.

Para histopatologia em microscopia de luz, amostras de fígado foram coletadas e fixadas em ALFAC por 16 horas (etanol a 70%, formaldeído a 4% e ácido acético glacial a 5%); para microscopia eletrônica de varredura (MEV), o segundo arco branquial direito de metade dos peixes foi fixado em solução de Karnovsky.

Para a determinação de metais nos sedimentos e na coluna d'água, as amostras foram coletadas segundo protocolo padrão, preservadas em freezer a -20°C no local e posteriormente analisadas pelo grupo de Química Analítica Ambiental e Sanitária - QAAS do Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos, na UEPG.

4.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

4.2.2 Neurotoxicidade – Acetilcolinesterase (AChE)

Amostras de cérebro e músculo foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5 na proporção de 1:10. Os homogeneizados foram centrifugados por 20 min a 4°C , a 12000 x g. Após, alíquotas dos sobrenadantes (fração S9) foram guardadas em freezer -80°C até análise.

Para a análise das amostras, após quantificação de proteínas elas foram normalizadas para 1,0 mg/ml de proteína cada. Foram adicionadas (50 μl) em microplaca em três réplicas, seguido de 200 μl de 5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato (DTNB) preparado a 0,75 mM e 50 μl de iodeto de acetiltocolina (ATC) 12mM em água destilada.

O método consiste em detectar, em $\lambda = 405 \text{ nm}$, o 2-nitrobenzoato-5-mercaptotocolina e o 5-tio-2-nitrobenzoato formados pela reação entre a ticolina (produto da hidrólise da acetiltocolina pela AChE) e o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca, seguindo método de ELLMAN et al.(1961) modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1998). A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg proteína.

4.2.3 Estresse Oxidativo e Biotransformação

Amostras de fígado e cérebro foram homogeneizadas em PBS, pH 7,2 na proporção 1:10. Os homogeneizados foram centrifugados por 20 min a 4°C, a 12000 x g. Após, alíquotas dos sobrenadantes (fração S9) foram guardadas em freezer -80 °C até análise.

4.2.3.1 Atividade da GST

As amostras foram normalizadas para 1 mg/ml de proteína e feitas em três réplicas de 20 µl na microplaca de leitura em espectrofotômetro, seguido de 180µl de solução reação. A solução reação foi composta por CDNB a 3 mM e GSH 3 mM, em solução com PBS, pH 7,2. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm, durante 3 min e a atividade enzimática foi expressa em µmol de CDNB conjugado/min/mg proteína.

O método baseia-se em KEEN et al.(1976) e no princípio de que a GST catalisa a reação do substrato CDNB com o GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância a 340 nm.

4.2.3.2 Atividade de CAT

As amostras foram normalizadas para 1mg/ml de proteína e adicionadas em 3 réplicas de 10 µl em cubetas de quartzo seguido de 990 µl de solução reação. A solução reação foi composta por peróxido de hidrogênio 20 mM, em solução tampão (TRIS-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8). A leitura foi realizada em

espectrofotômetro com comprimento de onda de 240 nm, por 1 min e a atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumido/min/mg proteína.

Fundamentado no método descrito por AEBI (1984) que baseia-se no decréscimo de absorvância a 240 nm devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

4.2.3.3 Atividade de SOD

As amostras foram normalizadas para 1mg/ml de proteína e então foi adicionado etanol de modo que ficassem com concentração de 25% desse, por último foram centrifugadas durante vinte minutos a 12000 x g. Na microplaca foi adicionado o “branco”, com 20 μl de etanol, e 20 μl das amostras do sobrenadante centrifugado. Após, 70 μl da mistura de NBTA 285 mM e EDTA 0,05 mM foram acrescentadas. Por último, adicionou-se 110 μl de tampão carbonato de sódio (182 mM, pH 10,2) e hidroxilamina 67 mM para iniciar a reação. A leitura foi feita a 560 nm em espectrofotômetro durante quatro horas em intervalos de uma hora. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{ml/min/mg}$ proteína.

O método foi realizado pelo proposto por CROUCH et al. (1981), na capacidade da SOD em inibir a redução do NBT para azul formazan pelo O_2 gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, sendo que a redução do NBT é medida espectrofotometricamente a 560 nm.

4.2.3.4 Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

Foram adicionados 50 μl de ácido tricloroacético (TCA) a 48% em 200 μl de amostra para precipitação proteica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 min a 4°C. Para as leituras, foram adicionados 50 μl do sobrenadante da amostra e 230 μl de tampão Tris-base (400 mM, pH 8,9) a uma microplaca. Como “branco”, foi utilizado 230 μl do tampão Tris-base

a 400 mM mais 50 µl de TCA a 8% em PBS. Por último, 20 µl de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) a 2,5 mM (em metanol a 25%, tampão Tris-base 300 mM, pH 8,9) foram acrescentados e as medidas de absorvância lidas a 415 nm em espectrofotômetro. A determinação do conteúdo de GSH foi realizada através de comparação com curva-padrão de GSH (0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 32 µM GSH); os resultados foram expressos em nanomoles de tióis/mg de proteínas.

O método baseia-se em SEDLAK e LINDSAY, (1968) em que ocorre a precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não protéicos com o DTNB gerando um produto que absorve luz a 415 nm.

4.2.3.5 LPO (danos à membrana plasmática)

Foi adicionado 800 µl de meio de reação (laranja de xilenol a 100 µM, H₂SO₄ a 25 mM, BHT- hidroxitolueno butilado - a 4 mM, FeSO₄.NH₄ a 250 µM e acrescentados, na sequência descrita, a metanol 90%) a 200 µl do sobrenadante de cada amostra ainda congelada, quando a concentração de proteínas totais era maior que 5 mg/ml. Após, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente durante 20 minutos, e agitados por inversão a cada 3 minutos. Por último foram centrifugados a 9.000 g por 10 min em temperatura ambiente e pipetados 200 µl do sobrenadante em microplacas em triplicata. A absorvância foi medida a 550-570 nm. Os resultados foram expressos em concentração de hidroperóxidos (nmol/mg proteína).

A produção de hidroperóxidos lipídicos foi verificada pelo método FOX (Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method) que tem por princípio a rápida oxidação do Fe⁺² mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe⁺³ – laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado (JIANG et al., 1992).

4.2.3.6 Carbonilação de Proteínas (PCO)

Danos estruturais em proteínas foram avaliados de acordo como os métodos descritos por LEVINE et al. (1994) e QUINLAN & GUTTERIDGE (2000). A análise consiste em reagir o 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas que podem ser detectadas a 358-370 nm. O método limita-se a grupos funcionais carbonilados como ácidos carboxílicos, amidas e ésteres que reagem como o DNPH.

Para isso, 200 µl de proteína solúvel da fração S9 foi adicionada a um tubo; posteriormente, 500 µl de DNPH a 10 mM, preparado em HCl a 2 M, foi adicionado. O conteúdo do tubo foi misturado com auxílio de um vortex durante 5 min e incubados a 30°C por 1,5 h. Após incubação, as proteínas foram precipitadas em 700 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 28% e centrifugados a 9.000 x g por 10 min. O pellet foi lavado três vezes por ressuspensão (etanol/acetato de etila 1:1), homogeneizado em vortex e centrifugado. As proteínas foram então solubilizadas em cloreto de guanidina a 6 M, centrifugadas a 9.000 x g por 5 min para remover quaisquer resíduos de material insolúvel. O conteúdo de carbonilas foi determinado em espectrofotômetro a 358-370 nm, em microplacas. O branco recebeu o mesmo tratamento, contudo sem a adição do DNPH. Os resultados foram expressos µmol carbonilas/ mg de proteína.

4.2.3.7 Análise da concentração de proteína

Para normalização dos resultados de análises bioquímicas e de concentração de proteínas descritas acima, foi utilizado o método de BRADFORD (1976) utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

4.3 HISTOPATOLOGIA

4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

O segundo arco branquial direito de metade dos peixes de cada grupo foram lavados com PBS, logo após sua coleta, antes da fixação em solução de Karnovski, onde permaneceram por no mínimo por 24 horas. Após a fixação foram novamente lavados em PBS e desidratados em série crescente de etanol (Merck), e processados até a completa desidratação no ponto crítico utilizando CO₂ líquido. Os filamentos foram então colados em suportes de alumínio com ajuda de uma fita dupla face de carbono e metalizados com ouro para posterior análise no microscópio eletrônico Jeol, JSM – 6360LV Scanning Electron Microscope, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

4.3.3 Microscopia de luz

Após a remoção do fígado, um pedaço deste foi imerso em fixador Alfac durante um período de 16 horas. Após esta fase, as peças passaram pelo processo da desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em xilol, impregnação e inclusão em Paraplast Plus® (Sigma) (56°C). Os blocos obtidos foram trimados para a obtenção dos cortes histológicos com espessura de cinco micrômetros, que foram distendidos sobre lâmina histológica e corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.) segundo protocolo de rotina já estabelecido no laboratório (RABITTO et al., 2005). As lâminas foram analisadas e fotografadas digitalmente no fotomicroscópio Leica DME.

4.3.3.1 Avaliação histopatológica do fígado

As alterações histopatológicas observadas no fígado de todos os exemplares utilizados neste trabalho foram avaliadas de acordo com o método descrito por BERNET et al. (1999). Essas foram consideradas de acordo com os seus respectivos fatores de importância (Tabela 1), onde: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível; (2) importância moderada, reversível em muitos casos e (3) importância marcante, geralmente irreversível, levando a diminuição das funções do órgão. De acordo com o grau de ocorrência, foram atribuídos valores para as alterações observadas em cada tratamento, sendo: (0) Inalterado, (2) Ocorrência ocasional, (4) Ocorrência moderada e (6) Ocorrência severa; lesão difusa. O Índice de lesão (IL) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IL = \sum \text{alt} (a \times w)$$

Onde: alt = alteração, a = valor atribuído à alteração e w = fator de importância.

Unidade funcional	Alteração histopatológica	Fator de importância
FÍGADO	Necrose	3
	Inflamação (infiltração leucocitária, granulomatose)	2
	Depósitos (esteatose, colestase)	1
	Distúrbios circulatórios (hemorragia, congestão)	1
	Alterações estruturais (desorganização parenquimática, diferença de coloração)	1

Tabela 1: Alterações histopatológicas analisadas no fígado com seus respectivos fatores de importância (modificado a partir de BERNET et al., 1999).

4.3.3.2 Análise quantitativa dos centros de melanomacrófagos

A ocorrência de melanomacrófagos foi avaliada de acordo com RABITTO et al. (2005). Os centros de melanomacrófagos foram contados através de um sistema-teste quadriculado acoplado a uma das oculares do microscópio, cuja área era de 1mm^2 , onde cada quadrado media $0,01\text{mm}^2$. Foram analisados 15 campos escolhidos aleatoriamente em lâminas de fígado de todos os indivíduos utilizados no estudo, através de microscopia de luz. Foram considerados centros de melanomacrófagos os que continham um número igual ou superior a 5 células pigmentadas. Os resultados da contagem dos melanomacrófagos foram apresentados por mm^2 .

4.4 BIOMARCADOR MOLECULAR – PRESENÇA DE VITELOGENINA

4.4.2 Separação eletroforética das proteínas do plasma

Para realizar o preparo das amostras, a concentração de proteínas do plasma foi determinada com o método de Bradford. As proteínas foram reduzidas e desnaturadas com tampão de amostra redutor (Tris HCl 1M pH 6,8, SDS, Glicerol, Azul de bromofenol e β mercapto-etanol). Em cada espaço do gel foi pipetado $25\ \mu\text{l}$, o equivalente a $100\ \mu\text{g}$ de proteínas. O tempo aproximado de corrida era em média 2 horas.

As proteínas do plasma foram separadas, de acordo com o tamanho, por corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 8% (SDS-PAGE) com aplicação de campo elétrico vertical. A velocidade da corrida foi ajustada para 100 mA com voltagem variada.

