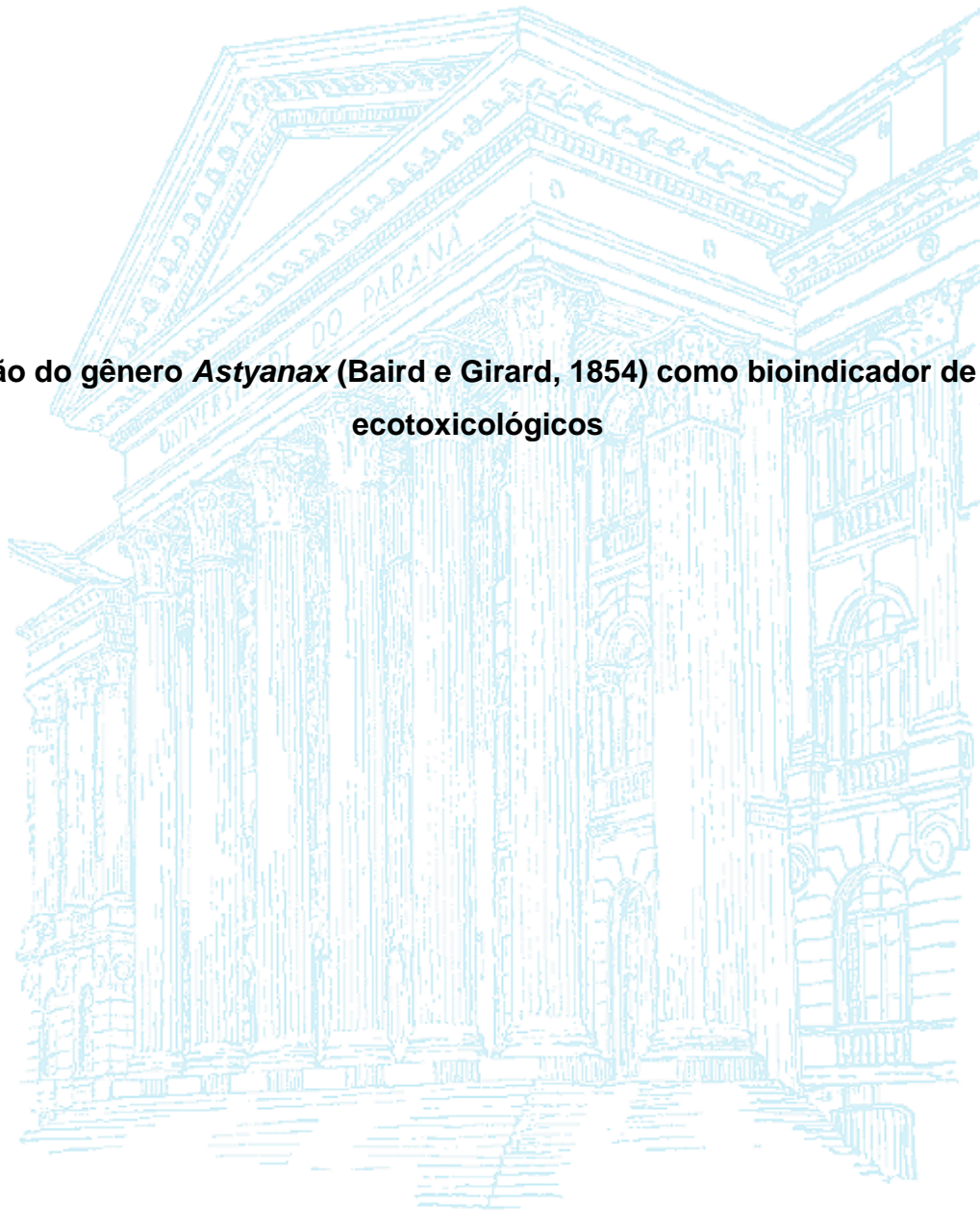


FLÁVIO HENRIQUE TINCANI OSÓRIO

Validação do gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) como bioindicador de testes ecotoxicológicos



CURITIBA

2016

FLÁVIO HENRIQUE TINCANI OSÓRIO

Validação do gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) como bioindicador de testes ecotoxicológicos

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de doutor em ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Marta Margarete Cestari

Coorientadora: Prof^a. Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf

CURITIBA

2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO
Código CAPES: 40001016048P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **FLAVIO HENRIQUE TINCANI OSORIO**, intitulada: **"Validação do gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) como bioindicador de testes ecotoxicológicos"**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Curitiba, 11 de Março de 2016.

Prof MARTA MARGARETE CESTARI (UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)

Prof ADRIANE MARTINS DE FREITAS (UTFPR)

Prof CAROLINA ARRUDA DE OLIVEIRA FREIRE (UFPR)

Prof IZONETE CRISTINA GUILOSKI (UFPR)

Prof VINÍCIUS ABILHÔA (UFPR)





Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 834

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.039622/2014-63

APROVADO: 14/10/2014 – R.O. 07/2014

TÍTULO: Validação do gênero *Astyanax* (BAIRD e GIRARD, 1854) como bioindicador de testes ecotoxicológicos

AUTORES: Marta Margarete Cestari, Flávio Henrique Tincani Osório, Wanessa Algarte Ramsdorf

DEPARTAMENTO: Genética


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA

Agradecimentos

À minha orientadora e amiga, prof^a. dra. Marta Margarete Cestari, por toda a oportunidade, confiança e autonomia com que me deixou trabalhar nesses quatro anos, além dos conselhos pessoais e profissionais com os quais sempre pude contar.

À minha coorientadora e também amiga, prof^a. dra. Wanessa Algarte Ramsdorf, por disponibilizar a infraestrutura do seu laboratório.

Ana Carol, Antônio, Gustavo e Laércio não tenho palavras para agradecer a vocês por tudo o que fizeram por mim durante o período da minha pesquisa, saibam que sem vocês nenhum parágrafo deste trabalho teria sido escrito. A gratidão é eterna.

Aos demais colaboradores, Cléber, Fábio, Gabrieli, Giovanna, Letícia e Thiago, por toda a presteza que tiveram comigo, mesmo com o acúmulo de trabalho e os prazos curtos.

Aos estagiários e técnicos de laboratório, Cíntia, Júlio, Júnior e demais. Nunca subestimem o trabalho que vocês fazem, pois ele é extremamente importante para que possamos alcançar os nossos objetivos.

Às meninas da UTFPR, em especial a Monike e a Rhaissa, que sempre me ajudaram quando eu estava fora do meu território.

Ao Edinei e ao sr. Renato pelo auxílio na coleta de algumas espécies de lambaris, e ao prof. dr. Vinícius Abilhoa, pela ajuda no aprendizado da identificação.

À Bruna, amor da minha vida que, em nossos altos e baixos, sempre esteve ao meu lado.

À minha família que, mesmo distante, sempre me apoiou e torceu por mim.

A todos os meus amigos da universidade e de fora, que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta tese.

E ao PPGECO, pelas oportunidades fornecidas ao longo do mestrado e do doutorado;

Com carinho,

F

“When ignorance reigns, life is lost.”

Rage Against the Machine

Sumário

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
1. Introdução geral.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	2
3. Objetivos.....	23
Capítulo 1 – Pseudorreplicação e o uso de biomarcadores em ensaios ecotoxicológicos com peixes.....	24
Capítulo 2 – Subindo a escada taxonômica: um gênero pode ser usado como bioindicador? Relações ecotoxicológicas entre as respostas de <i>Astyanax altiparanae</i> , <i>Astyanax bifasciatus</i> e <i>Astyanax ribeirae</i>	50
Capítulo 3 – Uma abordagem interespecífica para compreender a reprodutibilidade de dados ecotoxicológicos.....	86
4. Considerações finais.....	110

Resumo

Astyanax é um gênero não monofilético de peixe neotropical de água doce da família *Characidae* que possui uma ampla distribuição nas Américas e mais de 100 espécies descritas. Espécies de *Astyanax* são amplamente utilizadas em estudos ecotoxicológicos, tanto *in vivo* quanto *in situ*, devido às suas características ecológicas. O objetivo deste estudo é investigar a relação entre as respostas ecotoxicológicas de três espécies de *Astyanax* (*A. altiparanae*, *A. bifasciatus* e *A. ribeirae*), a fim de compreender como as diferentes espécies respondem a um mesmo cenário de contaminação. Para isso, foi realizada uma série de estudos que: (i) investigaram os desenhos experimentais em ecotoxicologia, a fim de identificar o melhor método para trabalhar com os organismos *in vivo*; (ii) verificaram os sistemas antioxidantes e de biotransformação das três espécies frente a contaminantes modelos (cobre e malathion) e; (iii) observaram se os mesmos padrões de respostas dos biomarcadores *in vivo* também ocorrem *in situ*. De maneira geral, os resultados mostraram que, apesar da não-indução ou de uma ação inesperada dos sistemas enzimáticos, todas as três espécies de *Astyanax* foram susceptíveis à contaminação de ambos os xenobióticos, uma vez que foram observados danos às suas macromoléculas. Além disso, foi verificada elevada semelhança interespecífica entre os padrões das respostas dos biomarcadores analisados *in vivo* com aqueles avaliados *in situ*, o que mostra que é possível obter um grau significativo de reprodutibilidade ecotoxicológica entre os dois tipos de estudos. Por meio desses estudos, esperamos contribuir para a criação de um banco de dados sobre o gênero em relação às suas respostas ecotoxicológicas e incentivamos novos estudos a serem realizados com *Astyanax* como modelo, mas também com outros gêneros e famílias de peixes, a fim de enriquecer o conhecimento necessário para ajudar as tomadas de decisões no sentido do monitoramento e conservação do ambiente natural.

Abstract

Astyanax is a non-monophyletic genus of neotropical freshwater fish of the Characidae family that has a wide distribution in the Americas. With more than 100 described species, fish from this genus are widely used in ecotoxicological studies, both *in vivo* and *in situ* due to its ecological characteristics. The aim of this study was to investigate the relationship between the ecotoxicological responses of three species of *Astyanax* (*A. altiparanae*, *A. bifasciatus* and *A. ribeirae*) in order to understand how the different species respond to a same contamination scenario. For this, a series of studies was conducted which: (1) investigated the experimental designs in ecotoxicology in order to identify the best method to work with living organisms; (2) verified the antioxidant systems and the biotransformation of the three species against model contaminants (copper and malathion) and; (3) observed if the same patterns of responses of *in vivo* biomarkers also occur *in situ*. Overall, the results showed that, although the non-induction or unclear action of the enzymatic systems, all three species of *Astyanax* were susceptible to the contamination of both xenobiotics, since damages were observed to their macromolecules. Moreover, it was verified a high interspecific similarity between the patterns of responses of biomarkers analyzed *in vivo* with those evaluated *in situ*, which shows that it is possible to obtain a significant degree of ecotoxicological reproducibility between the two types of studies. Through these studies, we hope to contribute for the creation of a database on the genus in relation to their ecotoxicological responses. Also, we encourage new studies to be conducted with *Astyanax* as a model, but also with other genera and families of fish in order to enrich the knowledge needed to help decision making towards the monitoring and conservation of the natural environment.

1. Introdução geral

Os peixes têm sido amplamente utilizados como bioindicadores para analisar as respostas biológicas referentes à contaminação presente nos sistemas aquáticos. A distribuição geográfica e a posição trófica que esses organismos possuem podem ser extremamente vastas, o que os tornam excelentes sentinelas do ponto de vista ecotoxicológico. Sendo assim, o estudo de espécies nas mais diversas posições é uma excelente forma de integrar os efeitos dos contaminantes presentes no meio com a saúde da biota, de modo a gerar dados que sirvam para a verificação das condições gerais da qualidade de determinado ecossistema (van der Oost *et al.*, 2003).

A geração desses dados empíricos a respeito da ação de xenobióticos é necessária para a compreensão dos efeitos biológicos resultantes de quadros de exposição (Baksi e Frazier, 1990). Sendo assim, a complementaridade de estudos *in vitro*, *in vivo* e *in situ* é condição imprescindível para se obter uma visão holística da interação xenobiótico-organismo dentro das escalas ecológicas.

Dessa forma, no que diz respeito a estudos *in situ*, a escolha adequada dos bioindicadores e biomarcadores é crucial para a realização de uma abordagem profunda, significativa e representativa do ecossistema em foco. No entanto, a coleta dos exemplares muitas vezes se apresenta como a maior dificuldade para esse tipo de estudo, podendo comprometer as investigações.

Os peixes do gênero *Astyanax*, por sua vez, são muito comuns nas bacias hidrográficas neotropicais, aparecendo em grande parte dos levantamentos ictiofaunísticos. Ainda, as espécies de *Astyanax* apresentam pouca diferenciação morfológica, ecológica e comportamental (Gurgel, 2004; Garavello e Sampaio, 2010) o que indica um grupo em especiação recente.

Uma vez que espécies de *Astyanax* são amplamente utilizadas em estudos ecotoxicológicos (Ramsdorf *et al.*, 2011; Costa-Silva *et al.*, 2015; Freire *et al.*, 2015), problemas amostrais podem aparecer devido à dificuldade taxonômica. A coleta dos exemplares muitas vezes acaba sendo escassa e diluída entre as diversas espécies do gênero, o que pode comprometer a confiabilidade dos biomarcadores utilizados quando o foco é estudar isoladamente uma determinada espécie.

Ainda, haja vista que os xenobióticos apresentam toxicidade a determinados organismos, contudo, muitas vezes sem apresentar especificidade absoluta ao alvo biológico (Aprea *et al.*, 2002), compreender os mecanismos envolvidos quando se tem o tipo de situação descrita anteriormente se torna uma tarefa extremamente difícil.

Dessa forma, este estudo analisará algumas espécies de *Astyanax*, com o intuito de iniciar uma possível validação do gênero como bioindicador e, se confirmado, introduzirá uma estratégia sem precedentes na literatura, para avaliar e prever efeitos de poluentes a nível genérico, de forma a eliminar grande parte dos problemas amostrais e taxonômicos previamente listados.

2. Revisão bibliográfica

Bioindicadores e o gênero *Astyanax*

Do ponto de vista ecotoxicológico, bioindicadores podem ser organismos, populações ou comunidades empregados como indicadores na avaliação ambiental, uma vez que suas funções vitais se correlacionam estreitamente com fatores bióticos e abióticos da área de estudo (van der Oost, 2003). Portanto, de modo a identificar possíveis problemas sobre o sistema estudado, é importante que os bioindicadores possuam certas características, como limites de tolerância estreitos (seja sensível a pequenas mudanças ambientais), boa abundância no local e pouca mobilidade, fácil identificação e ecologia bem conhecida, uma vez que serão eles os responsáveis em mostrar as condições locais (van der Oost 2003).

Revisões atuais apresentam cerca de 155 espécies válidas de *Astyanax*, muitas das quais foram listadas *incertae sedis* dentro da família characidae (Eschmeyer, 2015; Silva *et al.*, 2015), contudo essa variação pode ser devido a erros amostrais, uma vez que muitas espécies que foram descritas com base em um número muito pequeno de exemplares têm sido colocadas neste gênero (Garavello e Sampaio, 2010).

Constitui um dos gêneros dominantes no continente sul-americano, sendo que as espécies formam uma importante rede de alimentação nos rios da América do Sul, tendo uma participação significativa na nutrição de grandes peixes (Fernandes e Martins-Santos, 2006). São forrageadores de todos os níveis tróficos e possuem

capacidade de mudar facilmente sua presa como resposta a fatores ambientais (Lobon-Cervia e Bennemann, 2000).

A tabela 1 mostra algumas das diversas espécies de *Astyanax* que possuem ocorrência registrada nas bacias dos rios Paraná e Iguaçu, duas bacias de grande importância ecológica e econômica (Sampaio, 1988; Reis *et al.*, 2003; Ingenito *et al.*, 2004).

Tabela 1 – Ocorrência e características de algumas espécies de *Astyanax* nas bacias do rio Paraná e Iguaçu. *Espécies endêmicas da bacia do rio Iguaçu.

Espécie	Comprimento (cm)	Autor
<i>Astyanax altiparanae</i>	10,6	Garutti & Britski, 2000
<i>Astyanax bifasciatus</i> *	12,9	Garavello & Sampaio, 2010
<i>Astyanax dissimilis</i> *	13,6	Garavello & Sampaio, 2010
<i>Astyanax fasciatus</i>	16,8	Cuvier, 1819
<i>Astyanax minor</i> *	10,8	Garavello & Sampaio, 2010
<i>Astyanax serratus</i> *	12	Garavello & Sampaio, 2010

A sistemática desse grupo ainda é confusa e mal entendida. Várias espécies formam diferentes "complexos de espécies", tais como *A. fasciatus*, *A. scabripinnis* e *A. altiparanae*, que foram estabelecidos com base em dados morfológicos e/ou citogenéticos (Silva *et al.*, 2015).

Apesar das dificuldades taxonômicas, esse gênero está entre os mais bem sucedidos em ocupar uma ampla variedade de habitats devido ao seu caráter generalista e oportunista, sendo que diversos estudos têm sido realizados no intuito de identificar quais fatores favorecem a coexistência dessas espécies, *e.g.* adaptações.

Astyanax altiparanae

Também conhecido como lambari-do-rabo-amarelo ou tambiu (Fig. 1), é uma espécie muito comum nos rios e córregos da bacia do alto rio Paraná (PR). Anteriormente era identificado como *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), porém,

após uma revisão mais detalhada, foi descrito como uma nova espécie nomeada de *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000).

A identificação dessa espécie foi feita pela coloração amarelada das nadadeiras, o formato circular do corpo e a presença de duas manchas laterais atrás da mancha principal.



Fig. 1. *Astyanax altiparanae* (Fonte: <http://almadagua.blogspot.com.br>)

Astyanax bifasciatus

Também conhecido como lambari-do-rabo-vermelho (Fig. 2), é uma espécie endêmica na bacia do rio Iguaçu (PR). Até a revisão taxonômica feita por Garavello e Sampaio (2010), era conhecida como *Astyanax sp. b*.

A identificação dessa espécie foi realizada através da observação da coloração vermelha acentuada das nadadeiras, de uma mancha vermelha distinta na porção superior do globo ocular e da presença de duas manchas em forma de bastão na lateral do corpo.



Fig. 2. *Astyanax bifasciatus* (Fonte: cartilha “Lambaris do Rio Iguaçu”)

Astyanax ribeirae

Até 2006 acreditava-se que era uma espécie (Fig. 3) endêmica da bacia do rio Ribeira de Iguape (SP) (Oyakawa et al. 2006), contudo o presente estudo encontrou essa espécie na bacia do rio Iguazu (PR) e do rio Palmital (SC).

A distinção dessa espécie foi realizada observando a grande mancha em formato losangular na região caudal bem como a grande proporção do olho em relação à cabeça como um todo.



Fig. 3. *Astyanax ribeirae* (Fonte: autor)

Contaminantes modelos

Cobre

Os metais pesados são elementos químicos que possuem massa específica maior que 5 g/cm^3 ou número atômico maior do que 20, correspondendo ao grupo de elementos químicos com massa atômica variando de 63,54 a 200,59. Entretanto, o termo “metal pesado” é utilizado para elementos químicos que contaminam o meio ambiente, provocando diferentes danos à biota, podendo ser metais, semimetais ou mesmo não metais como o selênio (Tsutiya, 2000). Em pequenas quantidades alguns desses elementos são essenciais para a manutenção da vida, no entanto se tornam tóxicos quando apresentados em concentrações elevadas (Burgera e Gochfeldb, 2005; Salami *et al.*, 2008). Eles atingem os ambientes aquáticos, principalmente através de efluentes industriais e domésticos, gerando desequilíbrios nos ecossistemas ao se incorporarem às cadeias tróficas (Khansaria *et al.*, 2005; Wanga *et al.*, 2005).

Grande parte desses elementos desempenha sua toxicidade através de processos relacionados ao estresse oxidativo (Valko *et al.*, 2005; Sevcikova *et al.*, 2011; Helsel e Franz, 2015). Esses processos se dão, dentre outras formas, através de espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS são os radicais livres ou moléculas quimicamente reativas contendo oxigênio (O_2). Essas espécies podem ser geradas dentro de um sistema biológico como um subproduto natural do metabolismo de O_2 , ou decorrente de toxicidade exercida por xenobióticos (Kaushik *et al.*, 2015). Em ambientes fisiológicos normais, as células controlam os níveis de ROS, equilibrando a sua produção e eliminação por diversos sistemas, *e.g.* enzimáticos, proteicos, etc. Por outro lado, quando a homeostase celular falha, as células podem passar por uma condição de estresse oxidativo, em que a excessiva quantidade de ROS afeta, especialmente, o funcionamento de macromoléculas celulares, *i.e.* ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos. Essa falha pode causar a desregulação das funções celulares levando a quadros mais graves como cânceres e/ou morte celular (Devasagayam *et al.*, 2004).

O cobre (Cu) é um elemento traço essencial aos organismos, haja vista que está presente em um grande número de enzimas envolvidas numa variedade de processos biológicos, *e.g.* fotossíntese, transporte de elétrons etc. Nos corpos hídricos, o Cu ocorre tipicamente em dois estados oxidativos, Cu(I) e Cu(II), sendo que a mudança entre essas formas desempenha um importante papel na especiação, transporte e biodisponibilidade desse elemento (Boone *et al.*, 2012; Pham *et al.*, 2013). Enquanto que a complexação orgânica do Cu(I) não possui grande relevância, o Cu(II) pode ser amplamente complexado com a matéria orgânica, o que o evita de se tornar imediatamente biodisponível (Moffett e Zika 1983; Coale e Bruland 1990).

Contudo, o excesso desse elemento, especialmente na forma Cu(II), pode ser potencialmente tóxico para os organismos. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma ROS, ubíqua nas células, que reage com o Cu através de uma reação tipo Fenton, gerando radicais hidroxila (OH^\bullet) e/ou outras ROS (Pham *et al.*, 2013). Esses radicais são responsáveis por exercer a função tóxica do excesso de Cu através de quadros de estresse oxidativo. Dos vários radicais livres gerados em organismos vivos, a OH^\bullet é bastante potente e pode danificar as células por meio de oxidação não seletiva de

ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e/ou carboidratos (Sevcikova *et al.*, 2011; Kaushik *et al.*, 2015). Esses danos podem alterar a permeabilidade das membranas, a estrutura da cromatina, a síntese de proteínas e várias outras atividades enzimáticas (Valko *et al.*, 2005; Helsel e Franz 2015).

Malathion

Os compostos organofosforados (OP) são utilizados principalmente na agricultura, como inseticidas. Eles têm substituído os compostos organoclorados devido à sua menor persistência e acumulação no ambiente. A letalidade desses compostos é devido à inibição da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima essencial para a função do sistema nervoso (Kralj *et al.*, 2015), portanto a presença desses compostos no meio ambiente representa uma séria ameaça para a vida selvagem, bem como para a saúde pública (El-Dib *et al.*, 1996; Fhamy 2012).

O malathion (Fig. 4) é um dos inseticidas OP mais utilizados no mundo. Ele é amplamente utilizado na agricultura, em ambientes residenciais e em programas de erradicação de pragas como a malária na África e América Central. A razão para tal uso generalizado reside na sua relativa baixa toxicidade para mamíferos e alta seletividade para insetos, além dele possuir uma moderada persistência no meio ambiente, quando comparado com outros OF (Buratti *et al.*, 2004).

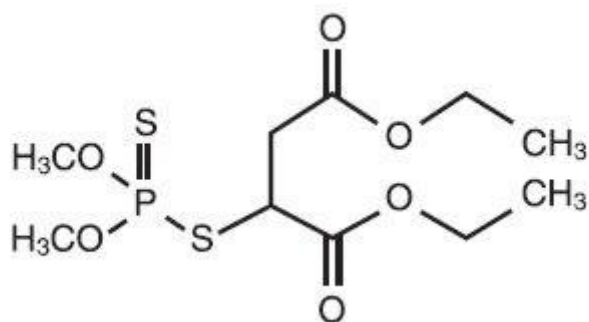


Fig. 4. Estrutura química do malathion

Grande parte da toxicidade do malathion ocorre após a sua bioativação para o metabólito tóxico malaoxon (Fig. 4), o qual inibe a AChE causando a acumulação de acetilcolina nas sinapses e a consequente estimulação excessiva dos receptores pós-

sinápticos (Tsezos e Bell 1991, Bavcon *et al.*, 2003). A sua degradação rápida pelas carboxilesterases compete com a formação do malaoxon pelo citocromo P450 (CYP450). No entanto, as impurezas em formulações comerciais são potentes inibidores das esterases, o que permite um aumento da concentração de malaoxon nos organismos e, conseqüentemente, o aparecimento de patologias relacionadas a esse composto (Gervais *et al.*, 2009).