4.4.3 Western blotting

As proteínas do gel de poliacrilamida separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad®: poro de 0,45 μm) em uma cuba contendo tampão de transferência. Para verificar se as proteínas do gel foram transferidas para a membrana, esta foi corada com Ponceau. Após a lavagem da membrana, para retirada do corante, esta foi bloqueada com leite sem gordura 5% (Molico) em solução de TBS-T (20 mM Tris pH 7,4, 120 mM NaCl e 0,05% Tween 20) por 1 hora. A membrana foi incubada com o anticorpo antivitelogenina (primário) de *Rhamdia quelen* (COSTA, 2009) sob agitação constante por 16 horas a 4° C, numa diluição de 1:4.000. Após, foi lavada com TBS-T 3 vezes para a remoção dos anticorpos primários não ligados. A membrana foi, então, incubada com anti-imunoglobulina de coelho conjugada à peroxidase (Sigma) por 1 hora numa diluição de 1:4000. A proteína pode ser visualizada através de um substrato quimioluminescente (Pierce ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) sobre a membrana exposta a um filme de raio-X sensível (Amersham biosence).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises dos biomarcadores bioquímicos e histológicos foram expressos como média \pm erro padrão da média. A normalidade dos dados foi testada com o teste de Kolmogorov–Smirnov. Quando comprovada a distribuição normal dos dados, utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey. Para os dados que passaram no teste de normalidade foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. A regra de decisão (α) foi de 0,05 em todas as análises.

5. RESULTADOS

Foram coletados ao todo setenta e oito indivíduos nativos dos reservatórios de Alagados e Vossoroca. A Tabela 2 mostra informações sobre o número de indivíduos coletados, peso, comprimento total e sexos encontrados em cada um dos grupos.

DADOS GERAIS					
GRUPO	Nº INDIVÍDUOS	Nº ♂	Nº ♀	PESO	COMPRIMENTO
AL – A	20	16	4	124,266±9,419	18,8±0,458
AL – B	20	16	4	183,839±14,79	21,60±0,6403
AL – C	10	5	5	127,559±19,93	19,05±0,9412
VOS	28	7*	11	23,013±2,505	11,39±0,4122

Tabela 2: Dados gerais sobre os organismos coletados. Valores expressos em média ± erro padrão da média. Resultados expressos em gramas para peso e em centímetros para comprimento total. Asterisco indica que alguns indivíduos do grupo VOS não puderam ter o sexo determinado.

5.1 ANÁLISE QUÍMICA

Tomando por base a Resolução do CONAMA nº 357 de 2005, que apresenta valores máximos permitidos de metais para águas doces destinadas ao abastecimento para consumo humano e a proteção das comunidades aquáticas, é possível verificar que todos os metais analisados, exceto o Co e o Zn, apresentam valores acima do permitido pela lei em pelo menos um dos pontos analisados no reservatório de Alagados (Tabela 3).

O ponto AL – A apresenta maior concentração dos metais Cu, Mn, Co e Al na coluna d'água que os outros pontos analisados (Tabela 3). Vossoroca apresenta valores da concentração de todos os metais analisados menores que em Alagados e dentro do limite de segurança imposto pelo CONAMA.

ANÁLISE DE ÁGUA						
PONTOS	Cu	Mn	Co	Pb	Zn	Al
AL – A	0,03±0,46	0,46±0,12	0,02±0,65	0,01±0,15	0,10±0,10	5,63±0,29
AL – B	*	0,12±0,20	0,01±0,06	0,02±0,50	0,04±0,35	3,14±0,27
AL – C	*	0,03±0,57	0,01±0,11	0,03±0,65	0,02±0,48	2,07±0,45
VOS	0,003±0,0004	0,009±0,0004	0,002±0,0003	*	0,003±0,0004	*
CONAMA	0,009	0,1	0,05	0,001	0,18	0,1

Tabela 3: Análise da concentração de metais na coluna d'água comparados com os valores máximos permitidos pela resolução do CONAMA nº 357 de 2005. Os valores expressam médias ± erro padrão da média. Resultados expressos em ppm.

A análise dos sedimentos revela que o ponto AL – C apresenta maiores concentrações de Cu, Mn e Al, enquanto que o AL – A expõe valores maiores de Co e Zn (Tabela 4). Vossoroca apresenta concentrações menores de metais nos sedimentos em comparação à Alagados, exceto pelos metais Co e Pb (Tabelas 4).

ANÁLISE DE SEDIMENTOS						
PONTOS	Cu	Mn	Co	Pb	Zn	Al
AL – A	30,38±0,07	408,25±0,01	13,75±0,07	15,38±0,07	87,38±0,06	25426,25±0,13
AL – B	26,17±0,05	307,08±0,02	9,67±0,08	17,33±0,04	71,83±0,02	14686,83±0,01
AL – C	33,67±0,11	552,33±0,09	12,33±0,14	12,33±0,14	40,83±0,10	34273,83±0,01
VOS	28,85±0,03	267,08±0,003	19,77±0,07	19,44±0,11	51,89±0,03	28426,35±0,02

Tabela 4: Análise da concentração de metais nos sedimentos. Os valores expressam médias ± erro padrão da média. Resultados expressos em mg/Kg.

5.2 ANÁLISE DOS BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Devido ao tamanho dos peixes coletados em Alagados e Vossoroca serem muito discrepantes entre si (Tabela 2) e levando em conta que taxas metabólicas nesses casos podem não se assemelharem de maneira que permita uma comparação confiável entre os grupos, optou-se por não comparar os resultados dos biomarcadores entre os reservatórios.

Houve diferença na atividade de AchE muscular e cerebral entre os grupos analisados de Alagados. Sendo que a atividade de AchE no grupo AL – B foi menor em relação ao AL – A (Figura 7).

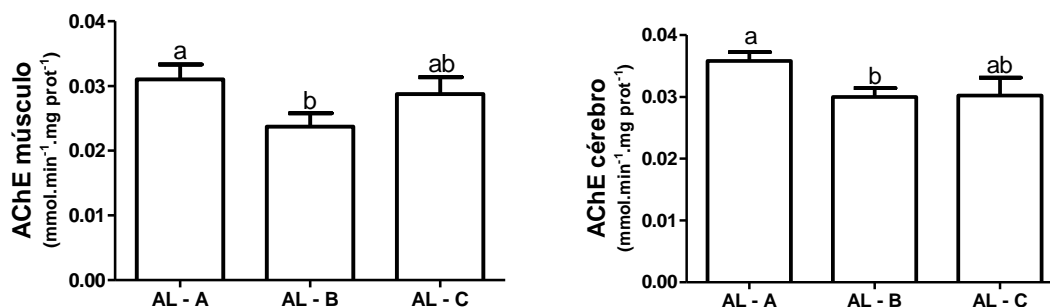


Figura 7: Biomarcador de neurotoxicidade em *Geophagus brasiliensis*. As siglas AL – A, AL – B E AL – C se referem aos três pontos do reservatório de Alagados. Os resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ($p>0,05$) na comparação entre os grupos.

Não houve diferença na atividade da GST e nos níveis de carbonilação proteica no cérebro de *Geophagus brasiliensis* entre os três grupos de Alagados; a concentração de GSH teve níveis significativamente maiores no grupo AL – C em relação aos outros dois grupos (Figura 8).

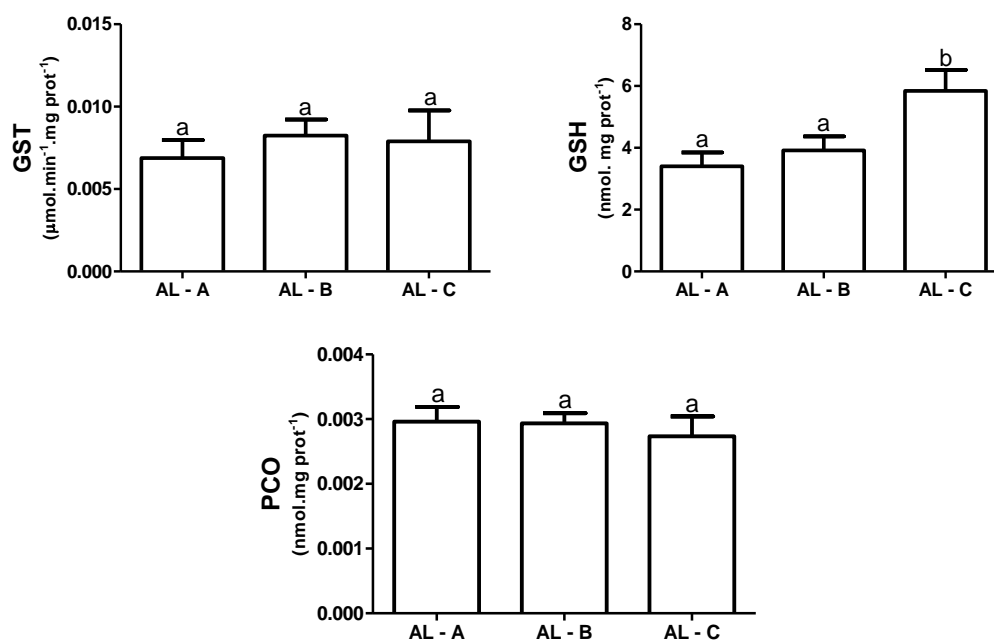


Figura 8: Biomarcadores de estresse oxidativo em cérebro de *Geophagus brasiliensis*. As siglas AL – A, AL – B E AL – C se referem aos três pontos do

reservatório de Alagados. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ($p>0,05$) na comparação entre os grupos.

Houve maior atividade de SOD nos grupos AL – A e AL – B em comparação com o grupo AL – C, a atividade da CAT foi mais alta no grupo AL – A quando comparada com AL – C. Não foram encontradas diferenças para a concentração de GSH, a atividade de GST, os níveis de carbonilação proteica e de lipoperoxidação entre os grupos analisados do Reservatório de Alagados (Figura 9).

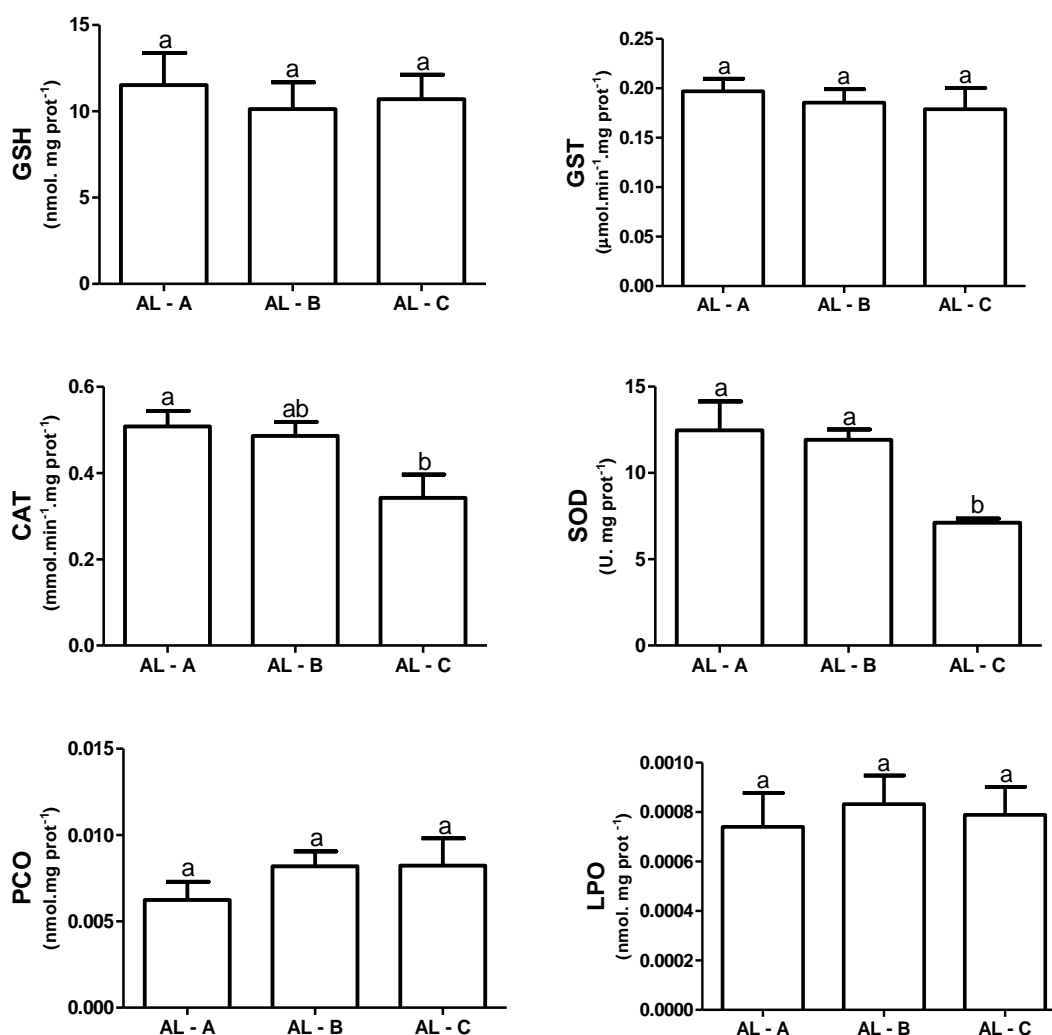


Figura 9: Biomarcadores de estresse oxidativo em fígado de *Geophagus brasiliensis*. As siglas AL – A, AL – B E AL – C se referem aos três pontos do reservatório de Alagados. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ($p>0,05$) na comparação entre os grupos.

Na Tabela 5, estão os valores encontrados para os biomarcadores bioquímicos do grupo de Vossoroça.

BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS (VOSSOROÇA)		
MÚSCULO	AchE	0,036 ± 0,0033
CÉREBRO	AchE	0,020 ± 0,0007
	GSH	4,901 ± 0,2947
	GST	0,006 ± 0,0004
	PCO	0,004 ± 0,0007
	GSH	3,465 ± 0,5270
FÍGADO	GST	0,006 ± 0,0173
	SOD	8,481 ± 0,7508
	CAT	0,366 ± 0,0530
	PCO	0,005 ± 0,0013
	LPO	0,001 ± 0,0001

Tabela 5: Biomarcadores bioquímicos em *Geophagus brasiliensis* coletados em Vossoroça. Os resultados são expressos em média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Resultados expressos em: AchE, CAT ($\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$); GSH, PCO e LPO ($\text{nmol}\cdot\text{mg prot}^{-1}$); GST ($\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$); SOD ($\text{U}\cdot\text{mg prot}^{-1}$).

5.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

5.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

As brânquias analisadas apresentaram morfologia comum a todos os teleósteos, com quatro arcos branquiais de cada lado do corpo, cada arco com duas filas de lamelas primárias e a partir dessas surgem as lamelas secundárias que são o principal sítio de troca de gases.

Diversas alterações morfológicas foram avaliadas nas brânquias de *Geophagus brasiliensis*, as quais estão expressas em frequências relativas na Tabela 6.

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM BRÂNQUIAS								
	DESCAM.	NECROSE	FUSÃO LAMELAR	NEOPL.	HIPERP.	ALT. EPITELIAL	PARASITA	ANEURIS.
GRUPO	FREQUÊNCIAS RELATIVAS (%)							
AL – A	50	25	12,5	0	12,5	80	0	25
AL – B	25	40	15	0	0	80	15	0
AL – C	25	25	0	0	0	50	25	0
VOS	50	25	25	12,5	12,5	100	0	0

Tabela 6: Frequências relativas das alterações morfológicas encontradas em brânquias de *Geophagus brasiliensis*. A frequência foi calculada dividindo-se o número de indivíduos em que a lesão avaliada foi observada pelo número total de indivíduos do grupo. Palavras abreviadas: DESCAM – descamação; NEOPL – neoplasia; HIPERP- hiperplasia; ALT EPITELIAL – alteração epitelial; ANEURIS- aneurisma.

Foram encontradas alterações morfológicas e frequências relativas semelhantes nas brânquias de *Geophagus brasiliensis* tanto nos três pontos de Alagados quanto no ponto de coleta de Vossoroca. A alteração mais comum nos quatro grupos analisados foi alteração epitelial na lamela secundária, com frequência relativa maior que 50% em todos os grupos. Descamação epitelial e necroses também se revelaram comuns nos peixes analisados nos dois reservatórios (Figuras 10 e 11). Neoplasias, hiperplasias e aneurismas (Figuras 10 e 11) foram as lesões menos observadas e com baixa frequência de aparição em todos os grupos.

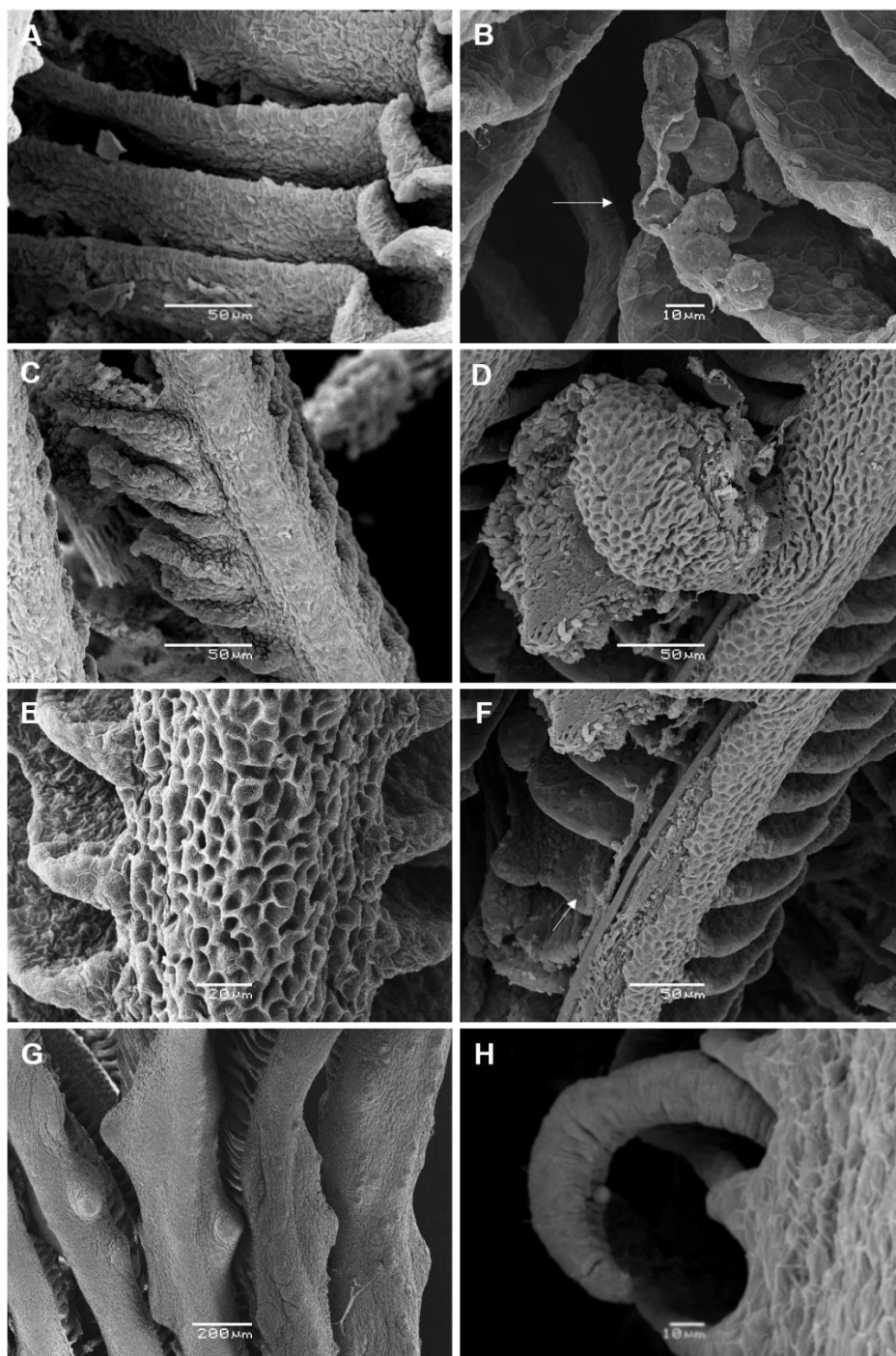


Figura 10: Eletromicrografias de brânquias de *Geophagus brasiliensis* coletados em Alagados. A- alteração epitelial em lamela secundária e descamação. B- células hiperplásicas em lamela secundária (seta). C- hipertrofia em lamela secundária. D- hiperplasia em lamela secundária. E- alteração epitelial em lamela primária. F- área necrótica em lamelas primária e secundárias (seta). G- intumescimento de regiões da lamela primária. H- parasita.

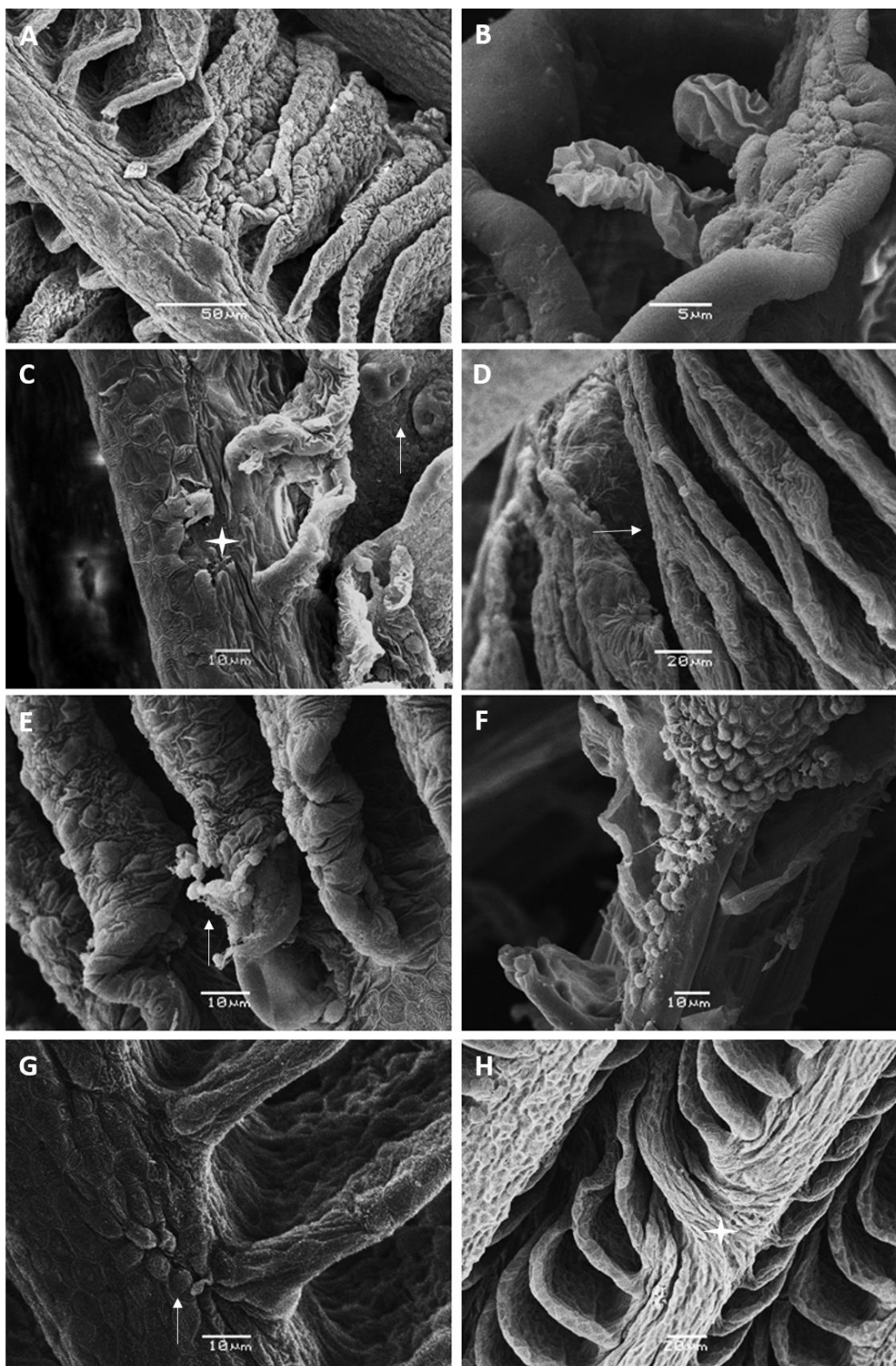


Figura 11: Eletromicrografia de brânquias de *Geophagus brasiliensis* coletados em Vossoroca. A- alteração epitelial em lamelas secundárias. B- projeções celulares em lamela secundária. C- descamação em lamela primária (estrela) e neoplasia (seta) em lamela secundária. D- fusão lamelar (seta). E- descamação do epitélio em lamela secundária. F- área necrótica de lamela primária e perda de lamelas secundárias. G- área de cicatrização em lamela primária. H- anomalia tecidual com hiperplasia de lamela secundária (estrela).