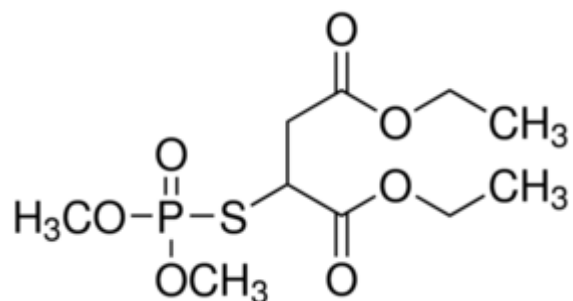


Fig. 5. Estrutura química do malaoxon

Biomarcadores

Compreender o que ocorre no ambiente é fundamental para dar suporte às políticas ambientais. Para isso, é importante que haja um constante monitoramento dos ecossistemas, de modo a gerar dados e informações básicas sobre a presença de contaminantes, associando os fatores bióticos e abióticos e fornecendo respostas mais precisas sobre os ambientes monitorados (van der Oost *et al.*, 2003). Uma forma de integrar ambos os fatores é através dos biomarcadores, que são as respostas biológicas dos organismos, medidas ao nível individual ou subindividual (genética, bioquímica, fisiologia, histologia, morfologia e respostas comportamentais), e que demonstram as alterações da saúde padrão das espécies (Walker *et al.*, 2012).

Biomarcadores genéticos:

Ensaio cometa:

As macromoléculas, *i.e.* lipídios, proteínas, carboidratos e o DNA, podem ser alvos de efeitos tanto diretos como indiretos dos xenobióticos. Danos no DNA, como mutações, quebras de fita, adutos etc, são de grande importância uma vez que, se não

reparados corretamente, podem levar a patologias graves nos sistemas biológicos e nas populações envolvidas. O ensaio cometa, ou SCGE (*single-cell gel eletrophoresis*) é uma técnica bastante útil e sensível para se observar quebras e reparos de DNA (Fairbairn, 1994) em diversos tipos celulares, e.g. eritrócitos (ECA), hepatócitos (HCA) etc. Apesar de as lesões que o ensaio revela não poderem ser relacionadas a uma exposição específica, a relativa simplicidade, velocidade e baixo custo para a aplicação da técnica, fazem com que ela seja bastante utilizada em variados estudos ecotoxicológicos (Cotelle e Férard, 1999; Karlsson, 2010; Koralevic *et al.*, 2016).

Teste do micronúcleo písceo:

Uma vez que os peixes apresentam eritrócitos nucleados, o teste de micronúcleo písceo (MNT) apresenta potencial para detectar a presença de substâncias genotóxicas no meio aquático (Udroiu, 2006). Micronúcleos são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntica em aparência ao núcleo celular. Dentre vários ensaios de genotoxicidade existentes, o teste do micronúcleo tem sido aplicado com sucesso por se tratar de um ensaio simples, seguro e sensível, e por não depender da característica cariotípica do animal em estudo (Al-Sabti e Metcalfe, 1995).

Biomarcadores bioquímicos

Superóxido dismutase:

As ROS podem ser originadas no metabolismo natural dos organismos aeróbios, e.g. produzidas durante a respiração celular. Na cadeia respiratória, a formação dessas moléculas ocorre quando os elétrons passados adiante na cadeia reagem diretamente com uma molécula de O_2 , formando um radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Raamsdonk e Hekimi, 2012). Conseqüentemente, as células desenvolveram defesas antioxidantes, tanto enzimáticas quanto não enzimáticas, que agem no combate a essas ROS. A Superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima (Cu-Zn ou Mg) na primeira linha de defesa antioxidante contra ROS gerados pela respiração, capaz de metabolizar o $O_2^{\cdot-}$.

A SOD atua na conversão do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , o qual, por sua vez, pode ser posteriormente convertido em água (H_2O) e O_2 pela catalase (CAT) ou pela glutathiona peroxidase (GPx) (Sheng *et al.*, 2014). Quadros de estresse oxidativo estão relacionados ao envelhecimento e a diversas patologias, e.g. infertilidade, câncer, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares etc, e, portanto, o fato de que organismos aeróbios e anaeróbios têm alguma forma de atividade captadora de $O_2^{\cdot-}$, indica claramente a importância de se eliminar esse radical (Mruk *et al.*, 2002).

Catalase:

O metabolismo celular é um conjunto de processos normais e essenciais à manutenção da vida de um organismo. Apesar de ordinários, esses processos produzem subprodutos, como o H_2O_2 , que podem gerar desequilíbrios na homeostase celular caso não sejam devidamente remediados (Cutler, 2005). A catalase (CAT) é uma metaloenzima (Fe) de elevado *turnover*, localizada nos peroxissomas celulares, sendo encontrada em quase todos os organismos vivos expostos ao O_2 (Weydert e Cullen, 2009). Ela é responsável por catalisar a decomposição rápida do H_2O_2 em moléculas menos reativas de O_2 e H_2O , evitando, assim, a formação de radicais $OH\cdot$ e, portanto, de patologias associadas a quadros de estresse oxidativo (Nicholls, 2012).

Glutathiona peroxidase:

A glutathiona peroxidase (GPx) é uma metaloenzima (Se) antioxidante responsável por catalisar a redução do H_2O_2 em H_2O através da utilização da glutathiona reduzida (GSH) como um cossubstrato obrigatório nesta reação (Lubos *et al.*, 2011). O mecanismo catalítico da GPx envolve a redução de uma molécula de H_2O_2 através da oxidação de duas moléculas de GSH, gerando no final uma molécula de glutathiona oxidada (GSSG) e duas moléculas de H_2O (Bhabak e Mugesh, 2015).

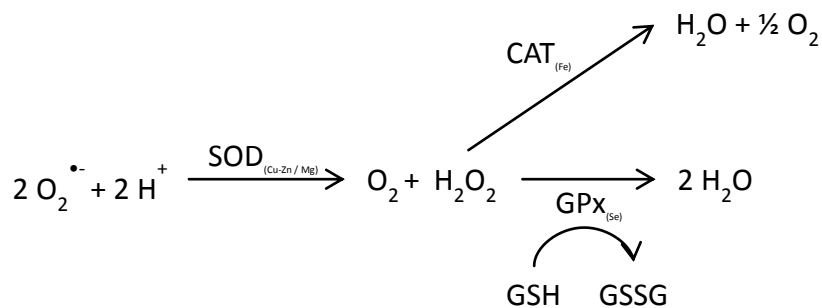


Fig. 6. Sistema enzimático antioxidante. A SOD converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio. A CAT e a GPx converte o peróxido de hidrogênio em água. Dessa forma, duas espécies reativas são convertidas em produtos atóxicos (Li *et al.*, 2000, modificado pelo autor).

Peroxidação lipídica:

Os lípidos são macromoléculas essenciais das membranas celulares que controlam e mantêm a estrutura e a função das células. Eles são um dos principais alvos dos ataques por ROS, sendo que a oxidação de lipídios é associada a várias patologias, de tal forma que a natureza complexa desse processo e seu significado biológico têm atraído cientistas de muitos campos disciplinares (Yin *et al.*, 2011). A peroxidação lipídica (LPO) é um processo que ocorre através de uma reação em cadeia, *i.e.* auto-oxidação, composta por três etapas, (1) iniciação, (2) propagação, e (3) terminação. O processo de iniciação ocorre com a formação de um radical lipídico (L•) devido à ação de um radical livre sobre o hidrogênio (H+) presente no lipídio de membrana (LH). Este L•, por sua vez, é peroxidado na etapa de propagação, o que gera um radical peroxil (LOO•), o qual é responsável pela reação em cadeia do processo, haja vista que ele pode funcionar como radical livre da etapa de iniciação, atuando sobre o H+ de outro LH, transformando-se em um hidroperóxido lipídico (LOOH). Por fim, o processo de terminação se dá com a fixação dos peróxidos lipídicos na estrutura membranosa através da interreação do LOO• (Yin *et al.*, 2011). Em consequência da LPO, pode haver perda de integridade da membrana com aumento de sua permeabilidade, gerando alteração no fluxo de íons transmembrana, disfunção no transporte de Na+/K+, influxo excessivo de cálcio e ativação de enzimas como proteases, fosfolipases e nucleases (Barrera, 2012).

Anidrase carbônica:

A anidrase carbônica (CA) é uma metaloenzima (Zn) responsável pela regulação do equilíbrio ácido-base celular através da hidratação reversível do dióxido de carbono (CO₂) em bicarbonato (HCO₃⁻) e prótons H⁺ (Supuran, 2010). Como o CO₂, o HCO₃⁻ e o H⁺ são íons essenciais em muitos processos fisiológicos, pode-se dizer que a CA é uma enzima ubíqua, encontrada em diferentes compartimentos celulares e teciduais dos organismos (Lionetto *et al.*, 2012). Nos peixes, a regulação ácido-base é também acoplada à regulação iônica, uma vez que a compensação do pH conta com a transferência direta de H⁺ e HCO₃⁻ pelas brânquias em troca de Na⁺ e Cl⁻. A regulação das trocas de NaCl pelas brânquias é, portanto, fundamental para a manutenção do equilíbrio iônico e osmótico desses organismos, sendo a CA um importante participante em todos esses três processos (Gilmour e Perry, 2009).

Etoxiresorufina-O-deetilase:

Ao entrar no organismo, os xenobióticos se ligam a receptores celulares específicos localizados nas membranas ou no interior das células. A ligação desses compostos com os seus receptores pode induzir processos celulares que desencadeiam efeitos adversos ao funcionamento dos órgãos, dos organismos ou mesmo de toda uma população envolvida (Siroká e Drastichová, 2004). De modo a mitigar estes efeitos, os organismos vivos, por meio de sistemas enzimáticos especializados, convertem os xenobióticos em compostos hidrofílicos que sejam facilmente excretados. Esse processo de conversão é também conhecido como biotransformação. A primeira fase da biotransformação envolve reações que dão origem a compostos mais polares. Isso pode resultar na redução da eficácia do xenobiótico, *i.e.* bioeliminação, ou produzir um metabólito ativo, *i.e.* bioativação. As reações da primeira fase incluem oxidação, redução e/ou hidrólise feitas por enzimas oxidativas, como as da família do citocromo P450 ou CYP450 (Whyte *et al.*, 2000). A exposição a determinados contaminantes leva à estimulação da transcrição do gene CYP1A, uma subfamília de enzimas do CYP450, resultando no aumento do nível de mRNA e podendo aumentar a respectiva atividade catalítica. A medida da atividade enzimática da CYP1A, baseada na atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) é

um método bastante utilizado para avaliar o metabolismo de fase I (van der Oost *et al.*, 2003).

Glutathione S-transferase:

No metabolismo de fase II, os xenobióticos ativados são conjugados com moléculas polares endógenas, tais como o sulfato, a glicina, o ácido glicurônico ou a GSH (Landi, 2000). Os produtos dessas reações de conjugação possuem um maior peso molecular e tendem a ser menos ativos do que os seus substratos originais, ao contrário das reações de fase I, que muitas vezes produzem metabólitos ativos. A adição de grandes grupos aniônicos, como a GSH, produz metabólitos mais polares que não conseguem difundir através de membranas e, por conseguinte, devem ser transportados ativamente (Srikanth *et al.*, 2013). Essas reações são catalisadas por um grande grupo de transferases de ampla especificidade, que podem metabolizar quase qualquer composto hidrofóbico contendo grupos nucleofílicos ou eletrofílicos. Uma das classes mais importantes desse grupo é o da glutathione S-transferases (GST) (Yamuna *et al.*, 2012). Essas enzimas catalisam a conjugação da GSH com uma variedade de compostos presente no citosol dos organismos e são bastante eficientes na biotransformação de metais tóxicos e poluentes orgânicos (Jasinska *et al.*, 2015).

Acetilcolinesterase:

O funcionamento correto do sistema nervoso é imprescindível para a manutenção da vida dos organismos dependentes desse sistema. A transmissão dos impulsos nervosos ocorre quando o neurônio pré-sináptico libera um neurotransmissor, e.g. acetilcolina, na fenda sináptica. Esse neurotransmissor, por sua vez, liga-se aos receptores colinérgicos do neurônio pós-sináptico, desencadeando a continuidade da transmissão do impulso nervoso (Payne, 1996). A acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima presente nas fendas sinápticas que mantém o correto funcionamento dos sistemas neuromusculares e sensoriais dos seres vivos. A AChE é responsável pela hidrólise e inativação da acetilcolina em colina e acetato, reação que permite o retorno do neurônio colinérgico ao estado de repouso após a ativação, impedindo disparos contínuos dos nervos que resultariam numa superestimulação do

tecido e, como consequência, paralisia (Periasamy *et al.*, 2009). A inibição e perda gradual dessa enzima estão vinculadas a diversos quadros patológicos relacionados à deterioração progressiva das capacidades cognitivas, autonômicas e das funções neuromusculares, como a doença de Alzheimer e a atrofia de múltiplos órgãos.

Biomarcador morfológico

Histopatologia:

A exposição dos organismos à água contaminada pode afetar diferentes funções vitais que vão desde alterações genéticas nas células individuais a mudanças em populações inteiras. Dessa forma, a histopatologia vem a ser um biomarcador bastante vantajoso de ser analisado. Uma vez que as alterações histopatológicas respondem a baixas concentrações de contaminantes, essa análise permite a identificação de efeitos subletais, agudos e crônicos, dos contaminantes de modo relativamente rápido e com baixo custo (Bernet *et al.*, 1999). A escolha dos órgãos a serem avaliados é dependente do contaminante e do tipo de exposição. Assim sendo, considerando que as formas mais convencionais de exposição no ambiente aquático são a hídrica e a trófica, e tendo em vista a diversa gama de compostos que atingem esses ambientes, as brânquias, o fígado e o rim são bastante utilizados devido às suas funções biológicas.

Referências

Al-Sabti, K.; Metcalfe, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res*, 343:121-135, 1995.

Aprea, C.; Colosio, C.; Mammone, T.; Minoia, C.; Maroni, M. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *J Chromatogr*, 769:191-219, 2002.

Baird, S. F.; Girard, C. F. Descriptions of new species of fishes collected in Texas, New Mexico and Sonora, by Mr. John H. Clark, on the U. S. and Mexican Boundary Survey,

and in Texas by Capt. Stewart Van Vliet, U.S.A. *Proc. Acad. Nat. Sei. Philadelphia*, 7:24–29, 1854.

Baksi, S. M.; Frazier, J. M. Isolated fish hepatocytes – model systems for toxicology research: review. *Aquat Toxicol*, 16:229-256, 1990.

Barrera, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol*, 2012:137289, 2012.

Bavcon, M.; Trebse, P.; Zupancic-Kralj, L. Investigations of the determination and transformations of diazinon and malathion under environmental conditions using gas chromatography coupled with a flame ionisation detector. *Chemosphere*, 50:595–601, 2003.

Bernet, D.; Schmidt, H.; Meier, W.; Burkhardt-Holm, P.; Wahli, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis*, 22:25-34, 1999.

Bhabak, K. P.; Mugesh, G. Functional mimics of Glutathione Peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. *Accounts Chem Res*, 43(11):1408-1419, 2010.

Boone, C.; Gervais, J. A.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. 2012. Copper Sulfate Technical Fact Sheet; *National Pesticide Information Center*, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/cuso4tech.pdf>

Buratti, F. M.; D'Aniello, A.; Volpe, M. T.; Meneguz, A.; Testai, E. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab Dispos*, 33:295–302, 2005.

Burgera, J.; Gochfeld, M. Heavy metals in commercial fish in New Jersey. *Environ Res*, 99(3):403-412, 2005.

Coale, K. H.; Bruland, K. W. Spatial and temporal variability in copper complexation in the North Pacific. *Deep-Sea Res*, 37:317-336, 1990.

Costa-Silva, D. G.; Nunes, M. E. M.; Wallau, G. L.; Martins, I. K.; Zemolin, A. P. P.; Cruz, L. C.; Rodrigues, N. R.; Lopes, A. R.; Posser, T.; Franco, J. L. Oxidative stress markers in fish (*Astyanax sp.* and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the Brazilian Pampa biome. *Environ Sci Pollut Res*, 22(20):15526-15535, 2015.

Cotelle, S.; Férard, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ Mol Mutagen*, 34:246-255, 1999.

Cutler, R. G. Oxidative stress and aging: catalase is a longevity determinant enzyme. *Rejuven Res*, 8(3):138-140, 2005.

Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C.; Bloor, K. K.; Sane, K. S.; Ghaskadbi, S. S.; Lele, R. D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*, 52:794-804, 2004.

El-Dib, M. A.; El-Elaimy, A.; Kotb, A.; Elowa, S. H. Activation of *in vivo* metabolism of malathion in male *Tilapia nilotica*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 57:667-674, 1996.

Eschmeyer, W. N. Catalog of Fishes. California Academy of Sciences. Electronic version, accessed October 21, 2015. <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog>

Fahmy, G. H. Malathion toxicity: effect on some metabolic activities in *Oreochromis niloticus*, the Tilapia Fish. *Int J of Biosci Biochem Bioinforma*, 2(1):52-55, 2012.

Fairbairn, D. W.; Olive, P. L.; O'Neill, K. L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, 339:37-59, 1995.

Fernandes, C. A.; Martins-Santos, I. C. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (*Teleostei, Characidae*) from the upper Paraná river basin, Brazil. *Genet Mol Biol*, 29(3):464–468, 2006.

Freire, C. A.; Souza-Bastos, L. R.; Chiesse, J.; Tincani, F. H.; Piancini, L. D. S.; Randi, M. A. F.; Prodocimo, V.; Cestari, M. M.; Silva de Assis, H. C.; Abilhoa, V.; Vitule, J. R. S.; Bastos, L. P.; Oliveira Ribeiro, C. A. A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. *Environ Sci Pollut Res*, 22(17):13263-13277, 2015.

Garavello, J. C.; Sampaio, F. A. A. Five new species of genus *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) from Rio Iguaçú, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Braz J Biol*, 70(3):847-865, 2010.

Garutti, V.; Britski, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (*Teleostei: Characidae*) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Ser Zool*, 13:65-88, 2000.

Gervais, J. A.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. 2009. Malathion Technical Fact Sheet; *National Pesticide Information Center*, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/malatech.pdf>

Gilmour, K. M.; Perry, S. F. Carbonic Anhydrase and acid–base regulation in fish. *J Exp Biol*, 212:1647-1661, 2009.

Gurgel, H. C. B. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. *Rev Bras Zoo*, 21(1):131-135, 2004.

Helsel, M. E.; Franz, K. J. Pharmacological activity of metal binding agents that alter copper bioavailability. *Dalton T*, 44:8760-8770, 2015.

Ingênito, L. F. S.; Duboc, L. F.; Abilhoa, V. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna do Alto Iguaçu, Paraná, Brasil. *Arq Ciênc Vet Zool Unipar*. 7(1):23-36, 2004.

Jasinska, E. J.; Goss, G. G.; Gillis, P. L.; Van Der Kraak, G. J.; Matsumoto, J.; Machado, A. A. S.; Giacomini, M.; Moone, T. W.; Massarsky, A.; Gagné, F.; Servos, M. R.; Wilson, J.; Sultana, T.; Metcalfe, C. D. Assessment of biomarkers for contaminants of emerging concern on aquatic organisms downstream of a municipal wastewater discharge. *Sci Total Environ*, 530:140–153, 2015.

Karlsson, H. L. The comet assay in nanotoxicology research. *Anal Bioanal Chem*, 398:651–666, 2010.

Kaushik, N.; Uddin, N.; Sim, G. B.; Hong, Y. J.; Baik, K. Y.; Kim, C. H.; Lee, S. J.; Kaushik, N. K.; Choi, E. H. Responses of solid tumor cells in DMEM to reactive oxygen species generated by non-thermal plasma and chemically induced ROS systems. *Sci Rep*, 5:8587, 2015.

Khansaria, F. E.; Ghazi-Khansaria, M.; Abdollahic, M. Heavy metals content of canned tuna fish. *Food Chem*, 93(2):293-296, 2005.

Kolarevic, S.; Kracun-Kolarevic, M.; Kostic, J.; Slobodnik, J.; Liska, I.; Gacic, Z.; Paunovic, M.; Knezevic-Vukcevic, J.; Vukovic-Gacic, B. Assessment of the genotoxic potential along the Danube River by application of the comet assay on haemocytes of freshwater mussels: The Joint Danube Survey 3. *Sci Total Environ*, 540(1):377-85, 2016.

Kralj, M. B.; Cernigoj, U.; Franko, M.; Trebse, P. Comparison of photocatalysis and photolysis of malathion, isomalathion, malaoxon, and commercial malathion-products and toxicity studies. *Water Res*, 41(19):4504-14, 2015.

Landi, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res*, 463:247–283, 2000.

Li, S.; Yan, T.; Yang, J.; Oberley, T. D.; Oberley, L. W. The role of cellular Glutathione Peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese Superoxide Dismutase. *Cancer Res*, 60:3927–3939, 2000.

Lionetto, M. G.; Caricato, R.; Giordano, M. E.; Erroi, E.; Schettino, T. Carbonic Anhydrase as pollution biomarker: an ancient enzyme with a new use. *Int J Environ Res Public Health*, 9:3965-3977, 2012.

Lobon-Cervia, J.; Bennemann, S. T. Temporal trophic shifts and feeding diversity in two sympatric, neotropical, omnivorous fishes: *Astyanax bimaculatus* and *Pimelodus maculatus*. *Archiv fur Hydrobiologie*, 148(2):285-306, 2000.

Lubos, E.; Loscalzo, J.; Handy, D. E. Glutathione Peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Sign*, 15(7):1957-1997, 2011.

Moffett, J. W.; Zika, R. G. Oxidation kinetics of Cu(I) in seawater: implications for its existence in the marine environment. *Mar Chem*, 13:239-251, 1983.

Mruk, D. D.; Silvestrini, B.; Moa, M.; Cheng, C. Y. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65:305–311, 2002.

Nicholls, P. Classical Catalase: ancient and modern. *Arch Biochem Biophys*, 525:95–101, 2012.

Oyakawa, O. T.; Akama, A.; Mautari, K. C.; Nolasco, J. C. Peixes de riachos da Mata Atlântica. *Neotropica*, São Paulo-SP, 2006.

Payne, J. F.; Mathieu, A.; Melvin, W.; Fancey, L. L. Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar Pollut Bull*, 32:225-23, 1996.

Periasamy, A. P.; Umasankar, Y.; Chen, S. Nanomaterials - Acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical sensors: a review. *Sensors*, 9:4034-4055, 2009.

Pham, A. N.; Xing, G.; Miller, C. J.; Waite, T. D. Fenton-like copper redox chemistry revisited: hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *J Catal*, 301:54–64, 2013.

Raamsdonk, J. M. V.; Hekimi, S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proc Natl Acad Sci*, 109(15):5785-5790, 2012.

Ramsdorf, W. A.; Vicari, T.; Almeida, M. I. M; Artoni, R. F.; Cestari, M. M. Handling of *Astyanax sp.* for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. *Environ Monit Assess*, 184(10):5841-5849, 2011.

Reis, R. O.; Kullander, S. O.; Ferraris Jr, C. J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: *EDIPUCRS*, 2003.

Salami, I. R. S.; Rahmawati, S.; Sutarto, R. I. H.; Jaya, P. M. Accumulation of heavy metals in freshwater fish in cage aquaculture at Cirata Reservoir, West Java, Indonesia. *Anna NY Acad Sci*, 1140(1):290-296, 2008.

Sampaio, F. A. A. Estudos taxonômicos preliminares dos Characiformes (Teleostei, Ostariophysii) da bacia do rio Iguaçu, com comentários sobre o endemismo dessa fauna. *Dissertação de mestrado em zoologia*. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 1988.

Sevcikova, M.; Modra, H.; Slaninova, A.; Svobodova, Z. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Vet Med-Czech*, 56(11):537–546, 2011.

Sheng, Y.; Abreu, I. A.; Cabelli, D. E.; Maroney, M. J.; Miller, A.; Teixeira, M.; Valentine, J. S. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem Rev*, 114:3854–3918, 2014.

Silva, D.M.Z.A.; Utsunomia, R.; Pansonato-Alves, J.C.; Foresti, C.O.F. Chromosomal mapping of repetitive DNA sequences in five species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) reveals independent location of U1 and U2 snRNA sites and association of U1 snRNA and 5S rDNA. *Cytogenet Genome Res*, 146(2):144-152, 2015.

Siroká, Z.; Drastichová, J. Biochemical markers of aquatic environment contamination - cytochrome P450 in fish. A review. *Acta Vet Brno*, 73:123-132, 2004.

Srikanth, K.; Pereira, E.; Duarte, A. C.; Ahmad, I. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish-a review. *Environ Sci Pollut Res*, 20:2133–2149, 2013.

Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 20:3467–3474, 2010.

Tsezos, M.; Bell, J. P. A mechanistic study on the fate of malathion following interaction with microbial biomass. *Water Res*, 25(9):1039-1046, 1991.

Tsutiya, M. T. Metais pesados: o principal fator limitante para o uso agrícola de biossólidos das estações de tratamento de esgoto. In: 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1999, Rio de Janeiro. *Anais do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Rio de Janeiro: ABES, 1999.

Udroiu, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes, *Aquat Toxicol*, 79:201-204, 2006.

Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D. Metals, Toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 12:1161-1208, 2005.

van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*, 13:57-149, 2003.

Walker, C. H.; Sibly, R. M.; Hopkin, S. P.; Peakall, D. B. *Principles of Ecotoxicology, Fourth Edition* - CRC Press. 2012.

Wanga, X.; Satoa, T.; Xing, B.; Taob, S. Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish. *Sci Total Environ*, 350:(1):28-37, 2005.

Weydert, C. J.; Cullen, J. J. Measurement of Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*, 5(1):51-66, 2009.

Whyte, J. J.; Jung, R. E.; Schmitt, C. J.; Tillitt, D. E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crc Cr Rev Toxicol*, 30(4):347-570, 2000.

Yamuna, A.; Bhavan, P. S.; Geraldine, P. Glutathione Stransferase and Metallothionein levels in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to mercury. *J Environ Biol*, 33:133-137, 2012.

Yin, H.; Xu, L.; Porter, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*, 111:5944-5972, 2011.

Zamoner, M. *Biologia Ambiental. 1. ed.* Curitiba: Protexto, 2007.

Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar se o gênero *Astyanax* pode ser utilizado como gênero bioindicador de testes ecotoxicológicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar o tipo de desenho experimental adequado para utilizar os peixes do gênero *Astyanax* em bioensaios;
- Induzir as respostas dos sistemas antioxidantes das espécies estudadas através da exposição ao Cu e verificar as relações interespecíficas dos biomarcadores;
- Induzir as respostas das espécies estudadas frente a parâmetros relacionados à biotransformação de xenobióticos através da exposição ao malathion e verificar as relações interespecíficas dos biomarcadores;
- Avaliar se os padrões de respostas observados *in vivo* são também encontrados *in situ* e;
- Oferecer uma sistemática de abordagem para estudos que visem analisar outras espécies de *Astyanax* de modo a entender como o gênero se comporta frente à contaminação ambiental.

Capítulo 1

Pseudorrepliação e o uso de biomarcadores em bioensaios ecotoxicológicos com peixes

Pseudoreplication and the usage of biomarkers in ecotoxicological bioassays with fish

Tincani, F. H.¹; Galvan, G. L.¹; Marques, A. E. M. L.²; Santos, G. S.¹; Pereira, L. S.³; Silva, T. A.⁴; Silva de Assis, H. C.^{1,3}; Barbosa, R. V.⁴; Cestari, M. M.^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação - UFPR

² Departamento de Genética - UFPR

³ Departamento de Farmacologia - UFPR

⁴ Departamento de Química - UFPR

Abstract

Pseudoreplication is a widely discussed topic in the scientific community. Its principal critique concerns the lack of independence in flawed experimental designs and the use of inferential statistics to test the hypothesis of such experiments. Thirty years after its appearance, it remains misunderstood by many researchers, including ecotoxicologists. In this work, we will try to clarify some of its concepts by filling in what seems to be a gap in the terminology of manipulative experiments. We propose the term *experimental medium* to refer strictly to the relevant spatial scale of the experiment, in order to preserve the specificity of the experimental and observational units, and to display pseudoreplication as a kind of misinterpretation and/or misanalysis of inferential statistics. A classification of the types of experimental designs in ecotoxicology is offered and the problems in using inferential statistics in suboptimal designs are discussed. With this work, we hope to shed some light on such a classic topic for ecotoxicologists.

Keywords: Pseudoreplication, Biomarker, Ecotoxicology, Bioassay, Experimental Unit, Statistical Independence.

Introdução

A publicação do livro Primavera Silenciosa, de Rachel Carson, na década de 1960, foi um dos passos mais significativos rumo à unificação de dois ramos distintos da ciência, a Ecologia e a Toxicologia, em uma nova área chamada Ecotoxicologia. Embora as preocupações sobre a contaminação do ambiente sejam conhecidas e estejam presentes desde os primórdios das sociedades antigas (Spengler e Sexton 1983; Sungmin *et al* 1996), a definição da Ecotoxicologia como um ramo formal e independente da ciência pode ser atribuída ao professor Truhaut, que a definiu em 1969 como "o ramo da Toxicologia preocupado com o estudo de efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos para os componentes dos ecossistemas, animal (incluindo humanos), vegetal e microbiano" (Truhaut 1977). Desde então, ramificações e novos campos surgiram da própria Ecotoxicologia, embora o seu significado e as atribuições permaneçam semelhantes à primeira definição. Hoje em dia, podemos defini-la como "o estudo dos efeitos nocivos dos produtos químicos sobre os ecossistemas, o que inclui efeitos sobre os indivíduos e os consequentes efeitos nos níveis de população e além" (Walker *et al.* 2012). A fim de entender esses efeitos, três tipos principais de experimentos são conduzidos em estudos ecotoxicológicos, os estudos *in vitro*, *in vivo* e/ou *in situ*.

Os estudos *in vivo* geralmente são conduzidos na forma de bioensaios, em que os organismos testes, *i.e* os bioindicadores, são submetidos a contaminantes em condições experimentais rigorosas para que o pesquisador compreenda e avalie os seus efeitos. Esses efeitos podem ser observados por meio de biomarcadores, que são as respostas biológicas dos organismos, medidas ao nível individual ou subindividual (genética, bioquímica, fisiologia, histologia, morfologia e respostas comportamentais), e que demonstram os desvios da saúde padrão das espécies (Walker *et al.*,2012.).

Além da preocupação em determinar se o efeito de um xenobiótico está presente ou não, a ecotoxicologia busca entender também como esse xenobiótico afeta a saúde dos seres vivos. Portanto, é papel do ecotoxicólogo detectar a fonte de estresse através da identificação dos sintomas e dos seus mecanismos, oferecendo, sempre que possível, o tratamento para o possível agente estressor. Portanto, para

entender como altos níveis de organização biológica são afetados por desequilíbrios do ambiente, os experimentos ecotoxicológicos são submetidos à estatística inferencial, a fim de observar processos e tirar conclusões a partir dos dados analisados.

Um experimento é um procedimento ordenado, composto por cinco fases principais (hipóteses, desenho experimental, execução experimental, análise estatística e interpretação), e é realizado com o objetivo de verificar, refutar, ou estabelecer a validade de uma hipótese. Cada parte de um experimento tem sua importância e precauções adequadas devem ser tomadas em cada uma delas. Em particular, o desenho e execução experimental são de importância fundamental, uma vez que um estudo bem concebido e desenvolvido vai levar a conclusões concisas e robustas. Em contrapartida, projetos falhos podem gerar erros graves que, se colocados em execução, podem distorcer conclusões, caso no qual a reestruturação e repetição do experimento é a única alternativa (Hurlbert 1984).

Um erro recorrente nessa fase é a pseudorreplicação, introduzida e definida por Hurlbert em 1984 como "o uso de estatística inferencial para testar os efeitos de tratamentos com dados de experimentos em que os tratamentos não são replicados (embora as amostras possam ser) ou em que as réplicas não são estatisticamente independentes". Em ecotoxicologia, a pseudorreplicação ocorre especialmente como resultado da incompreensão do que é uma unidade experimental e/ou pela falta de independência entre essas unidades.

Desde que o conceito surgiu, a pseudorreplicação tem sido alvo de acaloradas discussões, tanto a favor (Underwood 1994; Hurlbert 2004; Heffner et al 2006;. Lazic 2010; Krull et al 2013.) quanto contra (Hawkins 1986; Oksanen 2001; Oksanen 2004; Tatarnikov 2005; Schank e Koehler 2009).

Conceituação

Qual é a entidade de análise, *i.e.* a unidade experimental, e como ela deve ser replicada? Compreender e encontrar uma resposta correta a essa pergunta é de fundamental importância para o ecotoxicólogo atingir com precisão suas metas. Infelizmente, a incapacidade de resolver essa questão é também a maior fonte de

confusão em relação à pseudorreplicação e projetos falhos em nosso campo da ciência.

Primeiro, para entender melhor a questão, é importante notar que pseudorreplicação não descreve um determinado tipo de delineamento experimental, mas sim uma categoria específica de más interpretações e/ou más análises (Hargrove e Pickering 1992) derivadas de projetos falhos. Em segundo lugar, a característica comum em qualquer tipo de estudo pseudorreplicado é a falta de independência entre os dados (Millar e Anderson, 2004), presentes em qualquer uma das escalas experimentais relevantes. Portanto, para o propósito dessa discussão e para ilustrar os novos pensamentos proposto à referida questão, vamos considerar que nossas entidades sob análise sejam peixes em aquário(s) submetidos a um ensaio ecotoxicológico, porém, *a priori*, poderia ser qualquer outra coisa, tais como bactérias em uma placa de petri, macroinvertebrados em um béquer, árvores em uma parcela de campo, peixes em um rio, etc.

Com isso em mente, nós encontramos duas vertentes muito claras de pensamento. A primeira consiste no fato de que os pesquisadores consideram o peixe como a unidade experimental e, portanto, colocá-los todos juntos em um único aquário é suficiente para observar um efeito de tratamento, uma vez que eles respondem independentemente aos fatores ambientais (Tatarnikov 2005; Schank e Koehnle 2009), e a segunda, é que os cientistas veem o aquário como a unidade experimental, porque o meio onde os peixes estão inseridos determina o seu fator de independência (Heffner *et al* 2006;. Kozlov e Hurlbert 2006;. Nikinmaa *et al* 2012).

É claro que, em ambos os casos, o debate sobre o que a unidade experimental é, o peixe ou o aquário, está intimamente ligada ao princípio da independência. A este respeito, nenhum ponto de vista é completamente certo ou errado. Realmente, visto que a resposta de cada peixe a um agente estressor ocorre independentemente da resposta de outro peixe, esse fato pode ser suficiente para tratar os peixes como a unidade experimental. Por outro lado, ao considerarmos o tratamento de vários peixes no mesmo aquário como amostras independentes da população, podemos inserir uma variável inadequada ao uso de estatística inferencial para observar e comprovar um

suposto efeito de tratamento e, portanto, devemos tratar o aquário como a unidade experimental a ser replicada.

A unidade de replicação em experimentos manipulativos, de acordo com Heffner *et al.* (2006), é "a menor unidade experimental para um tratamento que é aplicado de forma independente". No entanto, em ecotoxicologia, um tratamento pode ser aplicado independentemente de várias maneiras de acordo com o tipo de exposição. Um tratamento aplicado através da exposição hídrica pode ter o aquário como unidade experimental, enquanto um tratamento aplicado via injeção intraperitoneal teria o peixe como unidade experimental. Nesse sentido, interpretações dúbias sobre o que é uma unidade experimental podem surgir, deslocando o conceito de uma entidade a outra de acordo com a necessidade do pesquisador.

Enfim, o que é de fato uma unidade experimental? Em ecotoxicologia, a maior parte da imprecisão quanto ao uso do termo parece ocorrer devido ao que parece ser uma lacuna na terminologia dos experimentos manipulativos. Como consequência dessa lacuna, definição de conceitos que deveriam ser concisos, como unidade experimental e unidade observacional (Kozlov e Hurlbert 2006), tornam-se simples expressões semanticamente maleáveis que se adequam ao interesse do pesquisador. Por conseguinte, um novo termo relativo estritamente à escala espacial do experimento parece pertinente para evitar deficiências na utilização de tais conceitos preexistentes, para tanto, propomos o termo *meio experimental*, como definido a seguir:

Meio experimental: o ambiente físico, e.g. o aquário, o béquer, a parcela de campo etc, no qual as unidades experimentais, i.e. amostras da população estatística de interesse, são inseridas e onde permanecem até ao fim do experimento, tanto como um grupo tratamento quanto um grupo controle. O meio desempenha um papel crucial na premissa de independência das unidades experimentais e deve ser, sempre que possível, replicado junto com elas.

Com esse novo termo em mente, devemos ser capazes de preencher a lacuna anteriormente citada, estabelecendo o meio experimental como a escala espacial relevante do experimento, e.g. o aquário, a unidade experimental como a população estatística sob investigação, e.g. o peixe, e a unidade observacional como os dados

amostrados da unidade experimental, e.g. os biomarcadores, mantendo o fator de independência constante ao longo do experimento.

Segundo Hurlbert (1984), e tendo em vista os procedimentos necessários para se projetar um experimento manipulativo, gostaríamos de propor, baseado no termo *meio experimental*, uma classificação dos tipos possíveis de experimentos em ecotoxicologia, com base nas premissas da replicação e independência de unidades experimentais. Nota-se que, apesar de não serem mencionadas, a aleatorização e a dispersão de meios e unidades experimentais devem ser respeitadas em qualquer tipo de desenho experimental.

O primeiro tipo é referido como *não replicado* (ou dependente). Ao conduzir um experimento não replicado, o pesquisador não está replicando o meio nem as unidades experimentais, cometendo, assim, pseudorreplicação caso as unidades observacionais sejam tratadas como réplicas verdadeiras. Em termos de desenhos experimentais, essa é a maior falha existente que deve e pode ser facilmente evitada.

Em segundo lugar, há o tipo replicado e dependente ou, como propomos, *sub-replicado* (UR). Esse é um tipo comum de projeto em bioensaios ecotoxicológicos e, por vezes, uma condição *sine qua non* para a ecologia regional, como indicado por muitos autores (Hawkins 1986; Hargrove e Pickering, 1992; Oksanen 2001; Oksanen 2004;. Bastos *et al.*, 2013). Ao realizar um experimento sub-replicado, o pesquisador está replicando a entidade biológica diretamente afetada pelo tratamento, *i.e.* a unidade experimental, mas não o meio. Ao fazer isso, o cientista pode violar a premissa da independência necessária para a confiabilidade inferencial devido à partilha do meio por essas unidades.

Isso significa que, quando se utiliza a estatística inferencial para testar um efeito de tratamento, pode-se cometer pseudorreplicação se, por exemplo, um efeito espúrio comprometer o experimento, caso em que, possivelmente, levará a conclusões erradas sobre a hipótese a ser testada (erros tipo I ou II). Em outras palavras, experimentos subreplicados são experimentos que devem ser feitos com grande cautela. Embora eles possam proporcionar informações úteis sobre um dado efeito, esses designs são muito sensíveis a interferências que poderiam mascarar o resultado. Isto não significa, no entanto, que os resultados obtidos a partir de estudos subreplicados estejam

errados ou não devam ser utilizados, mas que eles são mais propensos a incorporar efeitos espúrios em vez de mostrar os verdadeiros efeitos do tratamento.

Uma série de remediações pode ser sugerida para esse tipo de delineamento experimental, incluindo a simples replicação, a replicação dos grupos controle, entre outras (Underwood 1994; Cottenie e De Meester 2003; Millar e Anderson 2004; Kozlov 2007; Bastos et al 2013).

O terceiro e último tipo é o tipo replicado e independente, ou simplesmente *replicado* (R). A realização de um experimento replicado ocorre ao se replicar tanto os meios quanto as unidades experimentais, sendo assim coerente com a premissa da independência para experimentos manipulativos. Ao aplicar estatística inferencial, o pesquisador dificilmente cometeria qualquer forma de pseudorreplicação e, portanto, seria capaz de testar a hipótese com precisão.

Dessa forma, o presente estudo buscou identificar os principais tipos de desenhos experimentais em bioensaios ecotoxicológicos e oferecer uma nova terminologia para esses experimentos, com o intuito de ajudar na compreensão da questão e no uso de estatística inferencial no que tange à análise de dados de biomarcadores obtidos destes experimentos.

Material e Métodos

Duas espécies de peixes (*Astyanax bifasciatus* e *Danio rerio*) foram submetidas a diferentes bioensaios de exposição hídrica ao malathion de modo a observar as respostas frente ao contaminante em situações distintas de bioensaios (concentração e tempo de exposição, tipo de água para o bioensaio e verificação analítica do contaminante no aquário x concentração nominal).

Desenho experimental – Astyanax bifasciatus

O malathion (CAS nº 121-75-5) comercial foi comprado em uma floricultura de Curitiba-PR (Malatol 500CE líquido – 10ml, 5% malathion) e diluído em água destilada a uma concentração de 1 g L⁻¹. A partir dessa solução mãe, foi feita uma diluição na concentração de 250 µg L⁻¹, baseando-se em estudo prévios (Gervais *et al.*, 2009).

A. bifasciatus adquiridos do Pesqueiro Água da Serra (Quatro Barras-PR) foram aclimatados por 30 dias no Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental (CAMA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em tanques de 2000 L com água filtrada, aeração constante, temperatura média de 22°C e alimentados diariamente com ração comercial. Para a etapa de exposição, o experimento foi dividido em dois modelos diferentes de desenho experimental, sub-replicado (UR) e replicado (R). Para cada desenho foi feito um controle (C) e um tratamento (T), cada qual com 10 peixes distribuídos aleatoriamente em cada aquário.

Os grupos sub-replicado controle (URC) e sub-replicado tratamento (URT) foram conduzidos em dois aquários de 80L com dez peixes em cada um. Os grupos replicados controle (RC) e replicados tratamento (RT) foram conduzidos em vinte aquários de 8L com um peixe em cada um. Todos os aquários foram dispersos e aleatorizados na sala de bioensaios do laboratório CAMA/UFPR.

Um dia antes do início da exposição, os peixes foram transferidos aos aquários para então serem submetidos à contaminação hídrica com malathion em sistema estático por um período de 48 horas. Ao longo das 48h, seis amostras de água por aquário (2 mL) foram retiradas de todos os aquários e armazenadas a -20 °C de modo a verificar a quantidade de malathion remanescente na água. Os tempos de coleta de água foram t_0 (0h, logo após a contaminação), t_1 (3h após a contaminação), t_2 (6h após a contaminação), t_3 (12h após a contaminação), t_4 (24h após a contaminação) e t_5 (48h após a contaminação). Ainda, 3 aquários brancos (sem peixes, apenas com o contaminante) foram montados nas mesmas condições dos demais para avaliar a estabilidade do malathion durante o período experimental.

Após esse período os espécimes tiveram uma amostra de sangue coletada por punção cardíaca com o auxílio de um microcapilar. Uma 5 μ L gota do sangue foi transferida a um microtubo contendo 500 μ L de soro bovino fetal (SBF) para realização do ensaio cometa em eritrócitos (ECA). Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por secção medular, medidos, pesados e tiveram uma porção da musculatura epaxial colocada em microtubos e armazenada a -80°C para a realização da AChE.

Análise química

O perfil cinético do malathion na água foi determinado através da espectrometria de massas, em equipamento Varian 320MS, com infusão direta a $50 \mu\text{L min}^{-1}$. A câmara foi mantida a 45°C , sob pressão de N_2 40psi e gás de secagem a 200°C . A voltagem na câmara foi de 4.000V e detector em 1.200V. Curva padrão foi elaborada com padrão analítico de malathion (Sigma-Aldrich) em intervalo de concentração entre 25 a $400 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados foram descritivamente expressos como média \pm desvio padrão.

Desenho experimental – Danio rerio

O malathion (CAS n° 121-75-5) comercial foi comprado em uma floricultura de Curitiba-PR (Malatol 500CE líquido – 10ml, 5% malathion) e diluído em água destilada a uma concentração de 1 g L^{-1} . A partir dessa solução mãe, foi feita uma diluição escolhida na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ baseada no trabalho de Ansari e Kumar (1984).

O experimento foi dividido em duas fases, aclimação e exposição. Uma vez adquiridos, peixes da espécie *Danio rerio* (~ 200 peixes, Moby Dick – Aquários e Peixes) foram aclimatados por 30 dias no laboratório CAMA/UFPR em tanques de 250 L com água filtrada, aeração constante, temperatura média de 22°C e alimentados diariamente com ração comercial. A partir desse primeiro período de aclimação, 90 peixes foram escolhidos aleatoriamente e divididos em três aquários (30 peixes por aquário, aquários de 36 L), onde permaneceram por sete dias.

Para a etapa de exposição, dividimos o experimento em sub-replicado (UR) e outro como replicado (R). O controle sub-replicado (URC) e tratamento subreplicado (URT) foram realizados em dois recipientes de 10L, com dez peixes em cada um, distribuídos aleatoriamente a partir dos três aquários de aclimação. O controle replicado (RC) e tratamento replicado (RT) foram conduzidos em vinte recipientes de 2L, com um peixe em cada, distribuídos aleatoriamente a partir dos três aquários de aclimação. Todos os aquários foram completados com água reconstituída, intercalados no laboratório e distribuídos aleatoriamente como tratamento ou controle.

A fase de exposição durou 96 horas, e os grupos tratamentos foram submetidos a uma exposição hídrica de 500 ug/L de malathion em ensaio estático enquanto que os grupos controle permaneceram em água reconstituída. A verificação analítica do malathion na água não foi realizada para que fosse possível verificar se apenas através da concentração nominal os resultados obtidos seriam condizentes com a literatura.

Após esse período, os espécimes foram pesados, medidos e decapitados e tiveram 5 µL de sangue coletada com auxílio de micropipeta. O sangue foi transferido a um microtubo contendo 500 µL de soro bovino fetal (SBF) para realização do ECA. Após a coleta do sangue, o restante do corpo foi colocado em microtubo e armazenado a -80 °C para a realização da AChE.

Água reconstituída

Para a produção de água reconstituída (dureza 40 mg de CaCO₃/L) duas soluções básicas (X e Y) foram usadas. A solução X continha 1,5 g de diidrato de sulfato de cálcio (CaSO₄.2H₂O) dissolvido em 1 L de água destilada. A solução Y continha 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 4,8 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e 6,1 g de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) dissolvido em 1 L de água destilada. A preparação da água reconstituída foi na proporção de 2X : 1Y: 97 de H₂O destilada. Depois da preparação, a solução foi aerada durante 24 horas para a solubilização completa dos sais, saturação de oxigênio e estabilização do pH.

Biomarcadores – A. bifasciatus e D. rerio

Ensaio Cometa: O ECA foi realizado de acordo com Speit e Hartmann (1999), com ajustes segundo Ferraro *et al.* (2004) e Cestari *et al.* (2004). 5 µL da suspensão celular foram retirados de cada amostra e misturados com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0.5%. Os passos seguintes foram realizados de acordo com Speit e Hartmann (1999). De cada peixe, 100 nucleoides foram analisados de acordo com a classificação visual baseada na migração dos fragmentos de DNA a partir do núcleo. Os resultados foram categorizados em classes de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo) (Collins *et al.*, 1997).

Atividade da AChE: A atividade da AChE foi medida a 415 nm em intervalos de 15 segundos durante 2 minutos, pelo método de Ellman *et al.* (1961) modificada para microplaca por Silva de Assis (1998). Proteínas totais foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976) adaptado para microplacas, sob o comprimento de onda de 595 nm.

Análise estatística

Os dados dos biomarcadores foram verificados quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov), homocedasticidade (Bartlett) e presença de outliers (Grubbs). Dados paramétricos foram relatados como média \pm desvio padrão e foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey com um nível de significância de 0,05. Dados não paramétricos foram relatados como mediana \pm mínimo e máximo e foi realizado Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn com um nível de significância de 0,05.