5.3.3 Microscopia de luz

Os indivíduos analisados apresentaram o parênquima hepático constituído por hepatócitos com forma poligonal, núcleo grande, único e normalmente central com um nucléolo evidente e único e eucromatina abundante, o que confirma a alta atividade metabólica da célula. Vasos sinusóides e vasos sanguíneos são aleatoriamente distribuídos pelo tecido e o tecido pancreático encontra-se difuso no parênquima hepático, geralmente localizado próximo a vasos sanguíneos.

Diversas alterações histológicas foram observadas no fígado dos peixes do Reservatório Alagados (Figura 12 e 13), o que contribuiu para um elevado índice de lesão histopatológica em todos os grupos desse reservatório (Figura 12). Os peixes analisados em Vossoroca apresentaram baixo índice de lesão e poucas alterações com baixas frequências relativas (Figura 14 e Tabela 7). As alterações mais comumente observadas em todos os quatro grupos foram colestase e necrose (Tabela 8).

Houve diferença na quantidade de centros de melanomacrófagos entre os pontos de Alagados, sendo que há um aumento na ocorrência desses a partir do ponto AL – A até o AL – C. Os animais de Vossoroca analisados tiveram baixa ocorrência de centros de melanomacrófagos (Figura 12 e Tabela 7).

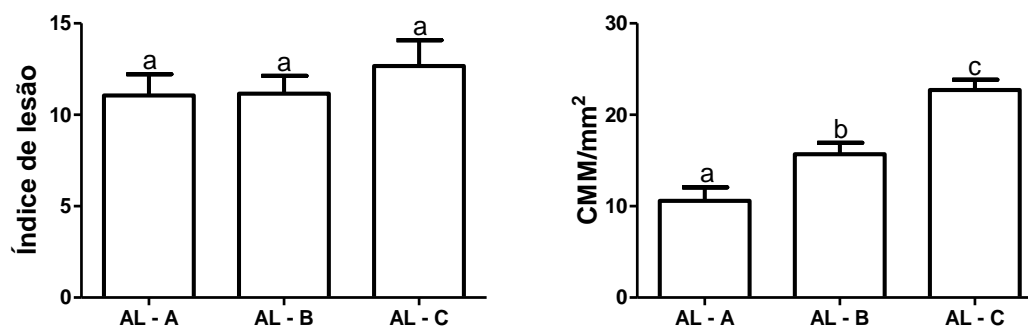


Figura 12: Índice de lesão histopatológica e contagem de CMMs em fígado de *Geophagus brasiliensis*. As siglas AL – A, AL – B E AL – C se referem aos três pontos do reservatório de Alagados e a sigla VOS se refere ao ponto do reservatório de Vossoroca. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa ($p > 0,05$) na comparação entre os grupos.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FÍGADO	
ÍNDICE DE LESÃO	6,2± 1,13
CONTAGEM DE CMMs	6,9± 1,37

Tabela 7: Índice de lesão e contagem de CMMs em fígado de *Geophagus brasiliensis* coletados em Vossoroca. Resultados expressos em média ± erro padrão da média.

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM FÍGADO								
	NECRO.	COLEST.	ESTEAT.	INFILTR.	GRANULOM.	DIFERENC. TECIDUAL	HEMOR.	CONGEST.
GRUPOS	FREQUÊNCIAS RELATIVAS (%)							
AL – A	68,4	78,9	26,3	5,2	0	10,5	0	0
AL – B	85	95	20	0	10	0	5	5
AL – C	80	100	30	10	0	0	0	0
VOS	70	30	0	20	0	0	0	0

Tabela 8: Frequências relativas das alterações morfológicas em fígado de *Geophagus brasiliensis*. A frequência foi calculada dividindo-se o número de indivíduos em que a lesão avaliada foi observada pelo número total de indivíduos do grupo. Palavras abreviadas: NECRO- necrose; COLEST- colestase; ESTEAT- esteatose; INFILTR – infiltração leucocitária; GRANULOM – granulomatose; DIFERENC. TECIDUAL – diferenciação tecidual; HEMOR – hemorragia; CONGEST – congestão

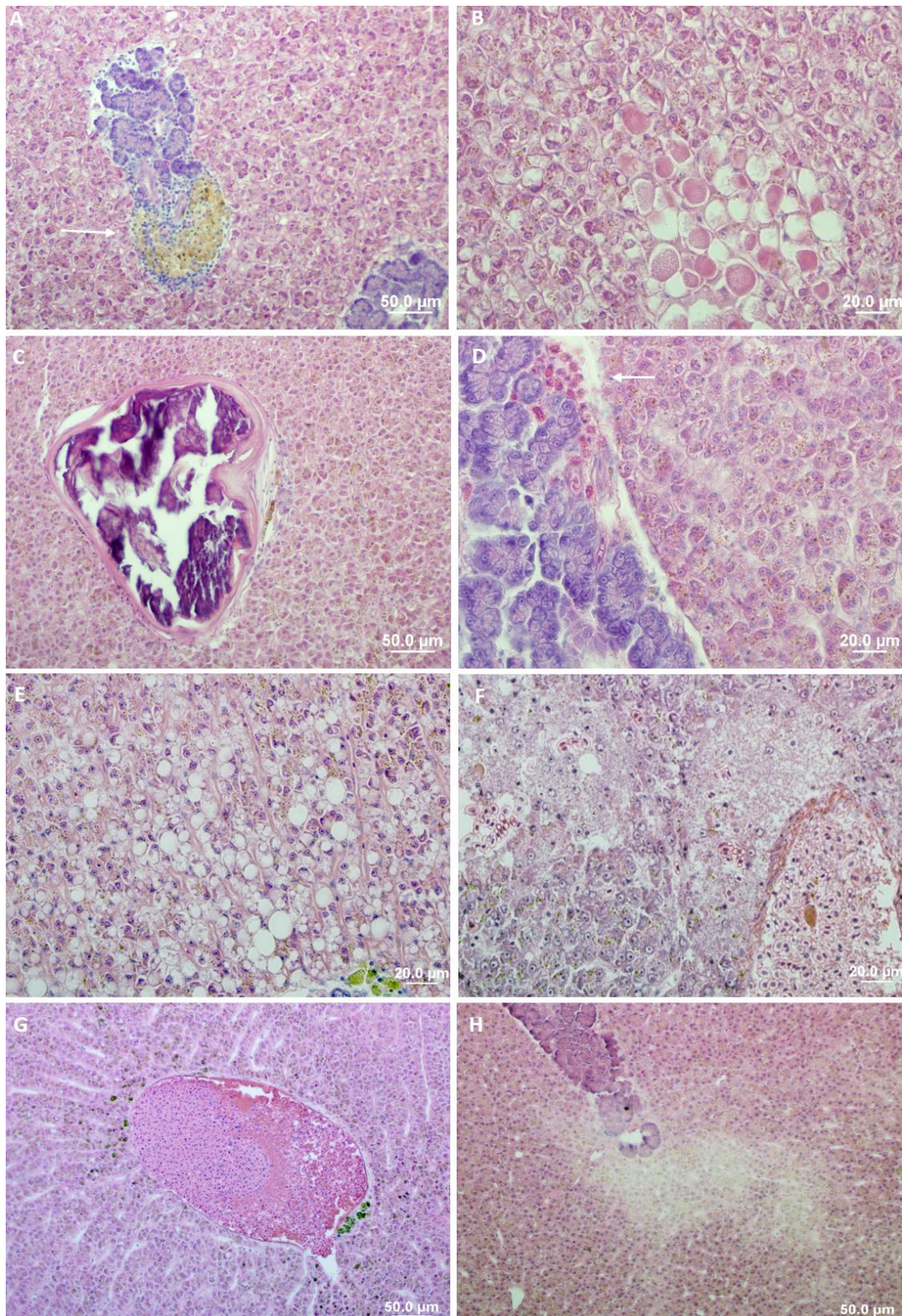


Figura 13: Cortes histológicos de fígado de *Geophagus brasiliensis* coletados em Alagados. A- CMM e infiltração (seta) e tecido com colestase. B- Células com depósitos eosinófilos. C- Parasita e tecido com colestase. D- Parasitas unicelulares (seta). E- tecido com esteatose. F- Necrose em processo de cicatrização. G- congestão de vaso sanguíneo. H- diferença de coloração/ diferenciação celular e tecido com colestase.

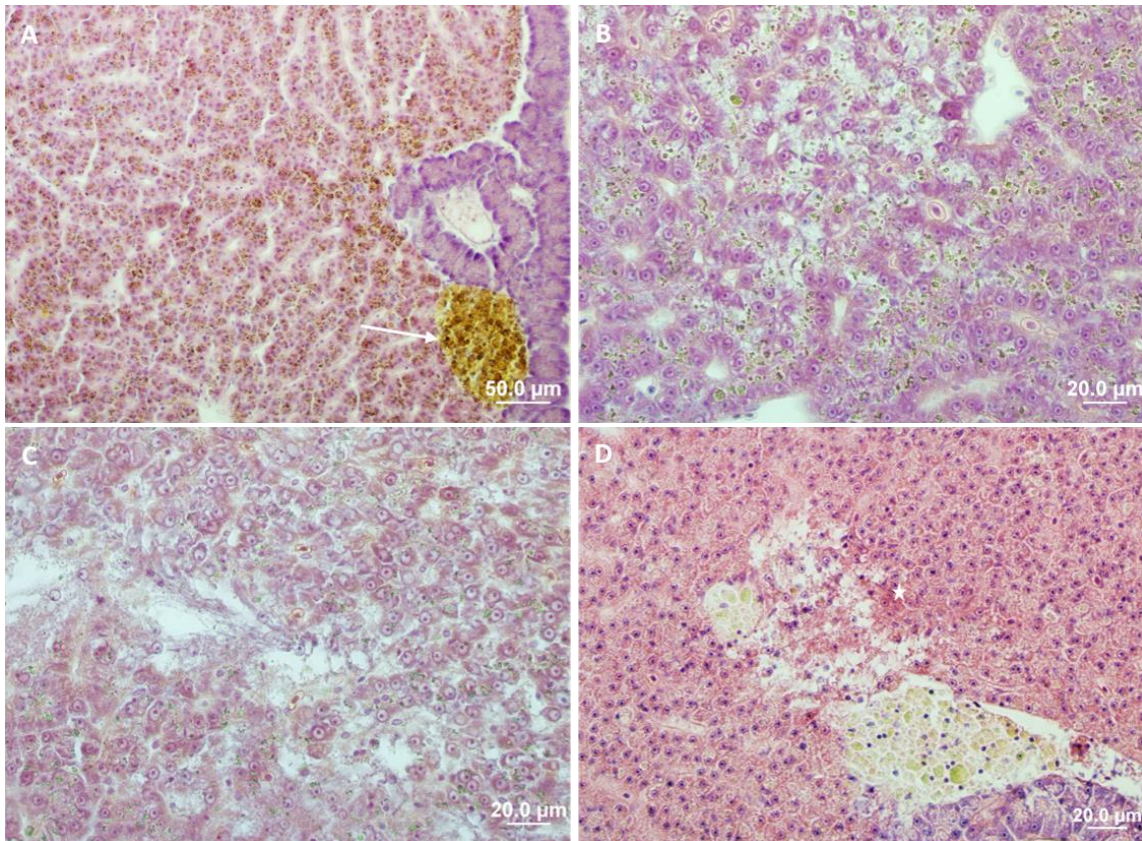


Figura 14: Cortes histológicos de fígado de *Geophagus brasiliensis* coletados em Vossoroça. A- colestase e CMM (seta); B- colestase; C- início de necrose e colestase; D- área necrótica (estrela) e CMM.