Revisão de literatura

De modo a ampliar o conhecimento obtido nos bioensaios, foi feita uma revisão de literatura nos bancos de dados Google Scholar e ISI Web of Science com as palavras-chave “fish”, “acetylcholinesterase” e “malathion” e amplitude de busca de 1970 a 2015. Cada artigo obtido foi analisado buscando-se verificar o tipo de bioensaio (concentração letal (LC) e/ou concentração subletal (SL)), o desenho experimental (UR ou R), a quantidade de peixes por aquário, o número de réplicas (número de aquários utilizados caso desenho experimental do tipo R) e o tipo de resposta obtido para a acetilcolinesterase frente à contaminação do organismo ao malathion (dose e/ou tempo dependentes) (Tabela 1).

Resultados

Astyanax bifasciatus

Na análise química da água (Fig. 3), estão representados os aquários brancos (triângulo), UR (quadrado) e R (círculo). Primeiramente, nota-se que a concentração nominal proposta estava presente em todos os aquários (t_0 branco: $249 \pm 5,79$; t_0 UR: $259,39$; t_0 R: $237,46 \pm 41,72 \mu\text{g L}^{-1}$). Também foi possível perceber que o malathion, após as 48h de bioensaio, permanece estável e na concentração inicial nos aquários brancos, não havendo perda do mesmo para o meio. Curiosamente, tanto o aquário UR (com dez peixes) quanto os R (com um peixe) possuem um padrão semelhante de decréscimo do malathion, sendo que este já não é mais encontrado na água dos aquários após as 48h de bioensaio.

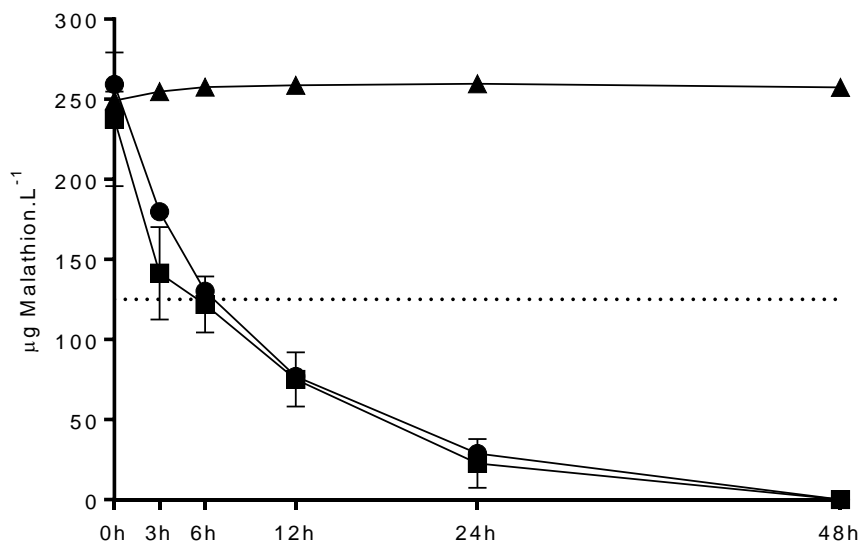


Fig. 3: Gráfico representando o perfil cinético do malathion na água dos aquários ao longo das 48h de experimento. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão da concentração de Cu^{2+} observada em seu respectivo tempo. \blacktriangle aquários brancos; \blacksquare aquários UR; \bullet aquários R. A linha pontilhada é referente à metade da concentração nominal inicial.

A água dos bioensaios se manteve a uma temperatura média de $22,56^\circ\text{C} \pm 0,16^\circ\text{C}$ e pH $7,15 \pm 0,05$. O peso médio dos animais foi $5,84\text{g} \pm 1,12\text{g}$ e o comprimento total médio $8,4\text{cm} \pm 0,47\text{cm}$.

Quanto aos biomarcadores, uma comparação intragrupos (URCxURT e RCxRT) mostrou que a atividade da acetilcolinesterase muscular (Fig. 1) foi significativamente inibida em todos os grupos tratados quando comparados com os grupos controle. A comparação intergrupos (URCxRT e RCxURT) mostrou a mesma inibição significativa. Não houve diferenças significativas entre os grupos semelhantes (URCxRC e URTxRT). Quanto ao ECA, não houve diferenças significativas entre os grupos (Fig. 1B).

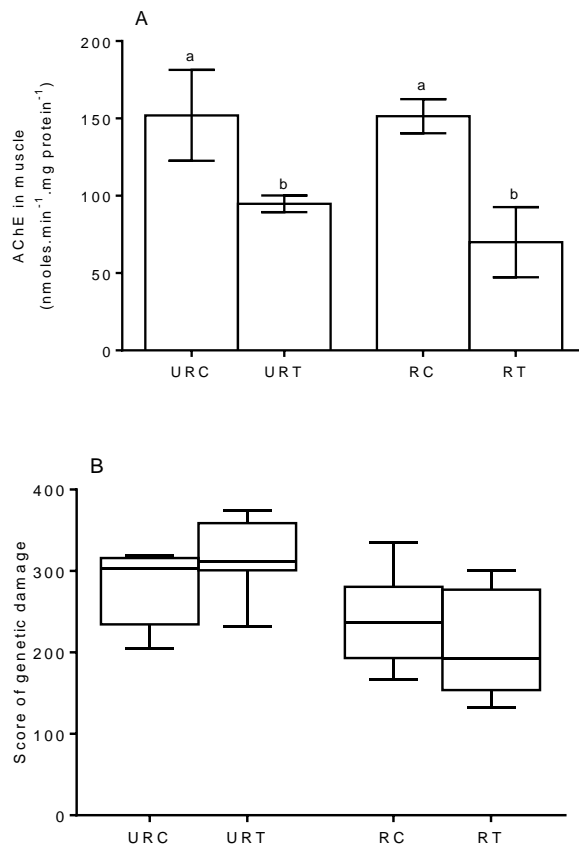


Fig. 1: A- atividade da acetilcolinesterase muscular de *A. bifasciatus*; B- escore do dano genético em eritrócitos de *A. bifasciatus*. Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes, $p < 0,05$.

Danio rerio

A água dos bioensaios se manteve a uma temperatura média de $23,08^{\circ}\text{C} \pm 0,13^{\circ}\text{C}$ e pH $7,38 \pm 0,07$. O peso médio dos animais foi $0,31\text{g} \pm 0,09\text{g}$ e o comprimento total médio $3,4\text{cm} \pm 0,32\text{cm}$.

De maneira similar ao *A. bifasciatus*, a comparação intragrupos (URCxURT e RCxRT) mostrou que a atividade de acetilcolinesterase (Fig. 4A) foi significativamente inibida em todos os grupos contaminados quando comparados com os grupos controle. A comparação intergrupos (URCxRT e RCxURT) mostrou a mesma inibição significativa. Não houve diferenças significativas entre os grupos semelhantes (URCxRC e URTxRT). Quanto ao ECA, não houve diferença significativa entre os grupos (Fig. 4B).

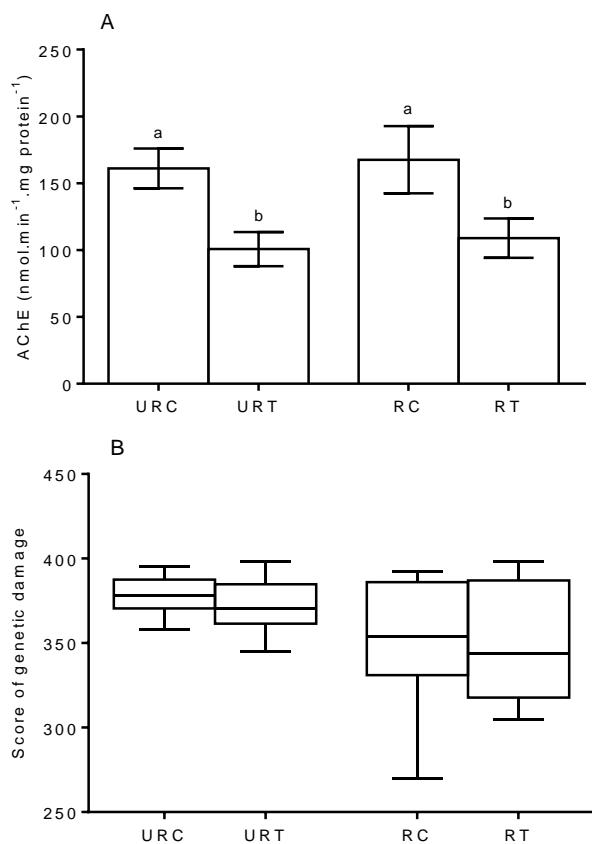


Fig. 4: A- atividade da acetilcolinesterase de *D. rerio*; B- escore do dano genético em eritrócitos de *D. rerio*. Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes, $p < 0,05$.

Revisão de literatura

A revisão da literatura (Tabela 1) mostrou que, dos 30 artigos analisados, 4 realizaram bioensaios do tipo LC, 15 do tipo SL e 11 dos dois tipos. Com relação ao tipo de desenho experimental, 17 (50%) foram do tipo UR e 17 (50%) do tipo R. Quanto ao número de réplicas, houve a predominância de triplicatas (11 (64%)). A análise de

dose e/ou tempo dependência não foi incluída na tabela, pois todos os estudos (100%) acharam algum desses tipos de resposta relacionados à atividade da AChE dos peixes expostos ao malathion.

Tabela 1. Artigos revisados quanto ao tipo de bioensaio (LC- concentração letal, SL- concentração subletal), desenho experimental (UR- sub-replicado, R- replicado) e nº de réplicas.

nº	Referência	Bioensaio	Desenho experimental	nº de réplicas
1	Eaton, 1970	SL	UR - 15 peixes/aquário	-
2	Coppage <i>et al.</i> , 1975	LC	SL R - 10 peixes/aquário	3 to 12
3	Sailatha <i>et al.</i> , 1981	LC	UR - 8 peixes/aquário	-
4	Ansari and Kumar, 1984	SL	R - 20 peixes/aquário	6
5	Richmonds and Dutta, 1992	SL	R - 5 peixes/aquário	2
6	Pathiratne and George, 1998	LC	SL R - 5 peixes/aquário	3
7	Beauvais <i>et al.</i> , 2000	SL	R - 30 peixes/aquário	3
8	Singh <i>et al.</i> , 2004	LC	SL R - 5 to 10 peixes/aquário	6
9	Pandey <i>et al.</i> , 2005	SL	R - 10 peixes/aquário	2
10	Venkataramana <i>et al.</i> , 2006	SL	UR - 32 peixes/aquário	-
11	Kumar <i>et al.</i> , 2010	LC	R - 10 peixes/aquário	2
		SL	UR - 8 peixes/aquário	-
12	Barbieri and Ferreira, 2011	LC	R - 5 peixes/aquário	3
		SL	UR - 6 peixes/aquário	-
13	Mount and Stephan, 2011	SL	R - 10 peixes/aquário	2
14	Parveen and Shadab, 2011	SL	R - 8 peixes/aquário	3
15	Rico <i>et al.</i> , 2011	LC	SL R - 10 peixes/aquário	3
16	Tenmozhi <i>et al.</i> , 2011	LC	UR - 10 peixes/aquário	-
17	Ahmad 2012	LC	R - 10 peixes/aquário	3
		SL	R - 4 peixes/aquário	3
18	Al-Ghanim 2012	LC	SL R - 10 peixes/aquário	3
19	Deka and Mahanta, 2012	SL	UR - ?? peixes/aquário	-
20	Fahmy 2012	LC	SL UR - 10 peixes/aquário	-
21	Rani and Venkataramana, 2012	SL	UR - 10 peixes/aquário	-
22	Magar and Bias, 2013	SL	UR - ?? peixes/aquário	-
23	Magar and Shaikh, 2013	LC	UR - 10 peixes/aquário	-
24	Roopavathy <i>et al.</i> , 2013	SL	UR - 12 peixes/aquário	-
25	Kandiel <i>et al.</i> , 2014	LC	UR - 10 peixes/aquário	-
		SL	R - 8 peixes/aquário	3
26	Yonar <i>et al.</i> , 2014	SL	R - 10 peixes/aquário	3
27	Sadeghi and Imanpoor, 2015	LC	UR - 7 peixes/aquário	-
28	Jayaprakash <i>et al.</i> , 2015	SL	UR - 6 peixes/aquário	-
29	Banaee <i>et al.</i> , 2015	SL	UR - 12 peixes/aquário	-
30	Borthakur 2015	LC	SL UR - 20 peixes/aquário	-

Discussão

A fim de ilustrar os pensamentos apresentados anteriormente, dois dos tipos mais comuns de desenhos experimentais encontrados na literatura ecotoxicológica foram conduzidos, um desenho sub-replicado (UR) e um replicado (R).

No que diz respeito ao biomarcador de neurotoxicidade, o nosso trabalho está de acordo com os primeiros resultados de Ansari e Kumar (1984) para *Danio rerio*. Esses dois autores encontraram uma taxa de inibição de 67% na atividade da AChE de *Danio rerio* em um experimento de exposição hídrica de sete dias, enquanto que encontramos em torno de 30% de inibição em um experimento de quatro dias, com a mesma concentração de malathion. O efeito inibidor do organofosforado também foi observado na AChE muscular de *A. bifasciatus*, o que é condizente com a literatura descrita para o mecanismo de ação dessas moléculas.

Quanto ao biomarcadore genético (Fig. 2), Kumar *et al.* (2010) encontraram evidências de genotoxicidade dependente da concentração do malathion em *Channa punctatus* para concentrações até três vezes maiores da utilizada neste estudo. Como dito anteriormente, espécies diferentes podem ter mecanismos diferentes para combater os efeitos dos xenobióticos. Assim, a inobservância de danos nos eritrócitos de *A. bifasciatus* e *D. rerio* em uma exposição aguda parece coerente.

Também é interessante notar que, no desenho experimental de *A. bifasciatus*, a diminuição da concentração de malathion na água foi a mesma para os dois tipos de experimentos (UR e R). Apesar de o desenho UR possuir 10 peixes no aquário, a proporção de água por peixe era a mesma para os dois tipos de experimentos (8L de água por peixe), o que pode explicar a semelhança no decréscimo do contaminante. Para o bioensaio com *D. rerio*, por sua vez, a concentração nominal proposta parece ter sido atingida uma vez que os resultados estão de acordo com a literatura.

Tanto os resultados da AChE quanto do ECA são suficientes para mostrar que o efeito do tratamento, *i.e.* a contaminação pelo malathion, é observada em ambos os tipos de experimentos e entre eles. Portanto, a observação de uma diferença significativa na atividade da AChE de URCxRT e RCxURT, bem como o não aparecimento de diferença estatística entre os possíveis grupos comparáveis para o ECA, parecem validar a aparência do efeito do tratamento em URCxURT.

No entanto, como discutido antes, os grupos sub-replicados (UR) carecem de independência estatística devido à partilha do mesmo ambiente pelas unidades experimentais; assim a estatística inferencial não deveria ser aplicada uma vez que é a pseudorrepliação (e não verdadeira replicação) que pode estar ocorrendo. Contudo, ambos os tipos de experimentos (UR e R) apresentaram semelhança e significância intra e intergrupais, o que exhibe o desenho UR como um tipo válido para mostrar um efeito de tratamento.

A validade desse tipo de desenho experimental fica ainda mais evidente quando observamos a revisão literária. 50% dos desenhos experimentais dos artigos revisados eram do tipo UR e em todos eles os autores encontraram dose e/ou tempo de dependência entre a atividade da AChE dos peixes e a contaminação pelo malathion, da mesma forma que os estudos com desenhos do tipo R.

Realmente, os projetos UR podem ser válidos, mas eles também são mais propensos a incorporar efeitos espúrios e mascarar os resultados em comparação aos desenhos replicados. Para entender melhor essa questão, é importante notar que, neste experimento, a escolha particular do malathion como contaminante, assim como da AChE e do ECA como biomarcadores, foi feita porque os resultados eram bastante previsíveis.

A atividade da AChE é um biomarcador bem conhecido e bem descrito para observar os efeitos de compostos organofosforados, de modo que não é surpresa o fato dessa enzima estar inibida nos grupos tratados. Além disso, o dano genético por meio do ECA é menos provável que aconteça durante uma exposição aguda de baixa concentração a um contaminante orgânico e, de fato, tais danos não apareceram.

Por outro lado, se um experimento fosse conduzido com um xenobiótico não tão bem descrito e/ou com um biomarcador sem uma interação clara, o nosso comportamento intuitivo, nos grupos UR, seria de ver a significância estatística como um verdadeiro efeito do tratamento quando, na realidade, a diferença poderia ser um ruído de um teste inferencial mal aplicado.

Portanto, é preciso ter cuidado ao aplicar estatística inferencial para testar hipóteses baseadas em projetos UR. Certamente, há informação útil e válida em tal cenário, como em nosso experimento e em diversos outros na literatura, mas essa

informação também pode ser difícil de ser discernida a partir da interferência de um ruído se o pesquisador não for cauteloso em executar seu experimento e interpretar os dados, especialmente aqueles que vêm de abordagens novas ou não tão bem estabelecidas.

Finalmente, como notavelmente citado por Bastos *et al.* (2013), há, virtualmente e inevitavelmente, um certo grau de pseudorreplicação associado a qualquer estudo do ambiente natural que é deixado para o pesquisador ponderar e administrar. A pseudorreplicação não é absoluta, e não podemos esquecer que anos de conhecimento foram construídos antes que seu olhar justo começasse a orientar a ciência moderna. No fim das contas, é tanto o bom senso científico quando a análise são de contextos experimentais específicos que devem agir para o processo de construção do conhecimento na ciência.

Conclusão

A questão da pseudorreplicação é justa e merece nossa atenção sempre que possível. Como discutido neste estudo, é muito fácil conduzir o leitor a conclusões errôneas sobre uma hipótese analisada através de uma abordagem estatística pseudoreplicada. Segundo Hargrove e Pickering (1992), a essência da pseudorreplicação não é o design, mas o engano, intencional ou não. Assim, esperamos que a nova terminologia e classificação de projetos experimentais oferecidas neste estudo sirvam para ajudar os ecotoxicólogos a melhor projetar seus experimentos e interpretar seus dados.

Referências

Ahmad, Z. Toxicity bioassay and effects of sub-lethal exposure of malathion on biochemical composition and haematological parameters of *Clarias gariepinus*. *Afr J Biotechnol*, 11(34):8578-8585, 2012

Al-Ghanim, K. A. Malathion toxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* - A haematological and biochemical study. *Afr J Biotechnol*, 7(4):561-567, 2012.

Ansari, B. A., and Kumar, K. 1984. Malathion toxicity: In vivo inhibition of acetylcholinesterase in the fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *Toxicol Lett*, 20:283-287, 1984.

Banaee, M.; Sureda, A.; Shahaf, S.; Fazilat, N. Protective Effects of Silymarin Extract on Malthion-Induced Zebra Cichlid (*Cichlasoma Nigrofasciatum*) Hepatotoxicity. *Iran J Toxicol*, 9(28):1240-1246, 2015.

Barbieri, E.; Ferreira, L. A. A. Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600[®] on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pestic Biochem Phys*, 99:209-214, 2011.

Bastos, A. C., Monaghan, K. A., Pestana, J. L. T., Lillebo, A. I., Loureiro, S. A comment on the Editorial "Replication in aquatic biology: The result is often pseudoreplication". *Aquat Toxicol*, 126:467-470, 2013.

Beauvais, S. L.; Jones, S. B.; Brewer, S. K.; Little, E. E. Physiological measures of neurotoxicity of diazinon and malathion to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their correlation with behavioral measures. *Environ Toxicol Chem*, 19(7):1875-1880, 2000.

Borthakur, M. K. Comparative study of tissue lipid and protein peroxides as oxidative stress markers in sublethal malathion exposed Indian Catfish *Heteropneustes fossilis*. *Int J Pure App Biosci*, 3(2):407-412, 2015.

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

Carson, R. *Silent Spring*. Houghton Mifflin, Sep 27. 1962.

Cestari, M. M.; Lemos, P. M. M.; Oliveira Ribeiro, C. A.; Alves Costa, J. R. M.; Pelletier, E.; Ferraro, M. V. M.; Mantovani, M. S.; Fenocchio, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genet Mol Biol*, 27(2):270–274, 2004.

Collins, A. R.; Dobson, V. L.; Dusinská, M.; Kennedy, G.; Stětina, R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*, 375(2):183–93, 1997.

Coppage, D. I.; Matthews, E.; Cook, G. H.; Knight, J. Brain Acetylcholinesterase Inhibition in Fish as a Diagnosis of Environmental Poisoning by Malathion, O,O-Dimethyl S-(1,2-Dicarbethoxyethyl) Phosphorodithioatel. *Pestic Biochem Phys*, 5:536-542, 1975.

Cottenie, K., and De Meester, L. Comment to Oksanen (2001): reconciling Oksanen (2001) and Hurlbert (1984). *Oikos*, 100:394-396, 2003.

Deka, S.; Mahanta, R. A Study on the Effect of Organophosphorus Pesticide Malathion on Hepato-Renal and Reproductive Organs of *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *The Sci Probe*, 1(1):1-13, 2012.

Eaton, J. G. Chronic malathion toxicity to the bluegill (*Lepomis macrochirus rafinesque*). *Water Res*, 4:673-684, 1970.

Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. J.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7:88–95, 1961.

Fahmy, G. H. Malathion Toxicity: Effect on Some Metabolic Activities in *Oreochromis Niloticus*, the Tilapia Fish. *Int J Biosci Biochem Bioinf*, 2(1)52-55, 2012.

Ferraro, M. V. M.; Fenocchio, A. S.; Mantovani, M. S.; Ribeiro, C. D. O.; Cestari, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the 89 fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genet Mol Biol*, 27(1):103–107, 2004.

Gervais, J. A.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. 2009. Malathion Technical Fact Sheet; *National Pesticide Information Center*, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/malatech.pdf>

Hargrove, W. W., and Pickering, J. Pseudoreplication: a *sine qua non* for regional ecology. *Landscape Ecol*, 6:251-258. 1992.

Hawkins, C. P. Pseudo-understanding of pseudoreplication: a cautionary note. *Bull Ecol Soc Am*, 67:184-185, 1986.

Heffner, R. A., Butler, M. J., Reilly, C. K. Pseudoreplication revisited. *Ecology*, 77:2558-2562, 1996.

Hurlbert, S. H. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecol Monogr*, 54:187-211, 1984.

Hurlbert, S. H. On misinterpretations of pseudoreplication and related matters: a reply to Oksanen. *Oikos*, 104:591-597, 2004.

Jayaprakash, G.; Raju, N.; Rao, B. T.; Venkaiah, Y. Effect of malathion (an organo phosphate) on biochemical constituents of fresh water cat fish *Heteropneustes fossilis* (bloch). *Int J Biol Phar All Sci*, 4(2):668-677, 2015.

Kandiel, M. M. M.; El-Asely, A. M.; Radwan, H. A.; Abbass, A. A. Modulation of genotoxicity and endocrine disruptive effects of malathion by dietary honeybee pollen and propolis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Adv Res*, 5:671-684, 2014.

Kozlov, M. V. Improper sampling design and pseudoreplicated analysis: conclusions by Velickovic (2004) questioned. *Hereditas*, 144:43-44, 2007.

Kozlov, M. V., and Hurlbert, S. H. Pseudoreplication, chatter, and the international nature of science: A response to D. V. Tatarnikov. *J Fund Biol (Moscow)*, 67:145-152, 2006.

Krull, M., Barros, F., Newman, M. Pseudoreplication in ecotoxicology. *Integr Environ Assess Manage*, 9:531-540, 2013.

Kumar, R., Nagpure, N. S., Kushwaha, B., Srivastava, S. K. Investigation of the genotoxicity of malathion to freshwater teleost fish *Channa punctatus* (Bloch) using the micronucleus test and comet assay. *Arch Environ Con Tox*, 58:123-130, 2010.

Lazic, S. E. The problem of pseudoreplication in neuroscientific studies: is it affecting your analysis?. *Neuroscience*, 11:1-17, 2010.

Magar, R. S.; Bias, U. E. Histopathological Impact of Malathion on the Ovary of the Fresh Water fish *Channa punctatus*. *Int Res J Environ Sci*, 2(3):59-61, 2013.

Magar, R. S.; Shaikh, A. Effect of malathion on acid phosphatase activity of fresh water fish *Channa punctatus*. *Int J Pharm Chem Biol Sci*, 3(3):720-722, 2013.

Millar R. B., and Anderson, J. A. Remedies for pseudoreplication. *Fish Res*, 70:397-407, 2004.

Mount, D. I.; Stephan, C. E. A Method for Establishing Acceptable Toxicant Limits for Fish—Malathion and the Butoxyethanol Ester of 2,4-D. *T Am Fish Soc*, 96(2):185-193, 2015.

Nikinmaa, M., Celander, M., Tjeerdema, R. Replication in aquatic biology: The result is often pseudoreplication. *Aquat Toxicol*, 3(4):116-117, 2012.

Oksanen, L. Logic of experiments in ecology: is pseudoreplication a pseudoissue?. *Oikos*, 94:27-38, 2001.

Oksanen, L. *The devil lies in details*: reply to Stuart Hurlbert. *Oikos*, 104:598-604, 2004

Pandey, S.; Kumar, R.; Sharma, S.; Nagpure, N. S.; Srivastava, S. K.; Verma, M. S. Acute toxicity bioassays of mercuric chloride and malathion on air-breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotox Environ Safe*, 61:114-120, 2005.

Parveen, N.; Shadab, G. G. H. A. evaluation of micronuclei and haematological profiles as genotoxic assays in *Channa punctatus* exposed to malathion. *Int J Sci Nat*, 2(3):625-631, 2011.

Pathiratne, A.; George, S. G.; Toxicity of malathion to nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and modulation by other environmental contaminants. *Aquat Toxicol*, 43:261–271, 1998.

Rani, S. P. N.; Venkataramana, G .V. Effects of the organophosphorous malathion on the branchial gills of a freshwater fish *glossogobius giuris* (Ham). *Int J Sci Nat*, 3(2):324-330, 2012.

Richmonds, C. R.; Dutta, H. M. Effect of Malathion on the Brain Acetylcholinesterase Activity of Bluegill Sunfish *Lepomis macrochirus*. *Bull Environ Contain Toxicol*, 49:431-435, 1992.

Rico, A.; Waichman, A. V.; Geber-Corrêa, R.; van den Brink, P. J. Effects of malathion and carbendazim on Amazonian freshwater organisms: comparison of tropical and temperate species sensitivity distributions. *Ecotoxicol*, 20:625–634, 2011.

Roopavathy, J. Sukumaran, M.; Rengarajan, R.; Ravichelvan, R.; Narasiman, N. Toxicity of Malathion on Metabolic Activities in the River Cauvery of Tilapia Fish (*Oreochromis mossambicus*). *Int J Pharm Biol Arch*, 4(5):986 – 989, 2013.

Sadeghi, A.; Imanpoor, M. R. Investigation of LC50, NOEC, and LOEC of Oxadiazon, Deltamethrin, and Malathion on Platy Fish (*Xiphophorus Maculatus*). *Iran J Toxicol*, 9(28):1271-1276, 2015.

Sailatha, D.; Sahib, I. K. A.; Rao, K. V. R. Toxicity of technical and commercial grade malathion to the fish, *Tilapia mossambica* (Peters). *Proc Indian Acad Sci (Anim Sci)*, 90(1):87-92, 1981.

Schank, J. C., and Koehnle, T. J. Pseudoreplication is a pseudoproblem. *J Comp Psychol*, 123:421-433, 2009.

Silva de Assis, H. C. *Der Einsatz Von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen*. Alemanha. Universidade Técnica de Berlim, 1998.

Singh, S. K.; Tripathi, P. K.; Yadav, R. P.; Singh, D.; Singh A. Toxicity of Malathion and Carbaryl pesticides: effects on some biochemical profiles of the freshwater fish *Colisa fasciatus*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 72:592-599, 2004.

Speit, G.; Hartmann, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*, 113:203–12, 1999.

Spengler, J. D., and Sexton, K. A. Indoor Air Pollution: A Public Health Perspective. *Science*, 221:9–17, 1983.

Sungmin, H., Candelone, J. P., Patterson, C. C., Boutron, C. F. History of Ancient Copper Smelting Pollution During Roman and Medieval Times Recorded in Greenland Ice. *Science*, 272:246–249, 1996.

Tatarnikov, D. V. On methodological aspects of ecological experiments (comments on M. V. Kozlov publication). *Zh Obshch Biol*, 66:90-93, 2005.

Thenmozhi, C.; Vignesh, V.; Thirumurugan, R.; Arun, S. Impacts of malathion on mortality and biochemical changes of freshwater fish *Labeo rohita*. *Iran J Environ Health Sci Eng*, 8(4):387-394, 2011.

Truhaut, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. *Ecotox Environ Safe*, 1:151-173, 1977.

Underwood, A. J. 1994. On beyond BACI: Sampling designs that might reliably detect environmental disturbances. *Ecol Appl*, 4:3-15, 1994.

Venkataramana, G. V.; Rani, N. S.; Murthy, P. S. Impact of malathion on the biochemical parameters of gobiid fish, *Glossogobius giuris* (Ham). *J Environ Biol*, 27(1) 119-122, 2006.

Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., Peakall, D. B. *Principles of Ecotoxicology*, Fourth Edition, CRC Press, Mar 12. 2012.

Yonar, S. M.; Ural, M. S.; Silici, S.; Yonar, M. E. Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of propolis. *Ecotox Environ Safe*, 102:202-209, 2014.

Capítulo 2

Subindo a escada taxonômica: um gênero pode ser usado como bioindicador? Relações ecotoxicológicas entre as respostas de *Astyanax altiparanae*, *Astyanax bifasciatus* e *Astyanax ribeirae*

Climbing the taxonomic ladder: could a genus be used as bioindicator? Ecotoxicological relationship between the responses of *Astyanax altiparanae*, *Astyanax bifasciatus* and *Astyanax ribeirae*.

Tincani, F. H.¹; Santos, G. S.¹; Azevedo, A. C. B.²; Marques, A. E. M. L.³; Pereira, L. S.⁴; Castellano, G. C.⁵; da Silva, T. A.⁶; Galvan, G. L.¹; Chimentão, F. G.²; Silva, C. P.⁷; Oliveira Ribeiro, C. A.²; Silva de Assis, H. C.^{1,4}; Barbosa, R. V.⁶; Campos, S. X.⁷; Ramsdorf, W. A.⁸; Cestari, M. M.^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação - UFPR

² Departamento de Biologia Celular - UFPR

³ Departamento de Genética - UFPR

⁴ Departamento de Farmacologia - UFPR

⁵ Departamento de Fisiologia - UFPR

⁶ Departamento de Química - UFPR

⁷ Departamento de Química - UEPG

⁸ Departamento de Química e Biologia - UTFPR

Abstract

Due to difficulties related to the taxonomy and sampling of specimens, and since they have great ecological and behavioral similarities, the genus *Astyanax* is widely used in ecotoxicological bioassays and in biomonitoring studies. However, there are no studies that demonstrate the interspecific relationships of ecotoxicological responses of these species. Therefore, this study aimed to induce, through acute water exposure bioassays, the responses of certain enzymatic systems of three species of this genus, *A. altiparanae*, *A. bifasciatus* and *A. ribeirae*. The antioxidant systems were induced by Cu contamination and were verified through the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and carbonic anhydrase (CA). The responses of the biotransformation (activity of etoxiresorufin-O-deetilase (EROD) and glutathione S-transferase (GST)), neurotoxicity (activity of acetylcholinesterase (AChE)) and liver histopathology were checked against the contamination by malathion. For both bioassays the damage to lipids (LPO), DNA (comet assay in blood (ECA) and liver (HCA), micronucleus test (MNA) and polichromatic erythrocytes (PCE)) also was evaluated. A cluster analysis was performed and was efficient in integrating all the results of the three species and to display the ecotoxicological relationship between them, which showed that, despite the non-induction or the unclear action of the enzyme systems, all three species of *Astyanax* were susceptible to contamination from both xenobiotics, since damages to their macromolecules were observed. Through these studies we hope to contribute to the creation of a database on the genus regarding its ecotoxicological answers and we encourage further studies to be conducted in order to enrich the knowledge on the ecotoxicology of *Astyanax*.

Keywords: Ecotoxicology, *Astyanax*, Genotoxicity, Neurotoxicity, Oxidative Stress, Cluster Analysis.

Introdução

Cento e cinquenta e sete anos desde *A Origem das Espécies*, era de se esperar que a biologia possuísse uma teoria amplamente aceita sobre especiação. Ao invés disso, há, no mínimo, mais discordância sobre o tema do que nunca (Sites e Marshall, 2003). Mesmo após conceitos bastante difundidos, como o conceito biológico de espécie, em que estas são consideradas como populações reprodutivas isoladas de outras tais populações, nem todos aceitam uma definição comum do que é uma espécie (Mallet, 1995).

Esse problema se acentua quando observamos espécies estritamente relacionadas, com pouca diferenciação morfológica, ecológica e comportamental, principalmente aquelas com indícios de grupos em especiação recente, assim como é o gênero *Astyanax* (Gurgel, 2004; Garavello e Sampaio, 2010). Nesses casos, embora as evidências mais extensas sobre a história evolutiva das espécies venham de situações mediadas pela seleção natural, os contaminantes ambientais podem afetar estas trajetórias através de vários processos (mutação, fluxo gênico, deriva genética) (Klerks *et al.*, 2011). Quando a contaminação afeta a sobrevivência e/ou a reprodução, a seleção natural favorece aqueles indivíduos que são menos sensíveis ao contaminante e essa força seletiva, por sua vez, pode agir na população como um todo (Wolf *et al.*, 2004; Bourret *et al.*, 2008).

Sabe-se que algumas características fenotípicas fundamentais para a manutenção das funções vitais, *e.g.* estruturas proteicas, funções enzimática etc, apresentam relevante conservação mesmo em clados bastante distantes. Portanto, é de se esperar que essas semelhanças sejam maiores em organismos evolutivamente mais próximos (McElwee *et al.*, 2007; Zamocky *et al.*, 2008; Pezzementi *et al.*, 2011).

O campo da ecotoxicologia estuda os efeitos dos produtos químicos sobre os ecossistemas em diferentes níveis de organização biológica, desde o nível molecular e celular ao ecossistêmico (Connon *et al.*, 2012). Por isso, a diversidade de organismos e a complexidade dos ambientes se tornam os maiores desafios para programas de monitoramento ecotoxicológico, sendo necessária, portanto, a criação de bancos de dados sólidos para o correto gerenciamento dos ecossistemas em longo prazo

(Kremen *et al.*, 1992; Hamilton *et al.*, 2015). Uma estratégia comum na ecotoxicologia é a de concentrar o monitoramento em organismos sensíveis e bem conhecidos, contudo diretrizes para a seleção de espécies, ou grupos apropriados, ainda são escassas.

Além dos desafios relacionados à diversidade biológica das espécies, a comunidade científica encontra-se em um momento de reflexão quanto às abordagens referentes à experimentação animal (Kilkenny *et al.*, 2010). A necessidade de melhorar a concepção, realização e análise de pesquisas com animais têm ganhado impulso e feito com que sejam tomadas ações no intuito de minimizar o uso e melhorar o bem-estar animal. Para isso, conhecimentos sobre os requisitos biológicos e comportamentais dos animais devem ser gerados, traduzindo-os em informações práticas que visem minimizar o número de indivíduos utilizados, a dor e o sofrimento, bem como assegurar a robustez e reprodutibilidade dos experimentos realizados.

Uma vez que não há estudos que mostram as relações entre as respostas ecotoxicológicas de *Astyanax* e uma vez que, por causa de dificuldades taxonômicas e de coleta, diversos estudos acabam por utilizar o gênero como bioindicador devido às semelhanças ecológicas e comportamentais de seus membros (Rossi *et al.*, 2011; Ramsdorf *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014; Costa-Silva *et al.*, 2015; Freire *et al.*, 2015), é necessário que sejam gerados conhecimentos no sentido de compreender como as espécies desse gênero se comportam frente à situações semelhantes de contaminação.

Este estudo foi conduzido sob bioensaios controlados e buscou induzir, através de contaminantes específicos, as repostas de biomarcadores de três espécies do gênero *Astyanax* (*A. altiparanae*, *A. bifasciatus* e *A. ribeirae*), com o intuito de verificar determinados sistemas de combate a xenobióticos. A verificação desses sistemas foi realizada através de um protocolo simples de integração de dados que permite o estabelecimento das propriedades bioindicadoras do gênero no sentido de verificar as relações entre as repostas interespecíficas e a possibilidade da utilização do gênero como bioindicador de testes ecotoxicológicos.

Dessa forma, este trabalho busca, além de dar respaldo aos estudos já existentes com o gênero e base para futuras investigações, introduzir uma estratégia para avaliar e prever efeitos de poluentes a nível genérico, de forma a eliminar

grande parte dos problemas amostrais e taxonômicos existentes nesse tipo de estudo e, do ponto de vista conservacional, diminuir a pressão de coleta sobre populações específicas de *Astyanax*.

Material e Métodos

Bioindicadores

Três espécies do gênero *Astyanax* foram adquiridas de comerciantes locais para a realização dos bioensaios. *A. altiparanae* foram adquiridos da Piscicultura Alevinos Curitiba (Curitiba-PR), *A. bifasciatus* foram adquiridos do Pesqueiro Água da Serra (Quatro Barras-PR) e *A. ribeirae* foram adquiridos da Santpar – Produtos Coloniais (Garuva-SC) para a realização dos bioensaios.

Desenho experimental - Cobre

O sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; CAS n° 7758-98-7, Sigma-Aldrich) foi diluído em água destilada a uma concentração de 1 g L^{-1} . A partir dessa solução mãe, as diluições foram realizadas nos aquários nas concentrações de 13, 26 e $52 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu. De acordo com o CONAMA 357/2005, $13 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ é a concentração máxima de Cu permitida para águas de classe III. Os demais tratamentos foram determinados na grandeza de 2 para cima da concentração inicial.

Os peixes foram aclimatados por 30 dias no Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental (CAMA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em tanques de 2000 L de água filtrada com aeração constante, temperatura média de 22°C e alimentados diariamente com ração comercial. Foi realizado experimento do tipo replicado sendo que, um dia antes do início da exposição ao Cu, 40 peixes foram transferidos para 40 aquários (1 peixe por aquário) de 24 L com condições similares aos tanques. Dez aquários foram destinados aos grupos controle negativo (NC) e os outros trinta aos grupos expostos às concentrações de 13, 26 e $52 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (dez para cada tratamento, T1, T2 e T3, respectivamente). Ainda 9 aquários brancos (sem peixes, apenas com o contaminante) foram montados nas mesmas condições dos demais para se observar a estabilidade do Cu durante o período experimental.

Os peixes foram submetidos à contaminação hídrica com Cu em sistema estático por um período de 96 horas. Ao longo das 96h, 3 amostras de água (12 mL) foram retiradas de três aquários para cada grupo, acidificadas a pH 2 com HNO₃ (10%) e armazenadas a 4°C de modo a verificar a quantidade de Cu remanescente na água. Os tempos de coleta de água foram t0 (0h, logo após a contaminação), t1 (48h após a contaminação) e t2 (96h após a contaminação).

Após o período do bioensaio, os espécimes tiveram uma amostra de sangue coletada por punção cardíaca com o auxílio de um microcapilar. 5 µL do sangue foram transferidas a um microtubo contendo 500 µL de SBF para realização do ensaio cometa com eritrócitos (ECA) enquanto que com outros 5 µL foi realizado um esfregaço em lâmina para realização do teste do micronúcleo pisco (MNT). Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por secção medular, medidos, pesados e tiveram o fígado e as brânquias retirados para análises. O fígado foi retirado e colocado em uma placa de petri. Uma pequena amostra do órgão foi separada com o auxílio de um bisturi e colocada em um microtubo contendo 250 µL de soro bovino fetal (SBF) para realização do ensaio cometa com hepatócitos (HCA). O restante foi colocado em microtubo e armazenado a -80°C para a realização da análise da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e da glutathione peroxidase (GPx), além da quantificação da lipoperoxidação (LPO). As brânquias foram retiradas, colocadas em microtubos e armazenadas a -80°C para a realização análise da atividade da anidrase carbônica (CA).

Biomarcadores

Ensaio Cometa: O ECA foi realizado de acordo com Speit e Hartmann (1999), com ajustes segundo Ferraro *et al.* (2004) e Cestari *et al.* (2004). Para o HCA, as amostras foram mecanicamente homogeneizadas a 1.500 RPM (Ramsdorf *et al.*, 2009). Os passos seguintes foram realizados de acordo com Speit e Hartmann (1999). De cada peixe, 100 nucleoides por tecido foram analisados de acordo com a classificação visual baseada na migração dos fragmentos de DNA a partir do núcleo.

Os resultados foram categorizados em classes de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo) (Collins *et al.*, 1997).

Teste do micronúcleo píficeo: O MNT com coloração de laranja de acridina foi realizado de acordo com Çavas e Ergene-Gözükara (2005) com o intuito de determinar da frequência de micronúcleos, alterações morfológicas nucleares (MNA) (Carrasco *et al.*, 1990) e verificar o efeito do contaminante no processo de eritropoiese através da frequência de eritrócitos policromáticos (PCE).

Análises bioquímicas: As amostras de fígado foram descongeladas em gelo, pesadas e homogeneizadas na proporção 1:10 (m/V) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 com auxílio de micro-homogeneizador. O homogenato foi centrifugado durante 30 min a 15.000 rpm a 4°C, obtendo-se um sobrenadante do qual foram retiradas alíquotas para cada uma das análises. A atividade da SOD foi mensurada a 440 nm de acordo com Gao *et al.* (1998). A atividade da CAT foi mensurada a 240 nm segundo Aebi (1984). A atividade da GPx foi mensurada a 340 nm de acordo com Paglia e Valentine (1976). A análise da lipoperoxidação (LPO) foi realizada através da avaliação da concentração de hidroperóxidos de acordo com o proposto por Jiang *et al.* (1992). Para a realização da atividade da CA, os filamentos branquiais foram separados, pesados e sonificados durante 20 s (1 pulso/s) à amplitude de 50% em tampão específico para o teste (manitol (225 mM), sacarose (75 mM), Tris-fosfato (10 mM) e pH 7,4). O homogenato proveniente da sonicação foi centrifugado (13.500 rpm, 4 °C, 5 min) e então obtiveram-se alíquotas de sobrenadantes para a avaliação enzimática, a qual foi mensurada a 595 nm através do método de Vitale *et al.* (1999). Proteínas totais foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976) sob o comprimento de onda de 595 nm.

Análise química:

As análises químicas do Cu²⁺ na água dos aquários foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica (Varian®, AA 240Z), com atomização eletrotérmica em forno de grafite (modelo de GTA 120), equipado com corretor de fundo Zeeman e

amostrador automático (PSD modelo 120). Foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco de Cu e argônio como gás inerte a um fluxo de $0,3 \text{ L min}^{-1}$ com pirólise a 1.400°C e atomização a 2.600°C . A recuperação foi avaliada pela fortificação de amostras com solução estoque (Qhemis High Purity®) de 1.000 mg L^{-1} em 5 repetições de 3 concentrações diluídas (10 ; 25 e $60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). Os resultados foram expressos como a média de Cu^{2+} presente na água.

Desenho experimental - Malathion

O malathion (CAS nº 121-75-5) comercial foi comprado em uma floricultura de Curitiba-PR (Malatol 500CE líquido – 10ml, 5% malathion) e diluído em água destilada a uma concentração de 1 g L^{-1} . A partir dessa solução mãe, as diluições foram feitas nos aquários nas concentrações de 100 , 150 e $225 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. De acordo com o CONAMA 357/2005, $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ é a concentração máxima de malathion permitida para águas de classe III. Os demais tratamentos foram determinados na grandeza de 1,5 para cima da concentração inicial.

Os peixes foram aclimatados por 30 dias no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná em tanques de 500 L de água filtrada com aeração constante, temperatura média de 22°C e alimentados diariamente com ração comercial. Foi realizado experimento do tipo replicado sendo que, um dia antes do início da exposição ao malathion, 40 peixes foram transferidos para 40 aquários (1 peixe por aquário) de 24 L com condições similares aos tanques. Dez aquários foram destinados aos grupos controle negativo (NC) e os outros trinta aos grupos expostos às concentrações de 100 , 150 e $225 \text{ } \mu\text{g/L}$ (dez para cada tratamento, T1, T2 e T3, respectivamente). Ainda 12 aquários brancos (sem peixes, apenas com o contaminante) foram montados nas mesmas condições dos demais para se observar a estabilidade do malathion na água dos aquários ao longo do experimento.

Os peixes foram submetidos à contaminação hídrica com malathion em sistema estático por um período de 96 horas. Ao longo das 96h, cinco amostras de água (2 mL) foram retiradas de quatro aquários para cada grupo e armazenadas a -20°C de modo a verificar a quantidade de malathion remanescente na água. Os tempos de coleta de água foram t_0 (0h, logo após a contaminação), t_1 (24h após a contaminação), t_2 (48h

após a contaminação), t3 (72h após a contaminação) e t4 (96h após a contaminação). Após esse período, os espécimes tiveram uma amostra de sangue coletada por punção cardíaca com o auxílio de um microcapilar. Uma gota do sangue foi transferida a um microtubo contendo 500 µL de soro bovino fetal (SBF) para realização do ECA enquanto que com uma segunda gota foi realizado um esfregaço em lâmina para realização do teste do micronúcleo písceo.

Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por secção medular, medidos, pesados e tiveram o fígado, as brânquias, uma porção da musculatura epaxial e o cérebro retirados para análises. O fígado foi retirado inteiro e colocado em uma placa de petri. Duas pequenas amostras do órgão foram separadas com o auxílio de um bisturi e colocadas em: (1) microtubo contendo 250 µL de SBF para realização do HCA e (2) em *casset* e fixada em ALFAC para realização da análise histopatológica. A parte restante foi colocada em um microtubo e armazenada a -80°C para a realização da LPO, EROD e GST. Uma porção da musculatura epaxial e o cérebro foram retirados, colocados em microtubos e armazenados a -80°C para a realização da AChE.

Biomarcadores

O ensaio cometa e o teste do micronúcleo písceo foram realizados de acordo com as metodologias já descritas no bioensaio anterior.

Análises bioquímicas: As amostras de fígado foram descongeladas em gelo, pesadas e homogeneizadas na proporção 1:10 (m/V) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 com auxílio de micro-homogeneizador. O homogenato foi centrifugado durante 30 min a 15.000 rpm a 4°C, obtendo-se um sobrenadante do qual foram retiradas alíquotas para cada uma das análises. A análise da lipoperoxidação (LPO) foi realizada através da avaliação da concentração de hidroperóxidos de acordo com Jiang *et al.* (1992). A análise da EROD foi realizada segundo o método de Burke e Mayer (1974). A Atividade da GST foi mensurada a 340 nm (Keen *et al.*, 1976). A atividade da AChE muscular e cerebral foi medida a 415 nm pelo método de Ellman *et al.* (1961) modificado para

microplaca por Silva de Assis (1998). Proteínas totais foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976) sob o comprimento de onda de 595 nm.

Histopatologia: Um pequena porção do fígado foi retirada e fixada em ALFAC para posterior montagem de lâminas coradas com hematoxilina-eosina e análise ao microscópio de luz. O índice de lesões utilizado na avaliação do material foi descrito por Bernet *et al.* (1999)

Análise química

O perfil cinético do malathion na água foi determinado através da espectrometria de massas, em equipamento Varian 320MS, com infusão direta a $50 \mu\text{L min}^{-1}$. A câmara foi mantida a 45°C , sob pressão de N_2 40 psi e gás de secagem a 200°C . A voltagem na câmara foi de 4.000 V e detector em 1.200 V. A curva padrão foi elaborada com padrão analítico de malathion (Sigma-Aldrich) em intervalo de concentração entre 25 a $400 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados foram descritivamente expressos como média \pm desvio padrão.

Análise estatística

Os dados dos biomarcadores foram verificados quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov), homocedasticidade (Bartlett) e presença de outliers (Grubbs). Dados paramétricos foram relatados como média \pm desvio padrão e foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey com um nível de significância de 0,05. Dados não paramétricos foram relatados como mediana \pm mínimo e máximo e foi realizado Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn com um nível de significância de 0,05.