5.4 ANÁLISE DA PRESENÇA DE VITELOGENINA

Apenas as fêmeas de Alagados apresentaram VTG na corrente sanguínea (Figura 15). Nenhum macho analisado apresentou indícios de desregulação endócrina quando do uso da técnica qualitativa de western blotting. Os peixes de Vossoroça não puderam ser avaliados devido à grande dificuldade de obtenção de volume suficiente de sangue requerido para o ensaio.

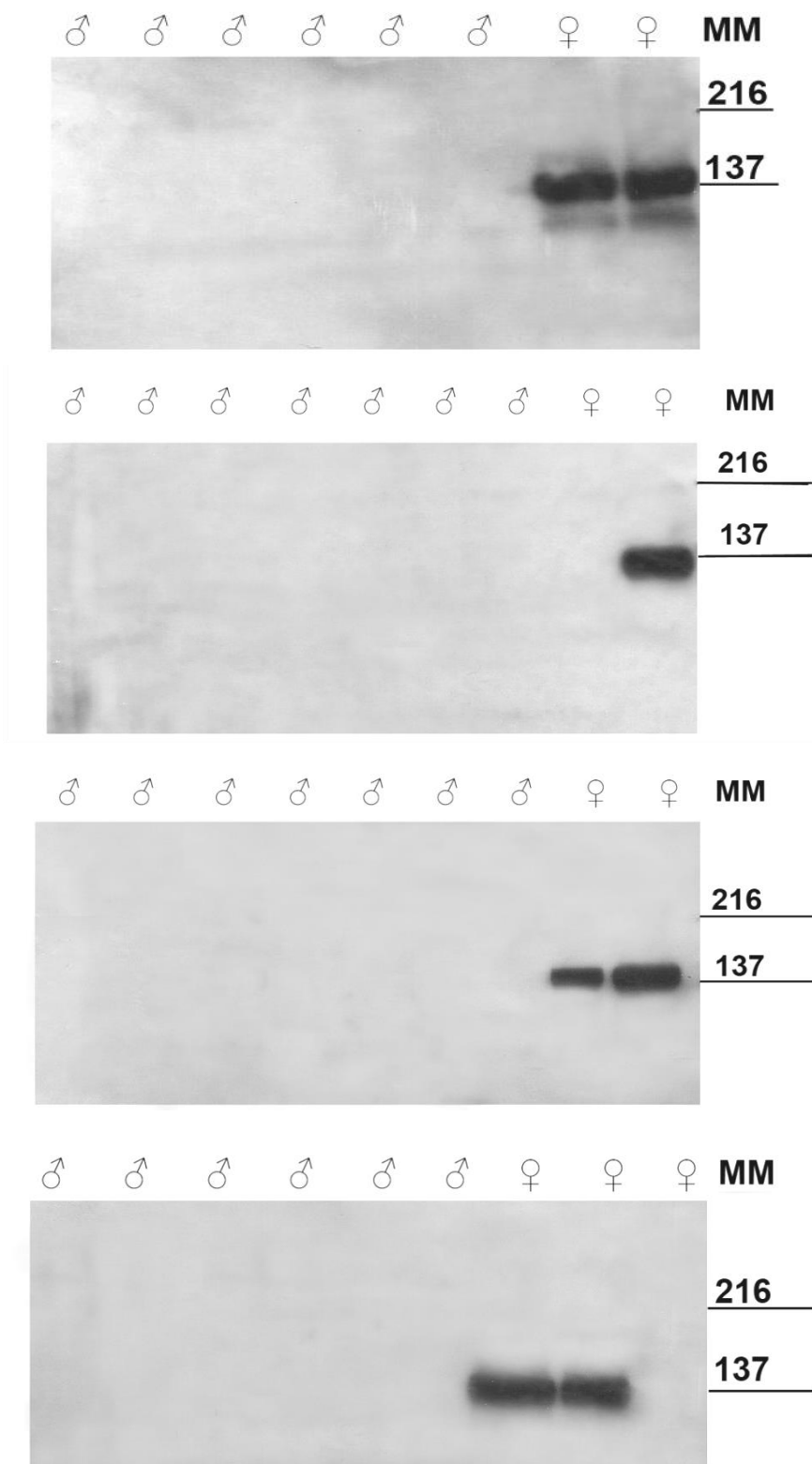


Figura 15: Western blotting de plasma de *Geophagus brasiliensis* com presença de VTG. MM - marcador molecular

6. DISCUSSÃO

A poluição do ambiente por metais pode não só levar a perturbações à integridade dos ecossistemas como também apresenta riscos para a saúde humana com a biomagnificação ao longo da cadeia alimentar.

Sendo assim, as concentrações de Mn, Pb e Al na coluna d'água no Reservatório de Alagados se destacam das demais tanto pela concentração elevada nos pontos de estudo como também pelos possíveis danos que estes metais podem causar à biota. O manganês é um elemento constitutivo de uma série de enzimas e cofator fundamental para o correto funcionamento das funções cerebrais (YOKEL, 2009; ARNDT et al., 2014). Apesar de ser um metal comum e abundante, ainda é pouco estudado nos sistemas de água doce (HOWE et al., 2004; VIEIRA et al., 2012), porém sabe-se que ele pode estar ligado a problemas neurodegenerativos, ocasionar estresse oxidativo generalizado (VIEIRA et al., 2012; ARNDT et al., 2014) e anemia causada por danos ao tecido hematopoiético em rim e baço (HOWE et al., 2004). O chumbo também está relacionado a danos neurodegenerativos e é potencialmente genotóxico em peixes (MARTINEZ et al., 2004; MONTEIRO et al., 2011). Aumento na produção de ROS e disfunções osmorregulatórias já foram relatadas como danos causados à vida aquática (ATLI & CANLI, 2007).

O alumínio, por sua vez, é abundante nos solos e pode ser facilmente biodisponibilizado na coluna d'água (CAMARGO et al., 2009; WOODBURN et al., 2011). Ele normalmente não é acumulado no hepatopâncreas de peixes, porém tem como alvo principal as brânquias, sendo a causa de problemas osmorregulatórios e na troca de gases (CAMARGO et al., 2009; WOODBURN et al., 2011).

O ponto AL – A apresenta as maiores concentrações de metais analisados na coluna d'água em comparação aos outros pontos, sendo o AL - C que apresenta menores níveis de metais totais analisados. Ainda, é importante ressaltar que o ponto AL – B apresenta níveis acima dos permitidos por lei para o manganês e o chumbo, metais conhecidamente neurotóxicos.

Esses dados sugerem uma maior probabilidade de danos neurodegenerativos e promoção do estresse oxidativo nos peixes provenientes de AL – A e AL – B.

Por outro lado, a análise de concentração de metais no sedimento não é regulamentada por lei, porém a ocorrência destes em níveis elevados pode ser indicadora de poluição por influência antrópica. Assim, essa análise torna-se importante porque permite a detecção de metais que podem estar ausentes ou em baixas concentrações na coluna d'água e sua distribuição nos sedimentos fornece um registro da história espacial e temporal da poluição em um ecossistema (DAVIES et al., 2006) Ainda, como os sedimentos estão em constante fluxo sobrejacente com a coluna d'água podem biodisponibilizar xenobióticos quando da mudança dos parâmetros físico-químicos da água como pH, força iônica, o tipo e concentração de ligantes orgânicos e inorgânicos e da superfície disponível para adsorção causada pela variação da granulometria (DAVIES et al., 2006; FERREIRA et al., 2010).

No Brasil existe apenas a resolução do CONAMA nº454 de 1º de Novembro de 2012 como parâmetro nacional para a presença de metais em materiais a serem dragados que de maneira alguma corresponde com a necessidade real de tanto de proteção da fauna aquática quanto da qualidade de água destinada as populações. Portanto, é inegável a necessidade de regulamentação de limites seguros para a presença de xenobióticos nos sedimentos.

Em Alagados, contrariamente à análise da água, a maior concentração dos metais analisados no sedimento encontra-se no ponto AL – C, que acumula maiores concentrações de cobre, manganês e alumínio. Esse quadro sugere um claro gradiente de poluição por metais, no qual eles são provenientes do alto do reservatório onde estão mais biodisponíveis na coluna d'água, como foi possível constatar na análise dos pontos AL-A e AL-B, e acabam por depositar-se nos sedimentos mais próximo da barragem no ponto AL-C. Ainda, como os metais não são permanentemente fixados pelo sedimento e podem ser novamente biodisponibilizados na água em decorrência de mudança nas condições químico-ambientais o ponto AL-C é interessante para o estabelecimento de biomonitoramento constante.

Por fim, como Vossoroça apresenta todos os metais analisados na coluna d'água abaixo dos valores máximos estipulados pelo CONAMA e menores concentrações de metais nos sedimentos em comparação à Alagados, seria interessante rever a classificação do reservatório como moderadamente degradado pois, com base na análise de metais ele não se encontra no mesmo patamar que Alagados.

As análises bioquímicas surgem para corroborar com dados químicos das análises de metais. Como a enzima acetilcolinesterase que tem sido largamente utilizada como biomarcador de efeito e exposição a xenobióticos, como pesticidas organofosforados e carbamatos (FILHO, et al., 2004; WHITEHEAD, et al., 2005; DUTTA & ARENDS, 2011; VAN DYCK & PLETSCHE, 2011) e metais (GILL, et al., 1990; VIEIRA et al., 2009; RICETTI et al., 2011; OLIVA et al., 2012), sendo conhecida por ser inibida por esses compostos. Ao se observar uma diminuição na atividade da AChE do cérebro e, com maior diferença significativa, do músculo dos peixes do ponto AL – B em relação aos outros dois pontos analisados, pode-se relacionar os altos níveis de chumbo e manganês encontrados e uma possível contaminação do local por compostos como organofosforados e/ou carbamatos oriundos das culturas do entorno com essa menor atividade da enzima. A presença de cianotoxinas nas águas de Alagados também pode exercer um papel inibitório dessa enzima (GELINAS, et al., 2012).

De qualquer forma, a atividade de AchE muscular tanto nos peixes de Alagados quanto nos de Vossoroça apresenta valores próximos dos já descritos na literatura para a espécie quando da exposição crônica a águas potencialmente contaminadas por metais e poluentes organopersistentes. Em BENINCÁ, 2006 a atividade de AchE muscular de *Geophagus brasiliensis* das Lagoas da Conceição e do Camacho, em Santa Catarina, coletados no mesmo período que neste trabalho, apresentou valores médios entre 0,0320 a 0,0224 (mmol/min/mg prot), enquanto em Alagados variaram de 0,0310 a 0,0237 (mmol/min/mg prot), sendo que em Vossoroça a enzima teve uma atividade média maior, de 0,0364 (mmol/min/mg prot).

Com relação aos biomarcadores de estresse oxidativo em cérebro, foi evidenciada a depleção da GSH nos pontos AL - A e AL - B em relação à AL -

C, porém a atividade da GST e os níveis de carbonilação proteica não se alteraram entre os pontos. A GSH tem papel importante no combate ao estresse oxidativo e pode agir tanto como cofator e substrato para as enzimas GST e GPx, como um antioxidante não enzimático. Assim, níveis mais baixos de GSH em peixes podem acontecer quando da exposição a diversos xenobióticos como metais, organofosforados e PAHs, como forma de proteção aos possíveis danos causados pelo aumento na produção de EROs que esses contaminantes possam causar aos organismos expostos (SANCHEZ et al., 2005; MONTEIRO et al., 2006; YIN et al., 2007; PANDEY et al., 2008; MOHAMED et al., 2008; VIEIRA et al., 2009). Ainda, quando há aumento no custo energético para manter o sistema antioxidante durante o processo de estresse oxidativo, o próprio processo de conversão de energia celular também reduz os estoques de moléculas redutoras intracelulares (VAN DER OOST et al., 2003).

Porém, uma vez que a atividade de GST não apresentou diferença de atividade entre os pontos, pode-se inferir que as altas concentrações de metais detectadas nos pontos AL - A e AL - B, e uma possível presença de POPs e cianotoxinas, causaram danos a essa enzima de forma que ela não foi capaz de conjugar com eficiência a glutathiona aos diversos xenobióticos possivelmente presentes nos organismos. Entretanto, mesmo com a depleção de GSH e inalteração da atividade de GST nos pontos com maior contaminação por metais em Alagados, danos significativos às proteínas não foram detectados, possibilitando a conclusão que apenas a ação direta antioxidante da GSH foi capaz de proteger o tecido cerebral contra possíveis danos que uma maior produção de EROs pode acarretar.