Para cada espécie, baseando-se nos valores médios dos biomarcadores, foi construída uma matriz de similaridade (índice de Bray-Curtis) para, então, realizar a análise de agrupamentos (ligação simples), de modo a obter a similaridade total entre as respostas dos biomarcadores para as diferentes espécies.

Resultados

Cobre

A tabela 1 mostra os resultados referentes à morfometria (peso e comprimento total) e aos parâmetros físico-químicos (temperatura e pH) dos bioensaios do Cu com as três espécies.

Tabela 1: Morfometria e parâmetros físico-químicos dos bioensaios do Cu

Espécie	Peso (g)	Comprimento total (cm)	T (°C)	pH
<i>A. altiparanae</i>	5,85 ± 1,75	8,1 ± 0,72	23,16 ± 0,26	7,53 ± 0,04
<i>A. bifasciatus</i>	6,23 ± 1,03	8,51 ± 0,46	23,06 ± 0,04	7,56 ± 0,09
<i>A. ribeirae</i>	30,46 ± 5,03	12,98 ± 0,53	23,26 ± 0,09	7,63 ± 0,04

Primeiramente, as análises químicas da água dos bioensaios mostraram que, na ausência de peixes no aquário, a concentração de Cu inicialmente inserida permanece constante ao longo das 96h de experimento (Fig. 1A, 1B e 1C - triângulos). Pelas mesmas figuras também se nota que as concentrações encontradas na água dos aquários ($11,37 \pm 4,75 \mu\text{g L}^{-1}$, $30,82 \pm 11,39 \mu\text{g L}^{-1}$ e $62,54 \pm 5,49 \mu\text{g L}^{-1}$) foram próximas às concentrações nominais propostas no estudo ($13, 26$ e $52 \mu\text{g L}^{-1}$).

Quanto aos aquários com peixes, percebe-se que há um rápido decréscimo da concentração inicial de Cu^{2+} já nos primeiros minutos após a aplicação do contaminante. Esse fato ocorreu para as três espécies e foi mais bem observado nas concentrações intermediárias (Fig. 1B) e maior (Fig. 1C). Após esse primeiro decréscimo, a concentração de Cu^{2+} na água do aquário permanece constante até o final do experimento para as três espécies.

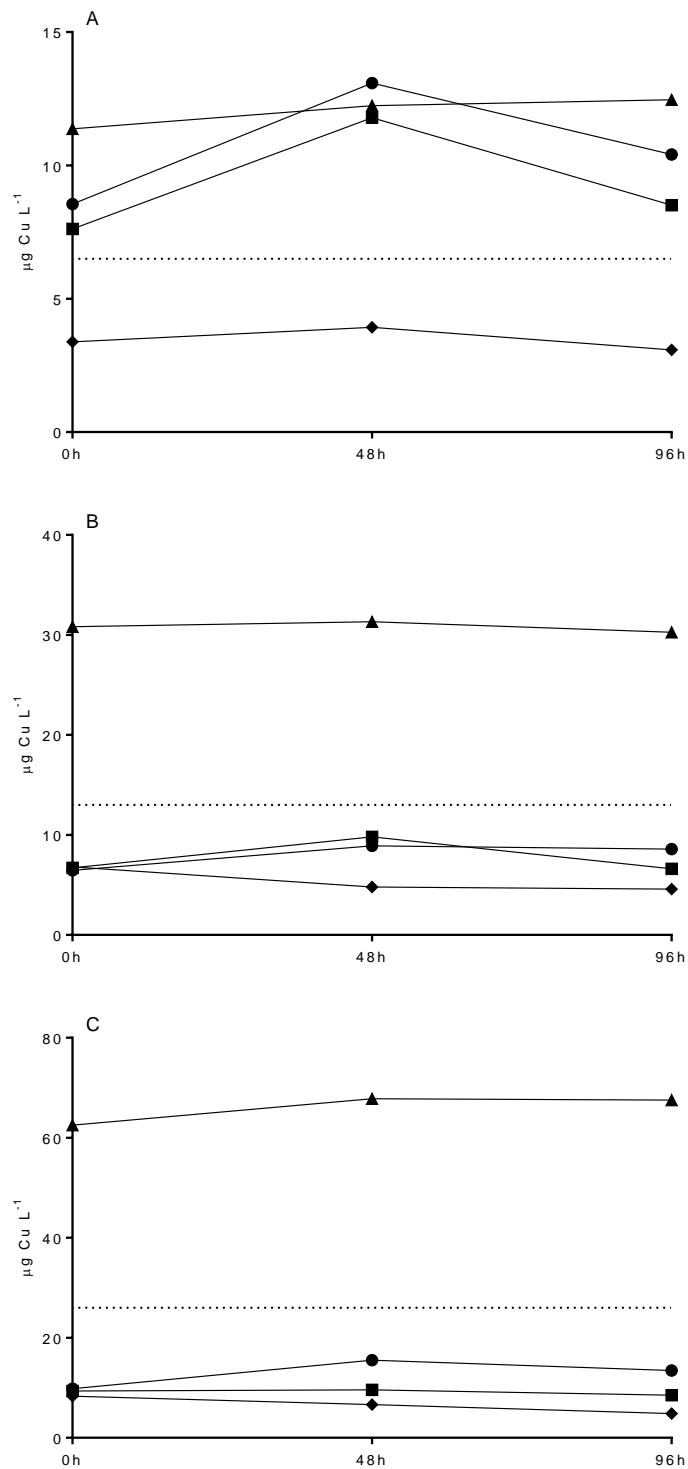


Fig. 1: Gráfico representando o perfil cinético do Cu²⁺ na água dos aquários ao longo das 96h de experimento. A- 13 µg L⁻¹; B- 26 µg L⁻¹; C- 52 µg L⁻¹. Cada ponto representa apenas a média da concentração de Cu²⁺ observada em seu respectivo tempo. ▲ aquários brancos; ■ *A. altiparanae*; ● *A. bifasciatus*; ◆ *A. ribeirae*. A linha pontilhada é referente à metade da concentração nominal inicial.

Com relação à atividade da SOD (Fig. 2A), CAT (Fig. 2B) e GPx (Fig. 2C), não houve diferenças significativas para nenhuma das espécies de *Astyanax* dos grupos tratados (13, 26 e 52 $\mu\text{g L}^{-1}$; T1, T2 e T3, respectivamente) quando comparados aos grupos controle negativo (NC). A atividade da CA (Fig. 2D), por sua vez, foi inibida em *A. ribeiria* exposto à 26 e 52 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu quando comparado ao grupo NC.

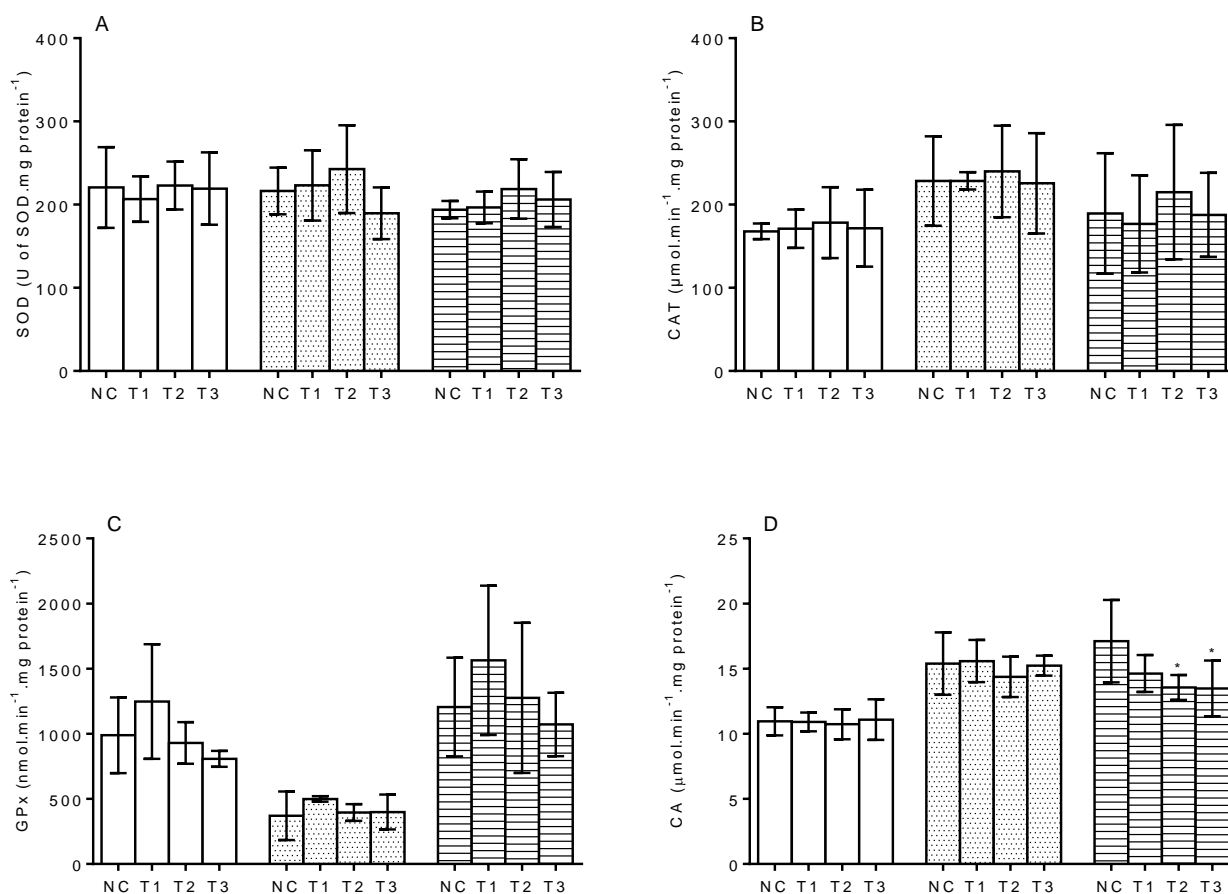


Fig. 2: A- Atividade da SOD; B- Atividade da CAT; C- Atividade da GPx; D- Atividade da CA. Cada grupo de histograma representa uma espécie de *Astyanax*: Brancos- *A. altiparanae*; Pontilhados- *A. bifasciatus*; Linhas- *A. ribeiria*. * Grupos estatisticamente diferentes do grupo NC, $p < 0,05$.

Com relação às macromoléculas analisadas neste estudo, a concentração de hidroperóxidos (LPO) (Fig. 3A) apresentou-se aumentada no grupo T2 de *A. altiparanae* em relação ao grupo NC e diminuída no grupo T2 de *A. ribeiria* em relação ao grupo NC. O ECA (Fig. 3B) não apresentou diferenças significativas para nenhuma das espécies enquanto que os hepatócitos de *A. bifasciatus* e *A. ribeiria* submetidos a

maior concentração apresentaram maior dano genético em relação àqueles dos grupos controle (Fig. 3C). Ainda com relação às análises genéticas, como não houve diferenças significativas para a frequência de alterações morfológicas nucleares (MNA) e nem para a frequência de eritrócitos policromáticos (PCE) de nenhuma das espécies estudadas, os gráficos não foram representados.

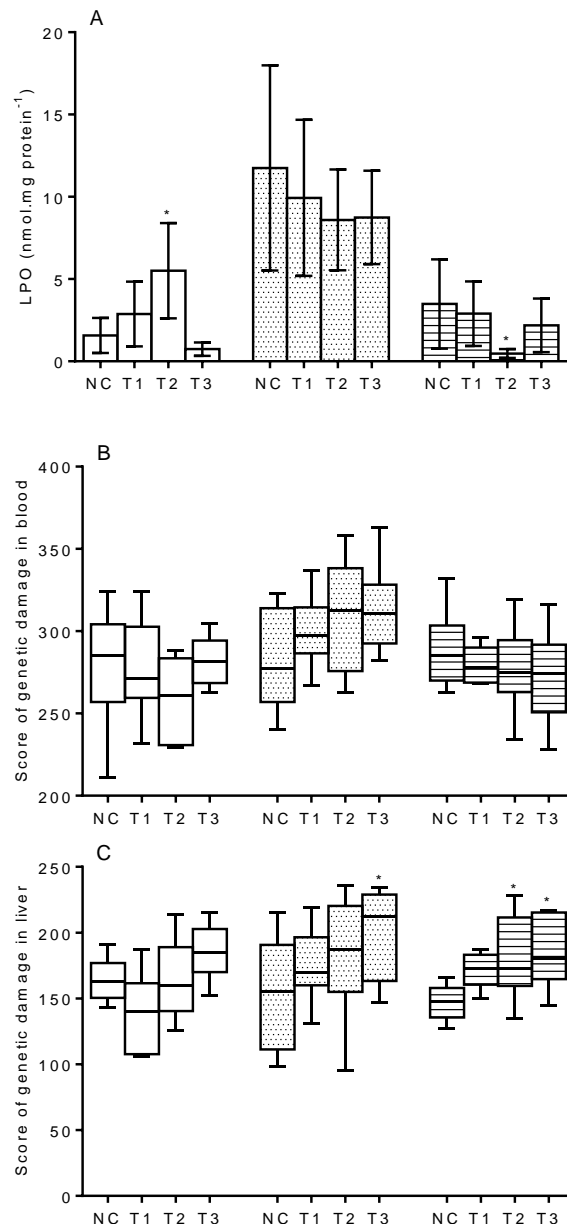


Fig. 3: A- Concentração de hidroperóxidos; B- Escore do ECA; C- Escore do HCA. Cada grupo de boxplot e histograma representa uma espécie de *Astyanax*: Brancos- *A. altiparanae*; Pontilhados- *A. bifasciatus*; Linhas- *A. ribeirae*. * Grupos estatisticamente diferentes do grupo NC, p<0,05.

Malathion

A tabela 2 mostra os resultados referentes à morfometria (peso e comprimento total) e aos parâmetros físico-químicos (temperatura e pH) dos bioensaios do malathion com as três espécies.

Tabela 2: Morfometria e parâmetros físico-químicos dos bioensaios do malathion

Espécie	Peso (g)	Comprimento total (cm)	T (°C)	pH
<i>A. altiparanae</i>	7,22 ± 3,59	8,10 ± 1,14	24,30 ± 0,22	7,56 ± 0,04
<i>A. bifasciatus</i>	5,82 ± 1,27	8,49 ± 0,53	23,33 ± 0,25	7,75 ± 0,05
<i>A. ribeirae</i>	30,38 ± 5,47	13,03 ± 0,49	23,32 ± 0,85	7,83 ± 0,09

As análises químicas da água dos bioensaios com malathion mostraram que, primeiramente, na ausência de peixes no aquário, a concentração inicial de malathion permanece constante ao longo das 96h de experimento (Fig. 4A, 4B e 4C- triângulos). Pelas mesmas três figuras também se nota que as concentrações encontradas na água dos aquários ($111,3 \pm 5,9 \mu\text{g L}^{-1}$, $157,1 \pm 6,9 \mu\text{g L}^{-1}$ e $208,4 \pm 10,1 \mu\text{g L}^{-1}$) estão próximas às concentrações nominais propostas no estudo (100, 150 e $225 \mu\text{g L}^{-1}$).

Quanto aos aquários com peixes, percebe-se que há um decréscimo gradual na concentração inicial de malathion ao longo das 96h de experimento, sendo que a concentração inicial de malathion cai próximo à metade entre 24h e 48h. As três espécies apresentaram padrões bastante semelhantes para o decréscimo desse contaminante durante o experimento.

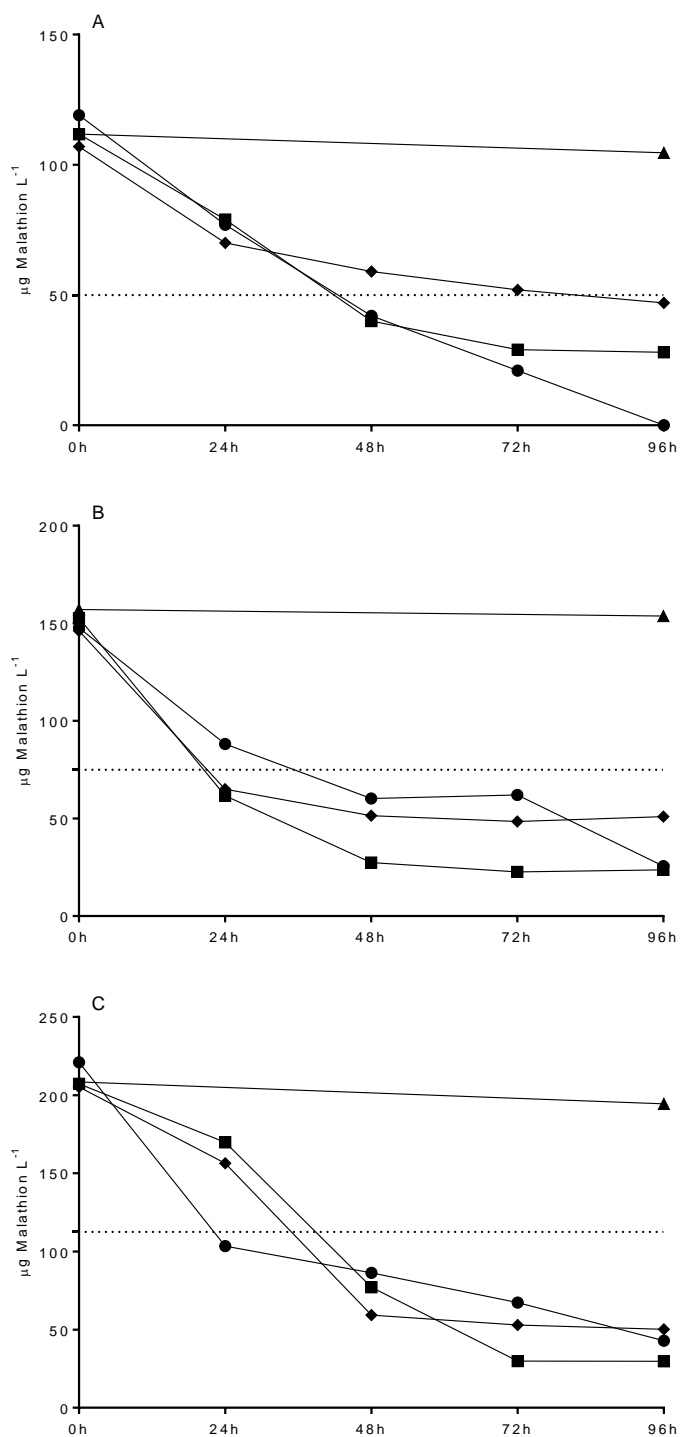


Fig. 4: Gráfico representando o perfil cinético do malathion na água dos aquários ao longo das 96h de experimento. A- $100 \mu\text{g L}^{-1}$; B- $150 \mu\text{g L}^{-1}$; C- $225 \mu\text{g L}^{-1}$. Cada ponto representa apenas a média da concentração de malathion observada em seu respectivo tempo. ▲ aquários brancos; ■ *A. altiparanae*; ● *A. bifasciatus*; ◆ *A. ribeirae*. A linha pontilhada é referente à metade da concentração nominal inicial.

Com relação aos biomarcadores de biotransformação, a atividade da EROD (Fig. 5A) apresentou-se elevada nos *A. altiparanae* submetidos a 225 $\mu\text{g L}^{-1}$ (T3) de malathion em comparação ao controle e em *A. ribeirae* exposto a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ (T2) em comparação ao controle. A atividade da GST (Fig. 5B), por sua vez, foi reduzida em *A. altiparanae* expostos a todas as concentrações de malathion e aumentada em *A. bifasciatus* expostos à concentração intermediária deste composto.

A atividade da AChE apresentou-se alterada apenas no músculo de *A. bifasciatus* (Fig. 5C), sendo que estava inibida na menor (100 $\mu\text{g L}^{-1}$, T1) e na maior (225 $\mu\text{g L}^{-1}$, T3) concentração do organofosforado.

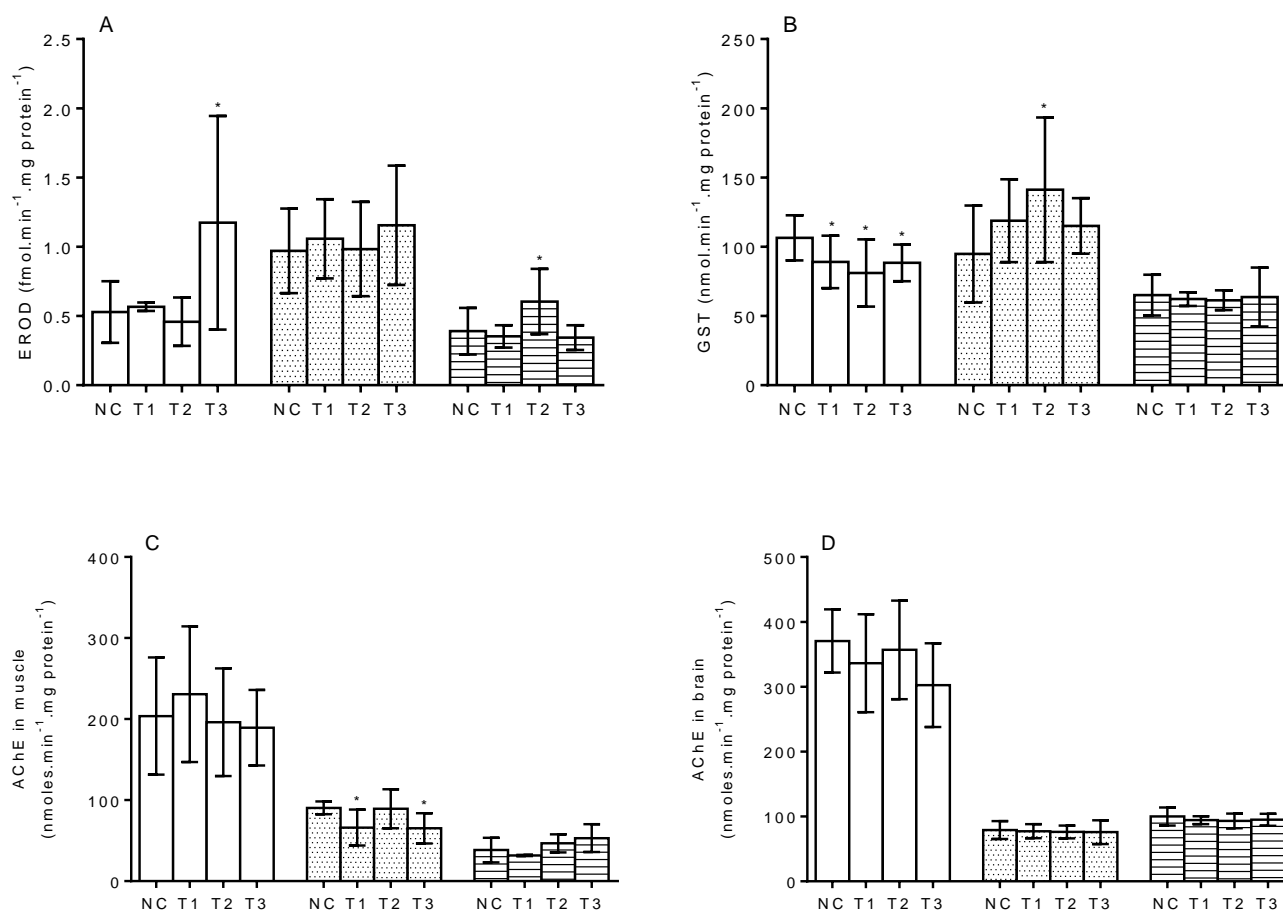


Fig. 5: A- Atividade da EROD; B- Atividade da GST; C- Atividade da AChE muscular; D- Atividade da AChE cerebral. Cada grupo de histograma representa uma espécie de *Astyanax*: Brancos- *A. altiparanae*; Pontilhados- *A. bifasciatus*; Linhas- *A. ribeirae*. * Grupos estatisticamente diferentes do grupo NC, $p < 0,05$.

A análise histopatológica por meio do índice de Bernet não apresentou diferença alguma entre nenhum dos grupos para nenhuma das espécies e, portanto, o gráfico não foi representado. Apesar de o teste estatístico não ter revelado diferenças, as lesões são danos que estão presentes e podem prejudicar o correto funcionamento do órgão, portanto essas alterações foram descritivamente representadas de acordo com o número de observações por indivíduo na Tabela 3.

Com relação às macromoléculas analisadas neste bioensaio, a LPO (Fig. 6A) apresentou-se diminuída em todos os grupos expostos de *A. bifasciatus* em relação ao grupo NC e aumentada no grupo T3 de *A. ribeirae* em relação ao grupo NC. O ECA (Fig. 6B) não apresentou diferenças significativas para nenhuma das espécies enquanto que os hepatócitos de *A. altiparanae* e *A. ribeirae* submetidos à maior concentração apresentaram maior dano genético em relação àqueles dos grupos controle (Fig. 6C). Ainda com relação às análises genéticas, não houve diferenças significativas para a frequência de alterações morfológicas nucleares (MNA) e nem para a frequência de eritrócitos policromáticos (PCE) de nenhuma das espécies estudadas, portanto os gráficos não foram mostrados.

Tabela 3. Alterações histopatológicas observadas em fígado de *Astyanax sp*, os números da tabela representam a quantidade de indivíduos encontrados em cada grupo com a lesão descrita. O número entre parênteses ao lado do nome de cada espécie representa o total de indivíduos analisados em cada grupo.

Alteração	<i>A. altiparanae</i> (10)				<i>A. bifasciatus</i> (10)				<i>A. ribeirae</i> (10)			
	NC	T1	T2	T3	NC	T1	T2	T3	NC	T1	T2	T3
Necrose	1	4	5	4	1	2	5	6	2	4	6	5
Inf. Leuco.	4	2	3	3	3	2	2	2	3	3	5	4
Vacuol.	0	2	2	2	2	0	2	0	0	2	4	3
Granulo.	0	2	2	2	0	1	0	0	0	3	3	2
Congest.	1	0	0	3	2	3	1	1	2	1	3	2

Inf. Leuco.- infiltração leucocitária; Vacuol.- vacuolização; Granulo.- granulomas; Congest.- congestão

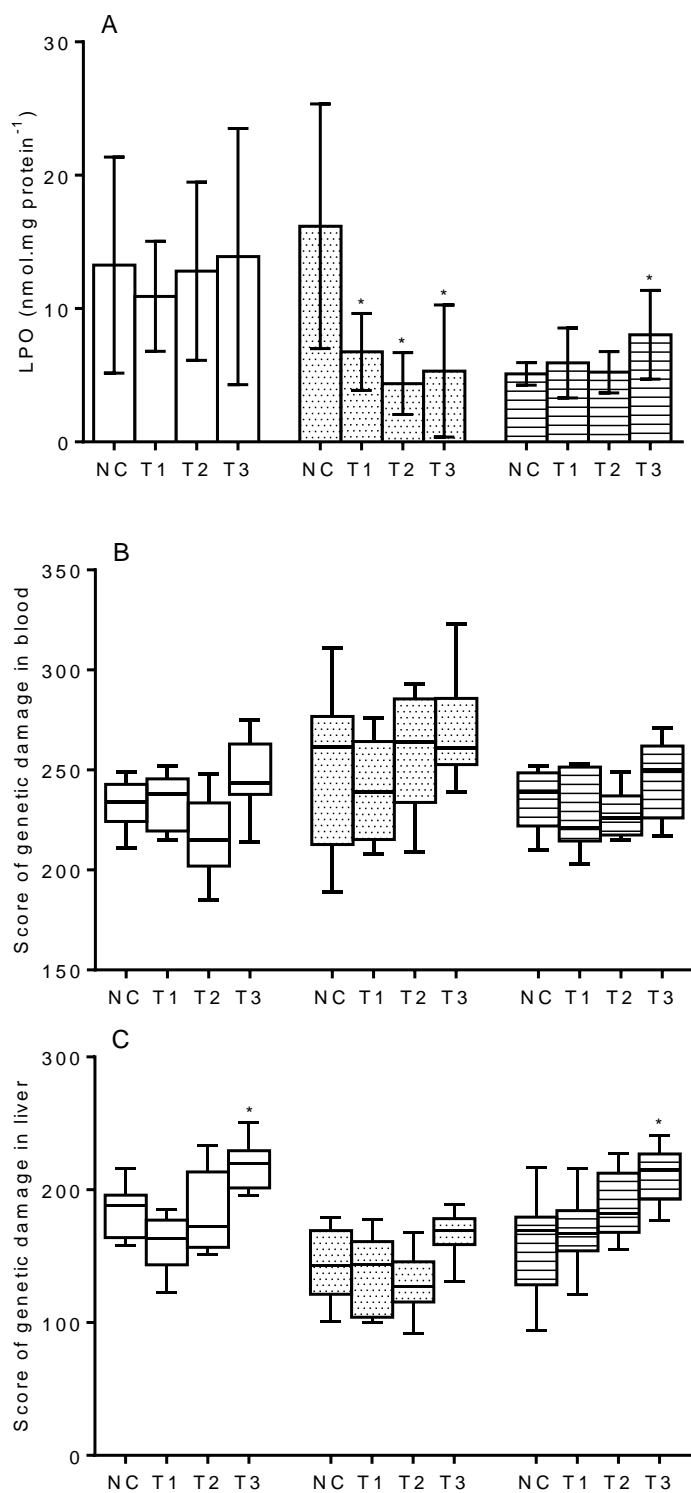


Fig. 6: A- Concentração de hidroperóxidos; B- Escore do ECA; C- Escore do HCA. Cada grupo de histograma e boxplot representa uma espécie de *Astyanax*: Brancos- *A. altiparanae*; Pontilhados- *A. bifasciatus*; Linhas- *A. ribeirae*. * Grupos estatisticamente diferentes do grupo NC, $p < 0,05$.

A análise de agrupamentos (Fig. 7) foi realizada utilizando a média dos biomarcadores como amostras e as espécies como variáveis. Para os dois bioensaios (Cu e malathion) foi feita a média entre as respostas dos biomarcadores, revelando, assim, a similaridade ecotoxicológica total entre as três espécies.

A análise revelou que, de maneira integrada, *A. bifasciatus* é a espécie ecotoxicologicamente mais distinta entre as estudadas, apresentando uma similaridade total de cerca de 73% com as outras duas. *A. altiparanae* e *A. ribeirae*, por sua vez, apresentam uma semelhança ecotoxicológica próxima de 84%.

O coeficiente de correlação cofenético é a correlação linear de Pearson entre os elementos da matriz de similaridade e os elementos da matriz cofenética, e é utilizado para avaliar a consistência do padrão de agrupamento, sendo que valores próximos a um indicam melhor representação, nesse agrupamento o coeficiente encontrado foi de 0,9995.

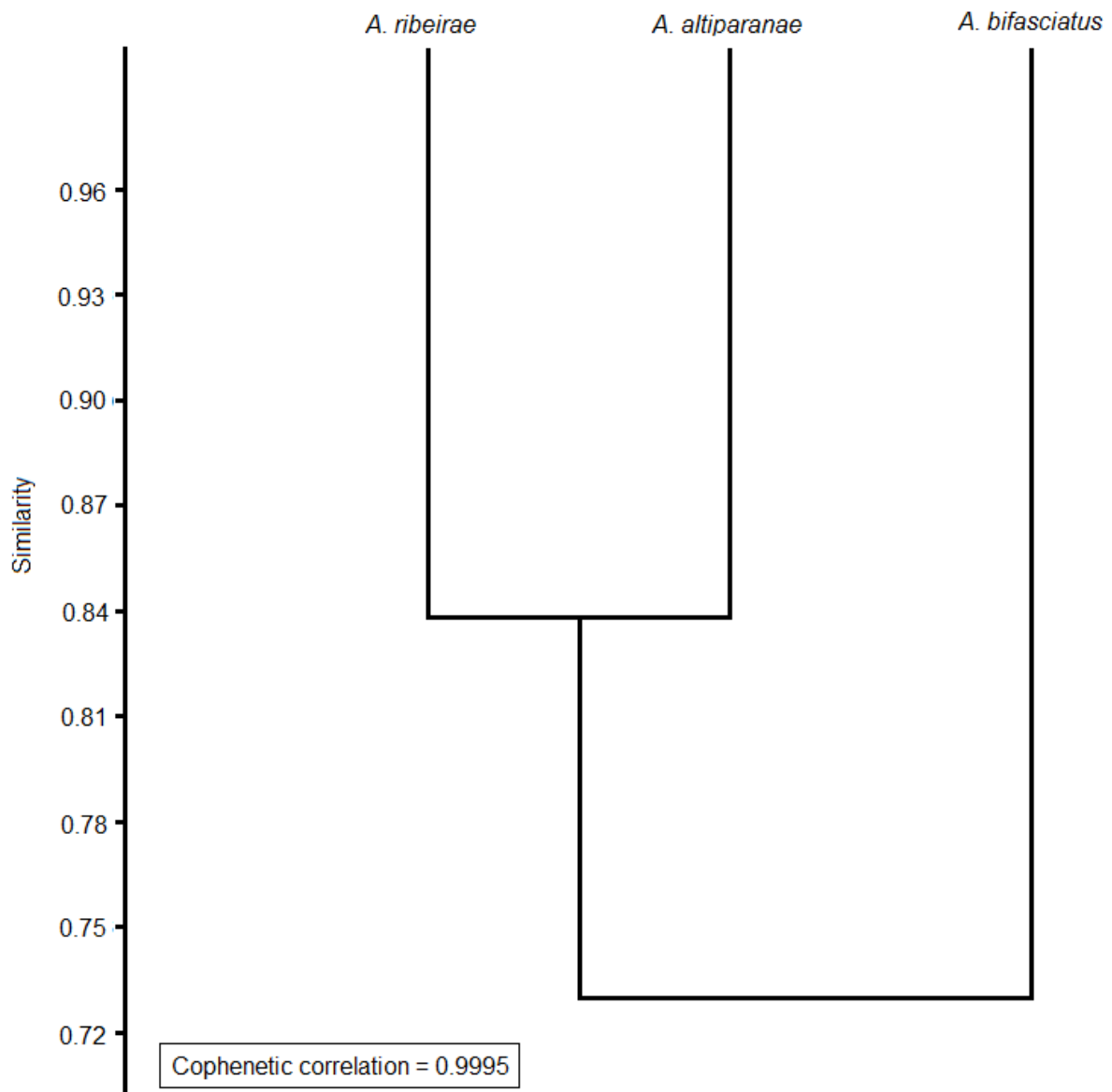


Fig 7. Análise de agrupamento das espécies de *Astyanax* estudadas baseadas em uma matriz de similaridade de Bray-Curtis calculada através da média das respostas dos biomarcadores dos bioensaios e do campo.

Discussão

De maneira geral, através dos resultados obtidos, parece que as espécies de *Astyanax* estudadas são sensíveis tanto à contaminação do Cu quanto à do malathion nas condições experimentais deste trabalho.

Apesar de os sistemas enzimáticos, que eram esperados que agissem para cada um dos contaminantes, *i.e.* o sistema antioxidante representado pela SOD, CAT e GPx no caso do Cu e a biotransformação representada pela EROD e GST no caso do malathion, não terem sido induzidos ou não agirem de maneira clara, podemos supor tal sensibilidade devido aos danos e influências que ambos os xenobióticos causaram sobre as macromoléculas dos peixes. O impacto que os contaminantes causam sobre as espécies ganha ainda mais suporte quando observamos as análises químicas para cada um dos compostos.

Em pequenas concentrações o Cu é um metal essencial à vida e, devido à sua ampla utilização na agricultura e tratamento de água, esse metal possui uma ocorrência ubíqua em solos e corpos hídricos. Dessa forma, diversos estudos com uma multiplicidade de organismos têm sido realizados de modo a compreender os seus efeitos biológicos e químicos (Schlenk *et al.*, 1999).

O Cu vem em várias formas que podem ser utilizadas em água, sendo que a forma mais barata e mais comumente utilizada é o sulfato de cobre (Watson e Yanong, 2014). Neste estudo, os peixes foram expostos ao Cu através do sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Essa é a principal molécula empregada na aquicultura, sendo utilizada no controle de diversas algas, ectoparasitas e infecções bacterianas (Boone *et al.*, 2012).

Quando o sulfato de cobre é dissolvido em água, ele se divide em íons cúpricos (Cu^{2+}) e sulfato (SO_4^{2-}). Uma vez que são os parâmetros físico-químicos da água, *e.g.* pH, e outros fatores ambientais que determinam o quanto de Cu estará biologicamente disponível e por quanto tempo, o Cu^{2+} é o íon que, permanecendo em solução, deve ser medido (Yanong, 2013).

Em águas não contaminadas, os peixes obtêm a maior parte do requisito de Cu pela alimentação e, conseqüentemente, a absorção pelas brânquias é provavelmente

uma menor contribuição para todo o conteúdo de Cu no corpo (Campbell *et al.*, 1999). No entanto, a situação é muito diferente em águas contaminadas.

Brânquias de truta arco-íris mostraram um aumento de 10 vezes na acumulação de Cu em apenas algumas horas após exposição hídrica, e isso ocorre simultaneamente com o aparecimento de Cu no sangue (Handy, 1992; Grosell *et al.*, 1997). Outros estudos *in vivo* determinaram a acumulação de Cu pelas brânquias a valores de cerca de 1 a 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ de filamento branquial⁻¹ h⁻¹ (Grosell *et al.*, 1997, 1998).

No presente estudo, já nos primeiros minutos após a exposição inicial, a concentração do Cu na água sofreu uma grande diminuição nos aquários com peixes. Em pH acima de 6,0 o Cu²⁺ pode ser reduzido a Cu⁺ que, por sua vez, pode ser precipitado junto a carbonatos, e.g. na forma de CuCO₃, e/ou à matéria orgânica. Provavelmente o decréscimo observado ocorre devido a essa complexação, contudo pode-se dizer que houve acumulação desse metal nos peixes uma vez que houve danos biológicos relacionados ao Cu²⁺.

Uma das ações mais bem conhecidas sobre os efeitos agudos iniciais do excesso de Cu na água é a inibição de mecanismos osmorregulatórios em peixes (Grosell *et al.*, 2002), principalmente da Na⁺/K⁺ATPase e da anidrase carbônica, o que afeta todo o teor de sódio e cloreto corpóreo (Hedayati *et al.*, 2016). Posteriormente, o Cu pode interferir em diversas vias metabólicas e, assim, induzir diferentes respostas celulares através de processos oxidativos pela formação de ROS, tais como a OH[•], via reação tipo Fenton. Esses processos promovem, dentre outros efeitos, a peroxidação dos lipídios das membranas (Barrera, 2012) e alterações do DNA (Barzilai e Yamamoto, 2004).

Diversos trabalhos mostram que, para combater essas ROS e os danos às macromoléculas, os organismos ativam sistemas de defesas antioxidantes, dentre eles a SOD, CAT e GPx. *Pomatoschistus microps* expostos hidricamente durante 96h a concentrações de Cu que variaram de 25 a 1.600 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentaram, já nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, ativação da CAT e aumento da LPO. A atividade da SOD foi aumentada a partir de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a GPx a partir de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Vieira *et al.*, 2009). Em condições similares de bioensaios, Sanchez *et al.* (2014) também encontrou

ativação da SOD e CAT de *Gasterosteus aculeatus* em concentrações de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ enquanto que a GPx foi ativada somente a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Neste estudo não foi observada ativação das enzimas antioxidantes analisadas em nenhuma das espécies, contudo alguns resultados indicam que o Cu exerce sua função tóxica indireta através da produção de ROS, como sugerido em diversos estudos (Vutukuru *et al.*, 2006; Bopp *et al.*, 2008, Boone *et al.*, 2012).

A análise realizada no tecido branquial revelou que, para *A. ribeirae*, a atividade da anidrase carbônica foi inibida nos grupos expostos a 26 e 52 $\mu\text{g L}^{-1}$. Tal inibição, como discutida anteriormente, é condizente com uma exposição aguda ao Cu. Ainda, nessa mesma espécie e nesses mesmos tratamentos, houve um aumento do dano genético em hepatócitos.

A. altiparanae e *A. bifasciatus*, por sua vez, apresentaram apenas danos a macromoléculas, sendo que o primeiro obteve aumento na taxa de lipídios peroxidados quando expostos a 26 $\mu\text{g L}^{-1}$, e o segundo danos no DNA hepático quando expostos a 52 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu. Esses resultados sugerem que, nessas condições, outros sistemas antioxidantes estão ativados para combater a contaminação, haja vista que os efeitos oxidativos indiretos que esse metal causa através de ROS são evidentes para as três espécies.

Com relação ao malathion, de maneira geral, a concentração inicial caiu pela metade entre 24h e 48h para todas as espécies, permanecendo próximo a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todas as concentrações após as 96h de bioensaios. Padrões similares da cinética do malathion na água foram encontrados para *Cyprinus carpio* (Bender, 1969) e *Pseudorasbora parva* (Kanazawa, 1975). Semelhantemente ao Cu e apesar dos resultados indicarem o decréscimo do contaminante quando existem peixes nos aquários, não podemos dizer que toda a concentração foi acumulada pelos organismos, uma vez que não foram realizadas medições em tecidos biológicos.

Contudo, os resultados obtidos pelos biomarcadores indicam a provável presença do composto bem como os efeitos adversos que ele causa nos peixes. Para exercer a sua toxicidade, o malathion deve ser bioativado pelo sistema de biotransformação de fase I, tipicamente representado pela atividade da EROD, para o

metabólito tóxico malaoxon, o qual é responsável pela inibição irreversível da AChE. (Tsezos e Bell 1991, Bavcon *et al.*, 2003).

Porém, a degradação do malathion pelas carboxilesterases, bem como a conjugação desse composto pelos sistemas de biotransformação de fase II, como as GST, compete com a formação do malaoxon pelo CYP450, diminuindo a toxicidade do composto. No entanto, as impurezas em formulações comerciais são potentes inibidores dessas enzimas, o que permite um aumento da concentração de malaoxon nos organismos e, conseqüentemente, sua ação tóxica (Gervais *et al.*, 2009).

A. altiparanae apresentou o mecanismo de toxicidade descrito anteriormente. Apesar de o efeito neurotóxico do malathion não ter sido observado nessa espécie, foi possível notar a inibição da GST nas três concentrações bem como a ativação da EROD na maior concentração. Ainda na maior concentração, o tecido hepático apresentou elevado dano genético, incidência de necroses, vacuolizações e, principalmente, granulomas.

Granulomas são pequenos nódulos de caráter inflamatório formados especialmente por macrófagos que servem para isolar bactérias, fungos ou substâncias estranhas insolúveis que o organismo foi incapaz de expulsar (Boorman *et al.*, 1997). Como o estudo foi conduzido com uma formulação comercial de malathion com 5% de pureza, tais lesões sugerem a presença do efeito adverso causado pela formulação.

Em *A. bifasciatus* o efeito neurotóxico do malathion foi observado através da inibição da AChE muscular na menor e na maior concentração. A concentração intermediária, por sua vez, foi a única a não apresentar neurotoxicidade e também a única a ter uma ativação da GST. Ainda houve diminuição da LPO nas três concentrações. *A. ribeirae*, no entanto, apresentou somente danos aos lipídios e ao DNA de hepatócitos na concentração de $225 \mu\text{g L}^{-1}$, além das lesões histopatológicas descritas anteriormente.

Carassius auratus expostos a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de malathion apresentaram significativas alterações na atividade de enzimas antioxidantes bem como aumento da LPO no primeiro dia de exposição (Huculeci *et al.*, 2008) o que sugere o possível efeito oxidativo desta molécula. Assim sendo, tais resultados indicam que *A. bifasciatus* parece ser mais sensível à neurotoxicidade exercida pelo malathion, porém consegue

lidar de maneira mais adequada ao papel oxidativo do composto, diferentemente de *A. ribeirae*.

Em nenhum dos bioensaios realizados houve diferenças significativas entre a frequência de AMN e PCE, o que indica que, nas condições desses estudos, esses compostos não apresentam efeitos mutagênicos e eritropoiéticos para estas espécies.

De modo a compreender a relação ecotoxicológica interespecífica, foi realizada uma análise de agrupamentos, a qual mostrou elevada correlação e similaridade entre as três espécies estudadas. Mesmo *A. bifasciatus*, a mais diferente das três, apresentou cerca de 73% de semelhança com *A. altiparanae* e *A. ribeirae*.

Osório *et al.* (2013) realizaram, baseados em respostas de biomarcadores de *Geophagus brasiliensis*, uma análise de agrupamentos com o intuito de identificar áreas ecotoxicologicamente semelhantes dentro do rio Tubarão-SC. Através da análise, os autores puderam agrupar os pontos de coleta impactados por efluentes urbanos, elevando o teor da discussão à fonte impactante de cada ponto de coleta.

Freire *et al.* (2015), por sua vez, avaliou a qualidade da água do rio Iguaçu-PR utilizando *Astyanax spp.* como bioindicador. As análises referentes aos danos no DNA de eritrócitos, bem como as lesões histopatológicas no fígado dos organismos tiveram grande relação com os padrões enzimáticos do estudo, indicando que, apesar de o trabalho ter sido realizado com um número variado de espécies do gênero, a relevância ecotoxicológica alcançada foi satisfatória, mostrando a qualidade precária do rio em determinados pontos.

De forma correlata, a análise de agrupamentos realizada neste estudo sugere que, levando em conta os biomarcadores utilizados neste estudo e até certo grau, é possível a utilização dessas três espécies de maneira genérica em biomonitoramentos, facilitando a coleta de exemplares e diminuindo as pressões sobre populações específicas.

Dessa forma, a utilização do gênero de maneira integrada como um bioindicador de efeito, no sentido de monitorar a qualidade de determinado ambiente, parece adequada, uma vez que as três espécies são capazes de responder, com bastante sensibilidade e fidedignidade interespecífica, às alterações macromoleculares

causadas pelos xenobióticos e fixadas no organismo, na população e/ou na comunidade.

Contudo, estritamente do ponto de vista metabólico, sugerimos cautela na utilização do gênero como bioindicador até que outros estudos investiguem essa questão, haja vista que existem diferenças peculiares a cada uma das espécies.

Assim sendo, de modo a ter uma melhor compreensão de qual é o nível mínimo de similaridade interespecífico necessário para o agrupamento ecotoxicológico de espécies, sugerimos que outros trabalhos invistam nessa abordagem de modo a gerar um banco de dados do qual essa informação possa ser extraída e analisada.

Por fim, fica evidente que não é apenas a relação interespecífica de *Astyanax* que deve ser investigada, mas também de outros gêneros e famílias pois, somente assim, a ecotoxicologia será capaz de compreender de maneira apurada a complexa diversidade biológica e ambiental e, conseqüentemente, fornecer dados relevantes para o monitoramento, a conservação e as tomadas de decisões referentes ao meio ambiente.

Conclusão

Em geral, foi observado que, apesar de sofrerem lesões quantificáveis em macromoléculas e em tecidos específicos, cada uma das espécies de *Astyanax* estudadas parece ativar sistemas enzimáticos específicos para combater determinado xenobiótico.

No caso do Cu e dos sistemas de defesas antioxidantes, nenhuma das enzimas foi ativada para nenhuma das espécies, mesmo assim a natureza oxidativa do Cu através dos danos em macromoléculas foi observada nas três espécies. Para o malathion, a neurotoxicidade foi exercida apenas em músculo de *A. bifasciatus*, enquanto que os efeitos oxidativos desse composto sobre as macromoléculas puderam ser observados em todas as espécies estudadas.

Assim sendo, ressaltamos a importância de se utilizar macromoléculas como biomarcadores, pois elas indicam um dano já fixado no organismo, mesmo quando os sistemas enzimáticos estão inibidos ou não foram induzidos.

Também é importante ressaltar que os valores propostos pela legislação brasileira para águas de classe I e II parecem ser seguros para essas espécies e, portanto, sugerimos que bioensaios com outros organismos sejam realizados de modo a verificar a abrangência de tal legislação para este gênero.

A análise de agrupamentos é uma abordagem simples e bastante eficiente para integrar os dados das respostas dos organismos. Neste estudo foi possível compreender as relações ecotoxicológicas interespecíficas e sugerir, dentro de determinados limites relacionados aos biomarcadores utilizados neste estudo, que o gênero possa ser conjuntamente representado pelas três espécies em eventuais trabalhos de avaliação e monitoramento *in situ*, facilitando as coletas e diminuindo as pressões sobre populações específicas.