No fígado, por sua vez, houve maior atividade das enzimas SOD e CAT nos pontos AL - A e AL - B, em relação à AL - C. Ambas enzimas trabalham em conjunto na neutralização de EROs: primeiro a SOD transforma ânions superóxido em peróxido de hidrogênio e a CAT, por sua vez, age logo após degradando o peróxido de hidrogênio em H₂O e O₂ (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Dessa forma, tanto a atividade da SOD, como a da CAT tendem a ser maiores em peixes expostos a metais, além de diversos organofosforados e PAHs, pois todos esses compostos podem provocar desbalanço na produção de EROs e promover situações de estresse oxidativo

(VAN DER OOST et al., 2003; SANCHEZ et al., 2005; MONTEIRO et al., 2006; YIN, et al., 2007; FAROMBI et al., 2007; VIEIRA et al., 2009). Assim, a indução da atividade da SOD e da CAT nos pontos AL - A e AL - B pode estar correlacionada com a maior concentração de metais analisados na coluna d'água nesses pontos em Alagados. Ultimando, a elevação das atividades da SOD e CAT nos grupos AL - A e AL - B pode ter controlado o aumento na taxa de geração de EROs e, mesmo sem diferenças nos níveis de GSH e da atividade de GST entre os três grupos, os peixes de Alagados não apresentaram diferentes níveis de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas entre os grupos, ou seja, além de não haver danos sérios à integridade das membranas ou às proteínas, não houve promoção de estresse oxidativo nos organismos analisados. Ainda, esses dados biológicos reforçam a existência do gradiente de poluição dentro do reservatório.

Em WILHELM FILHO et al., (2006) *Geophagus brasiliensis* capturados num rio referência - com pouca influência antropogênica e baixas concentrações de metais - apresentaram valores médios de 7,6 U/mg prot para a atividade da SOD e 2, 2 nmol/mg prot para concentração de GSH em fígado. Esses dados reforçam a ideia de que o ponto AL - C é atualmente o menos impactado pela poluição antrópica, já que apresentou valor médio de 7,1 U/mg para a atividade da SOD. Ainda, essa apreciação de valores dos biomarcadores, juntamente com a análise de metais na água, reforçam a ideia de que a saúde dos peixes de Vossoroca e, por consequência, a qualidade de água do reservatório, apresentam-se menos degradadas que o classificado pelo relatório do IAP pois os organismos desse reservatório apresentaram valores de SOD e GSH próximos ao encontrado no ambiente pouco degradado, respectivamente 8, 481 U/mg prot e 3, 465 nmol/mg prot.

A histopatologia, dentre os diversos biomarcadores utilizados na avaliação de danos causados à biota por poluentes, é considerada como um dos únicos capazes de estimar injúrias causadas por exposições crônicas, pois é uma ferramenta que mostra a integração cumulativa de efeitos dos xenobióticos no organismo. O fígado, como principal órgão detoxificante em vertebrados, é um dos principais alvos dos xenobióticos em geral, e também um dos órgãos que mais apresenta danos histopatológicos. As necroses foram

uma das alterações mais recorrentes nos peixes analisados; são lesões irreversíveis ao tecido e estreitamente ligadas à exposição crônica a poluentes, incluindo metais como o chumbo, cobre e manganês (BERNET et al., 1999, RABITTO et al., 2005; MELA et al., 2013). 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 consequências deletérias para a função do órgão (AKAISHI et al., 2004). Centros de melanomacrófagos (CMMs) são grupos de células que apresentam três pigmentos principais: melanina, lipofuscina e hemosiderina e são encontradas em tecidos de vertebrados heterotérmicos (AGIUS & ROBERTS, 2003). Diversos autores sugerem que a contagem de CMMs pode ser indicador sensível da saúde dos peixes e condições ambientais estressantes (AGIUS & ROBERTS, 2003; CAMARGO & MARTINEZ, 2007; HINTON et al., 2008; BALAMURUGAN et al., 2012), ainda CMMs podem estar relacionados com a reciclagem de restos celulares e de materiais exógenos (HAAPARANTA et al., 1996; BALAMURUGAN et al., 2012).

Assim, a constatação de alta incidência de necroses nos pontos analisados em Alagados associada a elevados números de CMMs/mm² nos peixes podem estar diretamente relacionados a grandes quantidades de restos celulares resultantes das necroses (AU, 2004). Pode-se também averiguar que o ponto AL - C apresentou alta frequência relativa para a presença de colestase, esteatose e necroses e foi o grupo com maior concentração de CMM's/mm², o que permite a inferência de que este ponto possa ter passado por mudanças nas condições físico-químicas e, em algum momento pretérito, aumentado a biodisponibilidade dos contaminantes para a coluna d'água e causando efeitos deletérios detectáveis apenas quando do uso de um biomarcador que integre os efeitos de xenobióticos ao longo do tempo. Ainda, é importante ressaltar o hábito alimentar de *G. brasiliensis* baseia-se no forrageio de sedimento e que quando da época reprodutiva a espécie constrói ninhos nas encostas dos rios e reservatórios (SUZUKI & AGOSTINHO, 1997), e esses comportamentos permitem que o peixe entre em contato direto com os metais no sedimento. Em relação à alta frequência relativa de danos histopatológicos encontrados no fígado, detecta-se que a incidência de necroses foi acima de 60% em todos os grupos analisados, inclusive em Vossoroca, o que permite a

inferência de que os dois reservatórios são negativamente impactados pela atividade antrópica, mesmo que em níveis diferentes.

Outra alteração frequente nos peixes analisados, porém ainda pouco estudada e compreendida em organismos aquáticos devido à baixa frequência observada em estudos ecotoxicológicos (WOLF & WOLFE, 2005; SAFAHIEH et al., 2011), foi a colestase intrahepática. A retenção biliar ocorre no citoplasma dos próprios hepatócitos, onde o pigmento pardo-esverdeado aparece na forma de pequenos grumos. É uma alteração atribuída a uma falha na função hepática ligada a acumulação de bilirrubina nos tecidos, normalmente causada pela obstrução dos ductos biliares ou a inibição da capacidade de glucuronidação, necessária para a excreção da bilirrubina (NIKINMA & OIKARI, 1982; MOREIRA et al., 2013). Essa situação pode acarretar danos à membrana plasmática, devido a ação detergente dos sais biliares, e posterior morte celular tanto por apoptose, quanto por necrose (BIAGIANTI-RISBOURG et al., 1998; JAESCHKE et al., 2002). Alguns estudos já relacionaram a exposição a metais e outros xenobióticos com o aparecimento de colestase nos fígados de peixes (JAESCHKE et al., 2002; AYAS et al., 2007; SAFAHIEH et al., 2011; MOREIRA et al., 2013). Portanto, é possível que a alta frequência relativa de necroses em todos os grupos seja tanto por danos diretos dos xenobióticos ao tecido, quanto por danos indiretos causados pelo acúmulo de sais biliares e posterior morte celular.

As brânquias têm por característica principal serem altamente vascularizadas e, como estão em contato direto com a água, são o primeiro sítio de contato com os poluentes quando biodisponíveis na coluna d'água. Por essa razão são muito vulneráveis a danos histopatológicos e podem até mesmo indicar efeitos deletérios iniciais de baixas concentrações de xenobióticos (PAWERT et al, 1998).

No presente estudo foram encontradas alterações histopatológicas semelhantes e com frequências relativas equivalentes nas brânquias de *Geophagus brasiliensis* tanto nos três pontos de Alagados quanto no ponto de coleta de Vossoroca. Os danos com maiores frequências relativas encontradas em peixes expostos cronicamente às águas dos dois reservatórios foram

alterações epiteliais na lamela secundária, descamação e necroses. Esses danos são alterações ditas regressivas, que culminam numa redução funcional do órgão (BERNET et al., 1999; BIAGINI et al., 2009) e refletem diretamente dificuldades fisiológicas na troca de gases entre o epitélio branquial e o meio aquático; são também considerados como injúrias tipicamente induzidas por altas concentrações de metais nas águas (PANDEY et al., 2008).

As alterações mais bem descritas na literatura como fusão lamelar, neoplasias, hiperplasias e aneurismas também foram observadas em *G. brasiliensis* expostos cronicamente às águas dos dois reservatórios. Entretanto, além de apresentarem baixa frequência relativa no estudo em questão, elas são consideradas injúrias inespecíficas - que não podem indicar nenhuma classe de xenobiótico - mesmo que reflitam o efeito direto de poluentes (WONG & WONG; MAZON et al., 2002; PANDEY et al., 2008; LIU et al., 2011).

Assim, entende-se que todos os quatro pontos de coleta estão negativamente impactados pela presença de xenobióticos, principalmente metais. Porém, como as brânquias são um tecido muito sensível a danos por poluentes, ela pode não conseguir articular de forma satisfatória a integração dos xenobióticos durante um longo período de tempo, como é a exposição crônica. Isso porque não houve diferenças significativas nas frequências relativas de lesões entre os Reservatórios de Alagados e Vossoroca, mesmo que este último apresente diversas evidências químicas e biológicas de ser menos impactado pela poluição antrópica.

No ensaio de western blotting para detecção de VTG foi constatado que apenas as fêmeas apresentam VTG na corrente sanguínea, não evidenciando nenhum tipo de desregulação endócrina detectável nos animais machos. Porém, a técnica de western blotting é um método qualitativo para detecção de proteínas; já a técnica ELISA é um método quantitativo de maior sensibilidade para detectar uma concentração de proteínas pequena em uma amostra. Sendo assim, são necessários que mais estudos sobre o assunto sejam realizados no reservatório para a afirmação concreta que não há desregulação endócrina nos peixes machos de Alagados, visto que eles estão expostos a diversos metais e outros possíveis POPs que são reconhecidamente desreguladores endócrinos. Entretanto, é possível especular que o Reservatório de Alagados possa apresentar baixa concentração de químicos

ambientais estrogênicos ou maior concentração de compostos antiestrogênicos.

Finalizando, como pode ser observado tanto por análises químicas quanto biológicas com o uso de biomarcadores é possível detectar a ação antrópica deletéria nos Reservatórios de Alagados e Vossoroca. Porém, mesmo que tanto análises químicas quanto biológicas tenham corroborado entre si o uso de um método não exclui o outro. De forma que, apenas com o cruzamento das análises de metais na água e sedimentos e dos dados de efeitos biológicos nos peixes pode-se interpretar holisticamente as condições às quais estão expostas tanto a biota aquática quanto a população humana que habita essas áreas e, de forma direta ou indireta, depende dessas águas.

Ainda, com esses dados é possível afirmar a existência de um gradiente de poluição no Reservatório de Alagados que é responsável pelo abastecimento de três importantes cidades do estado do Paraná. Quanto ao Reservatório de Vossoroca, são necessários mais estudos ecotoxicológicos porém dados preliminares desse trabalho já podem questionar a classificação de degradação do mesmo pelo IAP.

7. CONCLUSÕES

Pode-se constatar que a exposição crônica às águas dos Reservatórios de Alagados e Vossoroca modifica a morfologia básica de órgãos alvos como o fígado e as brânquias, pois diversas alterações histológicas que podem prejudicar o correto funcionamento desses tecidos foram encontradas.

Mesmo que existam evidências de neurotoxicidade nos peixes avaliados em Alagados, não foram constatadas situações de estresse oxidativo que gerassem danos à membrana plasmática das células nem às proteínas. A existência de desregulação endócrina não foi confirmada para os organismos avaliados expostos cronicamente as águas do Reservatório de Alagados.

Os organismos avaliados no Reservatório de Vossoroca não apresentaram indícios de neurotoxicidade ou de danos causados por estresse oxidativo a macromoléculas.

O trabalho traz importantes contribuições para o incremento do conhecimento sobre a resposta a estressores que apresenta a espécie *Geophagus brasiliensis*, sendo que os melhores biomarcadores para a avaliação de danos causados por exposições crônicas a xenobióticos, com destaque para os metais, aos peixes analisados foram a atividade da AchE em músculo e cérebro, avaliação histopatológica de fígado e contagem de centros de melanomacrófagos.

Outro ponto importante que este trabalho traz à tona é a imprescindibilidade de novos e melhores parâmetros para a avaliação da qualidade de água pelas autoridades competentes. Esses novos critérios não devem excluir análises periódicas da saúde da fauna aquática com o uso de biomarcadores.

8. BIBLIOGRAFIA

ABELHA, M. C. F.; GOULART, E. Population structure, condition factor and reproductive period of *Astyanax paranae* (Eigenmann, 1914) (Osteichthyes: Characidae) in a small and old Brazilian reservoir. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 3, p. 503-512, 2008.

ADAMS, S.M. **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. American Fisheries Society, 2002.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Disease**, v. 26, p. 499-509, 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. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 244 – 253, 2004.

ALBUQUERQUE FILHO, J. L.; SAAD, A. R.; ALVARENGA, M. C. Considerações acerca dos impactos ambientais decorrentes da implantação de reservatórios hidroelétricos com ênfase nos efeitos ocorrentes em aquíferos livres e suas consequências. **Geociências**, v. 29, p. 355-367, 2010.

AMORIM, L. C. A. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 158-170, 2003.

ANDERSEN, L.; HOLBECH, H.; GESSBO, A.; NORRGREN, L.; PETERSEN, G.I. Effects of exposure to 17 α -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 134, p. 365–374, 2003.

ANDRADE FILHO, A.G.; DOMINGUES, A.B.; SHAMNE, T. M. Hidrogramas Unitários nas Seções de Estudo dos Tributários do Manancial Alagados em Ponta Grossa- PR. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 2, p. 107 – 117, 2001.

ANDREOLI, C. V.; DALARMI, O.; LARA, A.I.; ANDREOLI, F.N. Limites ao desenvolvimento da Região Metropolitana de Curitiba, impostos pela escassez de água. In: SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E

AMBIENTAL 2000, Porto Seguro. **Anais do Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental - Porto Seguro** p. 185-195, 2000.

ARNDT, A.; BORELLA, M. I.; ESPÓSITO, B. P. Toxicity of manganese metallodrugs toward *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 96, p. 46-50, 2014.

ARUKWE, A.; GOKSOYR, A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption "Review". **Comparative Hepatology**, v. 2, p. 1-21, 2003.

ASHRAF, G. M.; REGNIER, F. E. Proteomic Identification of Carbonylated Proteins and Their Oxidation Sites. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 3766 -3780, 2010.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 145, p. 282–287, 2007.

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.

AYAS, Z.; EKMEKCI, G.; OZMEN, M.; YERLI, S. V. Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 242-249, 2007

BALAMURUGAN, S.; DEIVASIGAMANI, B.; KUMARAN, S.; SAKTHIVEL, M.; RAJSEKAR, T.; PRIYADHARSINI, P. Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bio-indicator of environmental change. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. 635–S638, 2012.

BENINCÁ, C. **Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho-Jaguaruina (SC) e Santa Marta – Laguna (SC), utilizando *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae)**. Dissertação (Mestrado em Genética) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. **Cadernos temáticos de Química nova**. 6: 4-6. 2005.

BERNET, D. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Disease**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G.; BOULEKBACHE, H. Ultrastructural response of the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, sac-fry exposed to acetone. **Chemosphere**, v. 36, p. 1911-1922, 1988

BIAGINI, F. R.; OLIVEIRA DAVID, J. A.; FONTANETTI, C. S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**, v. 40, p. 839-844, 2009.

BLUM, C. T.; POSONSKI, M.; HOFFMANN, P. M.; BORGIO, M. **Espécies vegetais invasoras em comunidades florestais nativas nas margens da Represa do Vossoroça, APA de Guaratuba, Paraná, Brasil.** Trabalho apresentado no I Simpósio Brasileiro sobre Espécies Exóticas Invasoras, Brasília, Brasil, 2005.

BOUSKILL, N. J.; HANDY, R. D.; FORD, T. E.; GALLOWAY, T. S. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 342-349, 2006.

BRAATHEN, M.; MDEGELA, R.H.; CORREIA, D.; RUNDBERGET, T.; MYBURGH, J.; BOTHA, C.; SKAARE, J.U.; SANDVIK, M. Vitellogenin in African Sharptooth Catfish (*Clarias gariepinus*): Purification, Characterization, and Elisa Development. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 72, p. 173–183, 2009.

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

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 327-336, 2007.

CAMARGO, M.M.P.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p. 40-46, 2009.

CASTRO-GONZÁLES, M. I.; MÉNDEZ-ARMENTA, M. Heavy metals: Implications associated to fish consumption. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 263–271, 2008.

CHARLET, L.; CHAPRON, Y.; FALLER, P.; KIRSCH, R.; STONE, A. T.; BAVEYE, P. C. Neurodegenerative diseases and exposure to the environmental metals Mn, Pb, and Hg. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, p. 2147-2163, 2012.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.** London: E & FN Spon, 1999.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In MARKERT, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G. **Bioindicators and biomonitoring**, Oxford: Gulf Professional Publishing, 2003. p. 639- 676.

CLEMENTE, Z. **Monitoramento do reservatório de Alagados, Ponta Grossa (PR) através de biomarcadores e análise de cianotoxinas.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CONAMA – Comissão Nacional do Meio Ambiente - Resolução 357 de 17 de março de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 53, Seção 1, p. 58-63, 2005.

CONAMA – Comissão Nacional do Meio Ambiente - Resolução 454 de 01 de novembro de 2012. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Seção 1, p. 66, 2012.

COSTA, D.D.M. **Caracterização da molécula de vitelogenina expressa por machos de *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae) e sua utilização no biomonitoramento de ambientes aquáticos.** Trabalho de graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2009.

COSTA, P. M.; DINIZ, M. S.; CAEIRO, S.; LOBO, J.; MARTINS, M.; FERREIRA, A. M.; CAETANO, M.; VALE, C.; DELVALLS, T. A.; COSTA, M. H. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. **Aquatic Toxicology**, v. 92, p. 202-212, 2009.

COSTA, P. R.; PEREIRA, P.; GHILHERME, S.; BARATA, M.; SANTOS, M. A., PACHECO, M.; POUSÃO FERREIRA, P. Hydroxybenzoate paralytic shellfish toxins induce transient GST activity depletion and chromosomal damage in white seabream (*Diplodus sargus*). **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 63-69, 2012.

CROUCH R. K.; GANDY S. E.; KIMSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 35, p. 235-41, 1981.

DALLINGER, R.; RAINBOW, P. S. **Ecotoxicology of metals in invertebrates.** Chelsea: Lewis publishers, 1993.

DAVIES, O. A.; ALLISON M.E. UYI, H. S. Bioaccumulation of heavy metals in water, sediment and periwinkle (*Tympanotonus fuscatus var radula*) from the Elechi Creek, Niger Delta. **African Journal Biotechnology**, v. 5, p. 968-973, 2006.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47–95, 2002.

DUTTA, H. M.; ARENDS, D. A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research**, v. 91, p. 157–162, 2003.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY D.; ANDRES J. R. V.; FEATHERSTHONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-96, 1961.

FAROMBI, E. O.; ADELOWO, O. A.; AJIMOKO, Y. R. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 4, p. 158-165, 2007.

FERREIRA, A. P.; HORTA, M. A. P.; CUNHA, C. L. N. Assessment of heavy metal concentrations in sediment, water and organs of *Nycticorax nycticorax* (Black-crowned Night Heron) in Sepetiba Bay, Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Integrated Coastal Zone Manage**, v. 10, p. 229-241, 2010.

FILHO, M. V. S.; OLIVEIRA, M. M.; SALLES, J. B.; BASTOS, V. L. F. C.; CASSANO, V. P. F.; BASTOS, J. C. Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterases from brain of neotropical fishes. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 247–254, 2004.

FLORIO, J. C. Absorção, distribuição, biotransformação e eliminação. In: SPINOSA, H. S; GORNIK, S. L; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002. p. 25-40.

FLOURIOT, G.; PAKDEL, F.; DUCOURET, B.; LEDREAN, Y.; VALOTAIRE, Y. Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction: vitellogenin and estrogen receptor gene. **Molecular Reproduction and Development**, v. 48, p. 317-323, 1997.

FRANZLE, O. Bioindicators and environmental stress assessment. In: MARKERT, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G. **Bioindicators and biomonitoring**. Oxford: Gulf Professional Publishing, 2003. p. 41- 84.

GELINAS, M.; JUNEAU, P.; GAGNÉ, F. Early biochemical effects of *Microcystis aeruginosa* extracts on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 161, p. 261–267, 2012.

GILL, T. S.; TEWARI, H.; PANDE, J. Use of fish enzyme system to monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 97, p. 287–292, 1999.

GUILHERMINO, L.; et al. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with Juvenile *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 32, p. 727-738, 1996.

HAAPARANTA, A.; VALTONEN, E. T.; HOFFMANN, R.; HOLMES, J. Do macrophage centres in freshwater fishes reflect the differences in water quality? **Aquatic Toxicology**, v. 34, p. 253-272, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Nova York: Oxford University Press, 2007.

HAYES, M. A.; TIMMINS, A. C.; YAU, E. H.; PALAZZO, M.; WATSON, D.; HINDS, C.J. Oxygen transport patterns in patients with sepsis syndrome or septic shock: influence of treatment and relationship to outcome. **Critical Care Medicine**, v. 25, p. 926-936, 1997.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. 2 ed. Florida: CRC press, 1995.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K.B. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Michigan: John Wiley & Sons 2004. p. 319–368.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELAN, R.A. & OKIHIRO, M.S. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopathological markers of antropogenic stress**. 1 ed. Lewis Publishers, 1992. p. 155-208.

HINTON, D. E.; SEGNER, H.; AU, D.W.; KULLMAN, S. W.; HARDMAN, R. C. Liver toxicity. In: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **Toxicology of fishes**. USA: CRC press, 2008. p. 327-400.

HIRAYAMA, J.; CHO, S.; SASSONE-CORSI, P. Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 15747–15752, 2007.

HOWE, P.D.; MALCOM, H.M.; DOBSON, S. Manganese and its Compound: Environmental Aspects. **Concise International Chemical Assessment Document** 63 ed. New York: World Health Organization, 2004.

HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE, P.M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers: biochemical, physiological, and histological marker of antropogenic stress**. USA: Lewis Publishers, 1992.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). **Monitoramento da qualidade dos reservatórios do estado do Paraná, no período de 1999 a 2004**. Curitiba: Imprensa oficial, 2004.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). **Monitoramento da qualidade dos reservatórios do estado do Paraná, no período de 2005 a 2008**. Curitiba: Imprensa oficial, 2009.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS) — **Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Geneva, 1993. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/browse?type=mesh&authority=Biological+Markers>> Acesso em: 14 de Junho de 2013.

JAESCHKE, H.; GORES, G. J.; CEDERBAUM, A. I.; HINSON, J. A.; PESSAYRE, D.; LEMASTERS, J. J. Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 65, p. 166-176, 2002.

JESWINDER, S.; DEXTER, D. T.; LESS, A. J.; DANIEL, S.; JAVOY- AGID, F.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Annals of Neurology**, v. 36, p. 348–355, 2004.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, p. 384- 389, 1992.

JONES, W. W.; SAUTER, S. **Distribution and abundance of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Indiana lakes and reservoirs.** Bloomington: SPEA-Indiana University, 2005.

KAR, D; SUR, P.; MANDAL, K.; SAHA, T.; KOLE, R. K. Assessment of heavy metal pollution in surface water. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 5, p. 119-124, 2008.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183–6188, 1976.

KIDD, P. M. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. **Alternative Medicine Review**, v. 3, p. 155-176, 1997.

KINNBERG, K.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P. Effects of octylphenol and 17 β -estradiol on the gonads of guppies (*Poecilia reticulata*) exposed as adults via the water or as embryos via the mother. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 134, p. 45-55, 2003.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994.

LI, L.; ZHENG, B.; LIU, L. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends. **Procedia Environmental Sciences**, v. 2, p. 1510–1524, 2010.

LIU, X. J.; LUO, Z.; LI, C. H.; XIONG, B. X.; ZHAO, Y. H.; LI, X. D. Antioxidant responses, hepatic intermediary metabolism, histology and ultrastructure in *Synechogobius hasta* exposed to waterborne cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1156-1163, 2011.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulates reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 656-666, 2001.

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999.

MANNICH, M.; GONÇALVES, V. D.; BERNARDO, J. W. Y.; BLENINGER, T. B.; FROEHNER, S.; FERNANDES, C. V. S. **Caracterização de alguns parâmetros limnológicos no reservatório Vossoroça**. Trabalho apresentado no XIX Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. Maceió, Alagoas, 2011.

MARTINEZ, C. B. R.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 797-807, 2004.

MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C.; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research**, v. 88, p. 52-63, 2002.

MAZZONI, R.; IGLESIAS-RIOS, R. Environmentally related life history variations in *Geophagus brasiliensis*. **Journal of Fish Biology**, v. 6, p. 1606–1618, 2002.

MELA, M.; GUILOSKI, I. C.; DORIA, H. B.; RABITTO, I. S.; SILVA, C. A.; MARASCHI, A. C.; PRODOCIMO, V.; FREIRE, C. A.; RANDI, M. A. F.; RIBEIRO, C. A. O.; SILVA DE ASSIS, H. C. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 108-116, 2013.

MOHAMED, S.; KHEIREDDINE, O.; WYLLA, H. M.; ROQUIA, R.; AICHA, D.; MOURAD, B. Proportioning of biomarkers (GSH, GST, Ache, Catalase) indicator of pollution at *Gambusia affinis* (Teleostei Fish) exposed to cadmium. **Environmental Research Journal**, v. 2, p. 177-181, 2008.

MONTEIRO, D. A.; DE ALMEIDA, J. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 143, p. 141–149, 2006.

MONTEIRO, V.; CAVALCANTE, D. G. S. M.; VILÉLA, M. B. F. A.; SFIA, S. H.; MARTINEZ, C. B. R. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 104, p. 291-298, 2011.

MONTSERRAT, J. M.; MARTINEZ, P. E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L. L.; MARTINS, C.M.; PINHO, G. L.; CHAVES, I. S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 146, p. 221-234, 2007.

MOORE, M.N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, v. 59, p. 1-15, 2002.

MORAES, M. F. P. G.; BARBOLA, I. F.; DUBOC, L. F. Feeding habits and morphometry of digestive tracts of *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes, Cichlidae), in a lagoon of high Tibagi river, Paraná state, Brazil. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, p. 37-45, 2004.

MORAES, M. F. P. G.; ANAZAWA, T. M.; BARBOLA, I. F.; NASCIMENTO, E. A.; SEPKA, E. R.; LOPES COSTA, C. A. **Avaliação da comunidade de insetos aquáticos como ferramenta para o monitoramento do manancial de Alagados, em Ponta Grossa, PR**. Trabalho apresentado no VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu, Minas Gerais, 2007.

MOREIRA, C. B.; RODRIGUES, R. V.; ROMANO, L. A.; GUSMÃO, E. P.; SEYFFERT, B. H.; SAMPAIO, L. A.; MIRANDA-FILHO, K. C. Genotoxicity and histological alterations in grey mullet *Mugil liza* exposed to petroleum water-soluble fraction (PWSF). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 5565-5574, 2014.

MYERS, M. S.; FOURNIE, J. W. Histopathological biomarkers as integrators of anthropogenic and environmental stressors. In: ADAMS, S.M. **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. American Fisheries Society, 2002. p. 221-287.

NAGLER, J. J.; IDLER, D. R. Ovarian uptake of vitellogenin and other very high density lipoproteins in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and their relationship with yolk proteins. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 68, p. 330-335, 1990.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS). Copper. **Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants**, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C, 1977.

NIKIMA M.; OIKARI, A. Physiological changes in trout (*Salmo gairdneri*) during a short-term exposure to resin acids and during recovery. **Toxicology Letters**, v. 14, p. 103-110, 1982.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p. 1287-1311, 2001.

NRIAGU, J. O. A history of global metal pollution. **Science**, v. 272, p. 223-224, 1996.

NRIAGU, J. O.; PACYNA, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. **Nature**, v. 333, p. 134-139, 1988.

NÚCLEO DE ESTUDOS EM MEIO AMBIENTE (NUCLEAM). **Bacia Hidrográfica do Manancial Alagados**. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2002.

OLIVA, M.; PERALES, J. A.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L.; GALINDO-RIANO, M. D. Biomarkers responses in muscle of *Senegal sole* (*Solea senegalensis*) from a heavy metals and PAHs polluted estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 2097–2108, 2012.

ORLANDO, E. F.; DENSLOW, N. D.; FOLMAR, L. C.; GUILLETTE, L. J. A comparison of the reproductive physiology of largemouth bass, *Icropterus salmoides*, collected from the Escambia and Blackwater rivers in Florida. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 199-204, 1999.

OSÓRIO, F. H. T. **Avaliação da qualidade da água do rio Tubarão através de biomarcadores em *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2011.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; ANSARI, R. A.; ALI, M.; KAUR, M.; HAYAT, F.; RAISUDDIN, S. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-biological Interactions**, v. 174, p. 183-192, 2008.

PANTKE, U.; VOLK, T.; SCHMULTZLER, M.; KOX, W. J.; SITTE, N.; GRUNE, T. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27 p. 1080-1086, 1999.

PARAGUASSU, A. R.; ALVES, D. R.; LUQUE, J. L. Metazoários parasitos do acará *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824) (Osteichthyes: Cichlidae) do Reservatorio de Lajes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, p. 35-39, 2005.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN, C.D. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 113 -186.

PAWERT, M.; MULLER, E.; TRIEBSKOR N. R. Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. **Tissue and Cell**, v. 30, p. 617-626, 1998.

QUINLAN, G. J.; GUTTERIDGE, J. M. C. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: TANIGUCHI, N.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species**. 1 ed. New York: Oxford University, 2000. p. 257-259.

RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*:

hitopatological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 147-156, 2005.

RAINBOW, P. S. Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. **Environmental International**, v. 33, p. 576 – 582, 2007.

RICHETTI, S. K.; ROSEMBERG, D. B.; VENTURA- LIMA, J.; MONSERRAT, J. M.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **Neurotoxicology**, v. 32, p. 116–122, 2011.

ROCHA, D. A. M. **Alterações de enzimas de biotransformação de xenobióticos na fase inicial da esquistossomose mansônica murina**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

ROEX, E. W. M.; KEIJZERS, R.; VAN GESTEL, C.A.M. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 451-460, 2003.

RUAS, C. B. G.; CARVALHO, C.D.S.; ARAÚJO, H.S.S.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; FERNANDES, M.N. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 86-93, 2008.

RUDIGER, H. W. Biomonitoring in occupational medicine. In: MARQUAT, H.; SCHAFER, S. G.; McCLELLAN R.; WELSCH, F. **Toxicology**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 1027-39.

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M. A.; STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 168-174, 2004.

SAFAHIEH, A.; HEDAYATI, A.; SAVARI, A.; MOVAHEDINIA, A. Effect of sublethal dose of mercury toxicity on liver cells and tissue of yellowfin seabream. **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, p. 583-592, 2011.

SANCHEZ, W.; PALLUEL, O.; MEUNIER, L.; COQUERY, M.; PORCHER, J.M.; AIT-AISSA, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. **Environmental and Toxicology Pharmacology**, v. 19, p. 177–83, 2005.

SCHIMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal. Adaptação e Meio ambiente**. 5 ed. São Paulo: Santos, 1996.

SCOTTO, G.; CARVALHO, I. C. D. M.; GUIMARÃES, L. B. **Desenvolvimento Sustentável**. Petrópolis: Vozes, 2007.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192–205, 1968.

SEVANIAN, A.; MCLEOD, L. Formation and biological reactivity of lipid peroxidation products. In: WALLACE, K. B. **Free Radical Toxicology**. Washington: Taylor & Francis, 1997. p. 47-70.

SHIODA, T.; WAKABAYASHI, M. Effects of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 40, p. 239-243, 2000.

SILVA DE ASSIS, H.C. Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Técnica de Berlim, Alemanha, 1998.

SINGH, P. B.; SINGH, T. P. Impact of γ -BHC on sex steroid levels and their modulation by ovine luteinizing hormone-releasing hormone and *Mystus* gonadotropin in the fresh-water catfish *Heteropneustes fossilis*. **Aquatic Toxicology**, v. 21, p. 93–102, 1991.

SOLOMON, F. **Impacts of metals on aquatic ecosystems and human health**. Disponível em: <<http://www.infomine.com/library/publications/docs/Mining.com/Apr2008c.pdf>> Acesso em: 15 de abril de 2013.

SPECKER J. L.; SULLIVAN, C. V. **Vitellogenesis in fishes: status and perspectives**. Ottawa: National Research Council of Canada, 1993.

SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. **Environmental and Health Perspectives**, v. 103, p. 173-178, 1995.

SUZUKI, H. I.; AGOSTINHO, A. A. Reprodução de peixes do reservatório de Segredo. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 1997. p. 163-182.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHEKE, B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. **Chemosphere**, v. 82, p. 291–307, 2011.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178- 189, 2006.

VEGA-LÓPEZ, A.; MARTÍNEZ-TABACHE, L.; DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, M. L.; GARCÍA-LATORRE, E.; RAMÓN-GALLEGOS, E.; GARCÍA-GASCA, A. Vitellogenin induction in the endangered goodeid fish *Girardinichthys viviparus*: Vitellogenin characterization and estrogenic effects of polychlorinated biphenyls. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 142, p. 356–364, 2006.

VENTURA, E. C. **Biomarcadores Bioquímicos em *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Perciformes – Haemulidae) e *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes – Sciaenidae), coletados na costa sudeste brasileira**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2004.

VIANNA, V. O.; MENDES, J. C. R. **Levantamento do impacto ambiental causado pelas atividades pecuárias localizadas na região da bacia hidrográfica do mancial de Alagados, Paraná**. Trabalho apresentado no Zootec 2008, João Pessoa, Paraíba, 2008.

VIEIRA, L. R.; GRAVATO, C.; SOARES, A. M. V. M.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behavior. **Chemosphere**, v. 76, p. 1416–1427, 2009.

VIEIRA, M. C.; TORRONTERAS, R.; CORDOBA, F. CANALEJO, A. Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 212–217, 2012.

YIN, Y.; JIA, H.; SUN, Y.; YU, H.; WANG, X.; WU, J.; XUE, Y. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 145, p. 288–293, 2007.

WAHLI, T.; MEIER, W.; SEGNER, H.; BURKHARDT-HOLM, P. Immunohistochemical detection of vitellogenin in male brown trout from Swiss rivers. **Histochemical Journal**, v. 30, p. 758-759, 1998.

WATTS, M.; PANKHURST, N. W.; PRYCE, A.; SUN, B. Vitellogenin isolation, purification and antigenic cross-reactivity in three teleost species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 134, p. 467–476, 2003.

WEISS, C. M. The determination of cholinesterase in the brain tissues of three species of freshwater fish and its inactivation in vivo. **Ecology**, v. 30, p. 194-199, 1958.

WENDELAAR BONGA, S. E. The Stress Response in Fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591- 620, 1997.

WHITEHEAD, A.; ANDERSON, S.L.; RAMIREZ, A.; WILSON, B.W. Cholinesterases in aquatic biomonitoring: assay optimization and species–

specific characterization for a California native fish. **Ecotoxicology**, v. 14, p. 597–606, 2005.

WIECHETECK, G.K.; MORO, R.S.; SCHMITT, J.; SALDANHA, J. **Biomonitoramento da qualidade de água de abastecimento de Ponta Grossa, Paraná**. Trabalho apresentado na Jornada Científica de Pesquisa Social, Ponta Grossa, Paraná, 1999.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; TRIBESS, T. B.; PEDROSA, R. C.; SOARES, C. H. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 719–26, 2001.

WOLF, J. C.; WOLFE, M. J. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. **Toxicology Pathology**, v. 33, p. 75-85, 2005.

WONG, C. K. C.; WONG, M. H. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 48, p. 517-527, 2000.

WOODBURN, K.; WALTON, R.; McCROHAN, C.; WHITE, K. Accumulation and toxicity of aluminium-contaminated food in the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 535-542, 2011.

YOKEL, R. A. Manganese flux across the blood–brain barrier. **Neuromolecular Medicine**, v. 11, p. 297-310, 2009.