Por fim, para melhor compreender os padrões de respostas dos peixes desse gênero, encorajamos a continuidade de estudos nos mesmos moldes deste, visando utilizar outras espécies, bem como o desenvolvimento de novos projetos que busquem investigar diferentes sistemas enzimáticos do gênero *Astyanax*.

Referências

Aebi, H. Catalase in Vitro. *Method Enzymol*, 105:121–126, 1984.

Barrera, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol*, 2012:137289, 2012.

Barzilai, A.; Yamamoto, K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9):1109-1115, 2004.

Bavcon, M.; Trebse, P.; Zupancic-Kralj, L. Investigations of the determination and transformations of diazinon and malathion under environmental conditions using gas chromatography coupled with a flame ionisation detector. *Chemosphere*, 50:595–601, 2003.

Bender, M. E. Uptake and Retention of Malathion by the Carp. *Prog Fish Cult*, 31(3):155-159, 1969.

Bernet, D.; Schmidt, H.; Meier, W.; Burkhardt-Holm, P.; Wahli, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis*, 22:25-34, 1999.

Boone, C.; Gervais, J. A.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. 2012. Copper Sulfate Technical Fact Sheet; *National Pesticide Information Center*, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/cuso4tech.pdf>

Boorman, G. A.; Botts, S.; Bunton, T. E.; Fournie, J. W.; Harshbarger, J. C.; Hawkins, W. E.; Hinton, D. E.; Jokinen, M. P.; Okihira, M. S.; Wolfe, M. J. Diagnostic Criteria for Degenerative, Inflammatory, Proliferative Nonneoplastic and Neoplastic Liver Lesions in Medaka (*Oryzias latipes*): Consensus of a National Toxicology Program Pathology Working Group. *Toxicol Pathol*, 25(2):202-210, 1997.

Bopp, S. K.; Abicht, H. K.; Knauer, K. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquat Toxicol*, 86:197-204, 2008.

Bourret, V.; Couture, P.; Campbell, P. G. C.; Bernatchez, L. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. *Aquat Toxicol*, 86:76-90, 2008.

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

Burke, M. D.; Mayer, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos*, 2(6):583-588, 1974.

Campbell, H. A.; Handy, R. D.; Nimmo, M. Copper uptake kinetics across the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) measured using an improved isolated perfused head technique. *Aquat Toxicol*, 46:177–190, 1999.

Carrasco, K. R.; Tilbury, K. L.; Myers, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci*, 1990.

Cavaş, T.; Ergene-Gözükara, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environ Toxicol Phar*, 19(1):107–111, 2005.

Cestari, M. M.; Lemos, P. M. M.; Oliveira Ribeiro, C. A.; Alves Costa, J. R. M.; Pelletier, E.; Ferraro, M. V. M.; Mantovani, M. S.; Fenocchio, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genet Mol Biol*, 27(2):270–274, 2004.

Collins, A. R.; Dobson, V. L.; Dusinská, M.; Kennedy, G.; Stětina, R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*, 375(2):183–93, 1997.

Connon, R. E.; Geist, J.; Werner, I. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors*, 12:12741-12771, 2012.

Costa-Silva, D. G.; Nunes, M. E. M.; Wallau, G. L.; Martins, I. K.; Zemolin, A. P. P.; Cruz, L. C.; Rodrigues, N. R.; Lopes, A. R.; Posser, T.; Franco, J. L. Oxidative stress markers in fish (*Astyanax sp.* and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the Brazilian Pampa biome. *Environ Sci Pollut Res*, 22(20):15526-15535, 2015.

Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. J.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7:88–95, 1961.

Ferraro, M. V. M.; Fenocchio, A. S.; Mantovani, M. S.; Ribeiro, C. D. O.; Cestari, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the 89 fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genet Mol Biol*, 27(1):103–107, 2004.

Freire, C. A.; Souza-Bastos, L. R.; Chiesse, J.; Tincani, F. H.; Piancini, L. D. S.; Randi, M. A. F.; Prodocimo, V.; Cestari, M. M.; Silva de Assis, H. C.; Abilhoa, V.; Vitule, J. R. S.; Bastos, L. P.; Oliveira Ribeiro, C. A. A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. *Environ Sci Pollut Res*, 22(17):13263-13277, 2015.

Gao, R.; Yuan, Z.; Zhao, Z.; Gao, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectroch Bioener*, 45(1):41-45, 1998.

Garavello, J. C.; Sampaio, F. A. A. Five new species of genus *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) from Rio Iguaçú, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Braz J Biol*, 70(3):847-865, 2010.

Gervais, J. A.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. 2009. Malathion Technical Fact Sheet; *National Pesticide Information Center*, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/malatech.pdf>

Grosell, M. H.; Hogstrand, C.; Wood, C. M. Cu uptake and turnover in both Cu-acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, 38:257–276, 1997.

Grosell, M. H.; Hogstrand, C.; Wood, C. M. Renal Cu and Na excretion and hepatic Cu metabolism in both Cu acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, 40:275–291, 1998.

Grosell, M.; Wood, C. M. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J Exp Biol*, 205:1179-1188, 2002.

Gurgel, H. C. B. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. *Rev Bras Zoo*, 21(1):131-135, 2004.

Hamilton, P. B.; Cowx, I. G.; Oleksiak, M. F.; Griffiths, A. M.; Grahn, M.; Stevens, J. R.; Carvalho, G. R.; Nicol, E.; Tyler, C. R. Population-level consequences for wild fish exposed to sublethal concentrations of chemicals – a critical review. *Fish Fish*, doi: 10.1111/faf.12125, 2015.

Handy, R. D. The assessment of episodic metal pollution I: uses and limitations of tissue contaminant analysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after short waterborne exposure to cadmium or copper. *Arch Environ Contam Toxicol*, 22:74–81, 1992.

Hedayati, A.; Hoseini, S. M.; Hoseinifar, S. H. Response of plasma copper, ceruloplasmin, iron and ions in carp, *Cyprinus carpio* to waterborne copper ion and nanoparticle exposure. *Comp Biochem Phys C*, 179:87-93, 2016.

Huculeci, R.; Dinu, D.; Staicu, A. C.; Munteanu, M. C.; Costache, M.; Dinischiotu, A. Malathion-Induced Alteration of the Antioxidant Defence System in Kidney, Gill, and Intestine of *Carassius auratus gibelio*. *Environ Toxicol*, 24(6):523-530, 2008.

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. *Anal Biochem*, 202:384- 389, 1992.

Kanazawa, J. Uptake and Excretion of Organophosphorus and Carbamate Insecticides by Fresh Water Fish, Mutsugo, *Pseudorasbora parva*. *B Environ Contam Tox*, 14(3):346-352, 1975

Keen, J.H.; Habig, W.H.; Jakoby, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S- transferases. *J Biol Chem*, 251:6183-6188, 1976.

Kilkenny, C.; Browne, W. J.; Cuthill, I. C. Emerson, M.; Altman, D. G. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol*, 8(6):e1000412, doi:10.1371/journal.pbio.1000412

Klerks, P. L.; Xie, L.; Levinton, J. S. Quantitative genetics approaches to study evolutionary processes in ecotoxicology; a perspective from research on the evolution of resistance. *Ecotoxicology*, 20:513–523, 2011.

Kremen, C. Assessing the indicator properties of species assemblages for natural areas monitoring. *Ecol Appl*, 2(2):203-217, 1992.

Mallet, J. A species definition for the Modern Synthesis. *Trends Ecol Evol*, 10(7):294-299, 1995.

McElwee, J. J.; Schuster, E.; Blanc, E.; Piper, M. D.; Thomas, J. H.; Patel, D. S.; Selman, C.; Withers, D. J.; Thornton, J. M.; Partridge, L.; Gems, D. Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome Biol*, 8(7):R132, 2007.

Osório, F. H. T.; Silva, L. F. O.; Piancini, L. D. S.; Azevedo A. C. B.; Liebel, S.; Yamamoto, F. Y.; Philippi, V. P.; Oliveira, M. L. S.; Ortolani-Machado, C. F.; Filipak Neto, F.; Cestari, M. M.; Silva de Assis, H. C.; Oliveira Ribeiro, C. A. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environ Sci Pollut Res*, 21(15):9145-9160, 2013.

Paglia, D. E.; Valentine, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Transl Res*, 70(1):158-169, 1967.

Pezzementi, L.; Nachon, F.; Chatonnet, A. Evolution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the vertebrates: an atypical butyrylcholinesterase from the medaka *oryzias latipes*. *PLoS ONE*, 6(2): e17396, 2011.

Ramsdorf, W. A.; Vicari, T.; Almeida, M. I. M; Artoni, R. F.; Cestari, M. M. Handling of *Astyanax sp.* for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. *Environ Monit Assess*, 184(10):5841-5849, 2012.

Ramsdorf, W. A; Guimarães, F. D. S. F.; Ferraro, M. V. M.; Gabardo J.; Trindade Eda, S.; Cestari, M. M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for 95 analysis with both comet assay and flow cytometry. *Mutat Res*, 673(1):78–81, 2009.

Rossi, S. C.; Silva, M. D.; Piancini, L. D. S.; Oliveira Ribeiro, C. A.; Cestari, M. M.; Silva de Assis, H. C. Sublethal Effects of Waterborne Herbicides in Tropical Freshwater Fish. *Bull Environ Contam Toxicol*, 87:603-607, 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. *Environ Toxicol Pharmacol*, 19(1):177-183, 2014.

Schlenk, D.; Davis, K. B.; Griffin, B. R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. *Aquaculture*, 177:367-379, 1999.

Silva de Assis, H. C. *Der Einsatz Von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen*. Alemanha. Universidade Técnica de Berlim, 1998.

Silva, D. M.; Rossi, S. C.; Ghisi, N. C.; Oliveira Ribeiro, C. A.; Cestari, M. M.; Silva de Assis, H. C. Using Multibiomarker Approach as a Tool to Improve the Management Plan for a Private Reserve of Natural Heritage (RPPN). *Bull Environ Contam Toxicol*, 92:602-608, 2014.

Sites, J. W.; Marshall, J. C. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol Evol*, 18(9):462-470, 2003.

Speit, G.; Hartmann, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*, 113:203–12, 1999.

Tsezos, M.; Bell, J. P. A mechanistic study on the fate of malathion following interaction with microbial biomass. *Water Res*, 25(9):1039-1046, 1991.

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*, 76:1416-1427, 2009.

Vitale, A. M.; Monserrat, J. M.; Casthilo, P.; Rodriguez, E. M. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp Biochem Phys C*, 122(1):121- 129, 1999

Vutukuru, S. S.; Chintada, S.; Madhavi, K. R.; Rao, J. V.; Anjaneyulu, Y. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. *Fish Physiol Biochem*, 32:221-229, 2006.

Watson, C.; Yanong, R. P. E. Use of Copper in Freshwater Aquaculture and Farm Ponds. *Institute of Food and Agricultural Sciences*, 2014.

Wolf, H. D.; Blust, R.; Backeljau, T. The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutat Res*, 566:249–262, 2004.

Yanong, R. P. E. Use of Copper in Marine Aquaculture and Aquarium Systems. *Institute of Food and Agricultural Sciences*, 2013.

Zamocky, M.; Furtmüller, P. G.; Obinger, C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal*, 10(9):1527–1548, 2008.

Capítulo 3

Uma abordagem interespecífica para compreender a reprodutibilidade de dados ecotoxicológicos

An interspecific approach to comprehend the reproducibility of ecotoxicological data

Tincani, F. H.¹; Santos, G. S.¹; Azevedo, A. C. B.²; Marques, A. E. M. L.³; Pereira, L. S.⁴; Castellano, G. C.⁵; da Silva, T. A.⁶; Galvan, G. L.¹; Chimentão, F. G.²; Silva, C. P.⁷; Oliveira Ribeiro, C. A.²; Silva de Assis, H. C.³; ; Barbosa, R. V.⁶; Campos, S. X.; Ramsdorf, W. A.⁸; Cestari, M. M.^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação - UFPR

² Departamento de Biologia Celular - UFPR

³ Departamento de Genética - UFPR

⁴ Departamento de Farmacologia - UFPR

⁵ Departamento de Fisiologia - UFPR

⁶ Departamento de Química - UFPR

⁷ Departamento de Química - UEPG

⁸ Departamento de Química e Biologia - UTFPR

Abstract

One of the central pillars of ecology is the hierarchy of biological organization, which directly influences the sub-disciplines of the area, *i.e.*, population ecology, community ecology, etc., as well as how ecologists define research questions. Ecotoxicology studies the effects of chemicals from the molecular and cellular level to the ecosystem, focusing these studies on sensitive and well-known organisms. However, guidelines for the selection of species or appropriate groups are still scarce. This study sought to compare the patterns of ecotoxicological responses of three species of *Astyanax* (*A. altiparanae*, *A. bifasciatus* and *A. ribeirae*) studied both *in vivo* and *in situ*, in order to understand the reproducibility of ecotoxicological data. We found high interspecific similarities between the patterns of the biomarkers analyzed *in vivo* and *in situ*, showing that it is possible to achieve a significant degree of ecotoxicological reproducibility between the two types of studies. Due to this reproducibility we believe that ecotoxicology needs a shift of paradigm in respect to the understanding of the natural environment. Therefore, this was a rather simple and highly effective approach to integrate this complexity and to shed some light on how laboratory results may be reconciled with field data. This study exalts the need to generate knowledge in order to assist decision-making necessary for the monitoring and conservation of the natural environment, encouraging other works to invest in the proposed approach.

Keywords: Ecotoxicology, *Astyanax*, Biomarkers, Reproducibility.

Introdução

Um dos pilares centrais da ecologia é a hierarquia dos níveis de organização biológica, a qual influencia diretamente as subdisciplinas da área, *i.e.* ecologia populacional, ecologia de comunidades etc, bem como a forma como os ecólogos definem as questões de pesquisa (Martin, 2013). Quando confrontamos um problema de determinado nível de organização, a tendência natural é a de buscar um mecanismo explicativo no mesmo nível (Moore, 2002; Vighi e Villa, 2013). Formas diretas de abordagem dos níveis organizacionais levaram a *insights* importantes em seus respectivos campos. No entanto, o papel das escalas ecológicas tem deixado de ser apenas delineador de interesses de pesquisa para se tornar importante integrador de dados, fornecendo tanto compreensões básicas quanto previsões úteis sobre os ecossistemas (Martin, 2013).

Essas mudanças têm sido motivadas principalmente pela percepção de que padrões observados em uma escala podem ser resultantes de processos emergentes que ocorrem em escalas menores (Levin 1992; Martin, 2013). Outra razão para a mudança no papel do escalonamento é o de que, quando há mudanças de níveis menores para maiores, há também um aumento do tempo e dos custos necessários para a coleta de dados, *i.e.* geralmente é mais fácil colher dados sobre indivíduos do que sobre populações, e assim por diante (Martin *et al.*, 2013). Portanto, a disponibilidade de informações de qualidade em escalas maiores se torna mais rara, sendo necessário o desenvolvimento de teorias e métodos que utilizem dados de níveis inferiores para compreender e prever os padrões em níveis superiores.

A ecotoxicologia estuda os efeitos dos produtos químicos sobre os ecossistemas em diferentes níveis de organização biológica, desde o nível molecular e celular ao ecossistêmico (Connon *et al.*, 2012), sendo que algumas abordagens são bastante utilizadas para estudar essas relações. Por exemplo, estudos que avaliam se uma população exposta a determinados contaminantes tem resistência aumentada em relação a uma população controle, outros que estimam a hereditariedade da resistência de uma população ou, ainda, aqueles que investigam as respostas em experimentos laboratoriais controlados (Staton *et al.*, 2001; Klerks *et al.*, 2011).

Essas três abordagens fornecem informações valiosas a respeito da influência de contaminantes sobre a trajetória evolutiva das espécies. Contudo, todas as três possuem limitações inerentes à pesquisa, dentre elas, podemos citar a dificuldade em separar os vários componentes de variância genética e ambiental, as respostas dependentes das condições específicas de cada ensaio e das populações, a incapacidade de se obter condições naturais em laboratório, dentre outras (Coutellec e Barata, 2011; Klerks *et al.*, 2011).

O objetivo deste trabalho, portanto, é comparar os padrões de respostas ecotoxicológicas de três espécies de *Astyanax* estudadas *in vivo* com aquelas encontradas *in situ* de modo a apresentar as relações ecotoxicológicas entre essas espécies em diferentes condições ambientais e populacionais, com a finalidade de compreender a reprodutibilidade de dados ecotoxicológicos.

Material e Métodos

Desenho experimental

Peixes das espécies *A. altiparanae*, *A. bifasciatus* e *A. ribeirae* foram coletados em uma pequena lagoa (~1.300m², 25°36'17.8"S e 49°17'09.2"W) no Parque Ecológico Costa (Curitiba-PR) através de arrastos (rede de fio, malha 5mm). Os animais foram armazenados em sacolas plásticas preenchidas com água do local e oxigênio comprimido para o transporte ao Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental (CAMA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). As amostras de água para as análises de compostos orgânicos (2 mL) e de metais (40 mL) foram coletadas no local e transportadas refrigeradas ao mesmo laboratório, sendo que para as análises de compostos orgânicos foram congeladas a -20°C e para as análises de metais foram acidificadas a pH 2 com HNO₃ (10%) e armazenadas a 4°C.

Ao chegar no laboratório, 20 peixes de cada espécie tiveram uma amostra de sangue coletada por punção cardíaca com o auxílio de um microcapilar. Uma gota do sangue foi transferida a um microtubo contendo 500 µL de soro bovino fetal (SBF) para a realização do ensaio cometa em eritrócitos (ECA) enquanto que com uma segunda

gota foi realizado um esfregaço em lâmina para a realização do teste do micronúcleo písceo (MNT).

Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por secção medular, medidos, pesados e tiveram o fígado, as brânquias, uma porção da musculatura epaxial e o cérebro retirados e acondicionados para diversas análises. O fígado foi retirado e colocado em uma placa de petri. Duas pequenas amostras do órgão foram separadas com o auxílio de um bisturi e colocadas em: (1) microtubo contendo 250 µL de SBF para a realização do ensaio cometa com hepatócitos (HCA) e (2) em casset e fixada em ALFAC para a realização da análise histopatológica. A parte restante foi colocada em um microtubo e armazenada a -80°C para a realização da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), lipoperoxidação (LPO), etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e glutathione S-transferase (GST). As brânquias foram retiradas, colocadas em microtubos e armazenadas a -80°C para a realização da anidrase carbônica (CA). Uma porção da musculatura epaxial e o cérebro foram retirados, colocados em microtubos e armazenados a -80°C para a verificação da acetilcolinesterase (AChE).

Os resultados obtidos dos peixes do Parque Costa foram comparados com peixes adquiridos de comerciantes locais para a realização de grupos controles negativo. *A. altiparanae* foram adquiridos da Piscicultura Alevinos Curitiba (Curitiba-PR), *A. bifasciatus* foram adquiridos do Pesqueiro Água da Serra (Quatro Barras-PR) e *A. ribeirae* foram adquiridos da Santpar – Produtos Coloniais (Garuva-SC) para a realização dos bioensaios. Esses peixes foram aclimatados por 30 dias no Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental (CAMA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em tanques de 2000 L de água filtrada com aeração constante, temperatura média de 22°C e alimentados diariamente até o dia de sacrifício (30º dia). Os mesmos procedimentos descritos anteriormente foram realizados para a remoção dos órgãos e biomarcadores analisados.

Biomarcadores

Ensaio Cometa: O ECA foi realizado de acordo com Speit e Hartmann (1999), com ajustes segundo Ferraro *et al.* (2004) e Cestari *et al.* (2004). Para o HCA, as amostras foram mecanicamente homogeneizadas a 1.500 RPM (Ramsdorf *et al.*, 2009). 20 µL da suspensão celular foram retirados de cada amostra e misturados com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0.5%. Os passos seguintes foram realizados de acordo com Speit e Hartmann (1999). De cada peixe, 100 nucleoides por tecido foram analisados de acordo com a classificação visual baseada na migração dos fragmentos de DNA a partir do núcleo. Os resultados foram categorizados em classes de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo) (Collins *et al.*, 1997).

Teste do micronúcleo písceo: O MNT com coloração laranja de acridina foi realizado de acordo com Çavas e Ergene-Gözükara (2005) com o intuito de determinar a frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares (MNA) (Carrasco *et al.*, 1990) e verificar o efeito do contaminante no processo de eritropoiese através da frequência de eritrócitos policromáticos (PCE).

Análises bioquímicas: As amostras de fígado foram descongeladas em gelo, pesadas e homogeneizadas na proporção 1:10 (m/V) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 com auxílio de micro-homogeneizador. O homogenato foi centrifugado durante 30 minutos a 15.000 rpm a 4°C, obtendo-se um sobrenadante do qual foram retiradas alíquotas para cada uma das análises. A atividade da SOD foi mensurada a 440 nm de acordo com Gao *et al.* (1998). A atividade da CAT foi mensurada a 240 nm segundo Aebi (1984). A atividade da GPx foi mensurada a 340 nm de acordo com Paglia e Valentine (1976). A análise da lipoperoxidação (LPO) foi realizada através da avaliação da concentração de hidroperóxidos de acordo com o proposto por Jiang *et al.* (1992). A análise da EROD foi realizada segundo o método de Burke e Mayer (1974). A Atividade da GST foi mensurada a 340 nm (Keen *et al.*, 1976). A atividade da AChE muscular e cerebral foi medida a 415 nm pelo método de Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998).

Os filamentos branquiais foram separados, pesados e sonicados durante 20 s (1 pulso/s) à amplitude de 50% em tampão específico para o teste. O homogenato proveniente da sonicação foi centrifugado (13.500 rpm, 4 °C, 5 min) e, então, obtiveram-se alíquotas de sobrenadantes para a realização da atividade da CA, a qual foi mensurada a 595 nm através do método de Vitale *et al.* (1999). Proteínas totais foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (1976) adaptado para microplacas, sob o comprimento de onda de 595 nm.

Histopatologia: Uma pequena porção do fígado foi retirada e fixada em ALFAC para posterior montagem de lâminas coradas com hematoxilina-eosina e análise ao microscópio de luz. O índice de lesões utilizado na avaliação do material foi descrito por Bernet *et al.* (1999)

Análise química

Metais: Anterior à leitura, as amostras de água do Parque Ecológico Costa foram filtradas em papel filtro Whatman nº 3 e transferidas para bequeres de 100 ml. O volume foi então reduzido de 0,050 para 0,020 L em chapa aquecedora (Cientec modelo CT-337.3) e mantido refrigerado a 4°C até a data das determinações. Os metais Mn, Zn, Fe, Cd, Cr e Pb foram determinados em espectrômetro de absorção atômica com chama (Varian® modelo AA 240FS), com bomba de sistema introdutor de amostra (SIPS) e lâmpadas de cátodo oco contendo cada elemento. Foram utilizados os gases óxido nitroso/acetileno com fluxo de 10,24 / 6,95 L.min⁻¹ para o metal Cr e Ar/acetileno, com fluxo de 13,50 / 2,00 L.min⁻¹ para os demais elementos. As determinações do Cu foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica (Varian®, AA 240Z), com atomização eletrotérmica em forno de grafite (modelo de GTA 120), equipado com corrector de fundo Zeeman e amostrador automático (PSD modelo 120). Foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco de Cu e Ar como gás inerte a um fluxo de 0,3 L.min⁻¹ com pirólise a 1.400 °C e atomização a 2.600 °C.

Compostos orgânicos: A concentração de compostos orgânicos na água foi determinada através da espectrometria de massas, em equipamento Varian 320MS, com infusão direta a 50 µL/min. A câmara foi mantida a 45°C, sob pressão de N₂ 40psi e gás de secagem a 200°C. A voltagem na câmara foi de 4.000V e no detector 1.200V. A detecção foi realizada para compostos com massa molar entre 100 e 750 g/mol e foi representada em concentração de íons.

Análises estatísticas

Os dados dos biomarcadores foram verificados quanto à normalidade (Kolmogorov-Smirnov), homocedasticidade (Bartlett) e presença de outliers (Grubbs). Dados paramétricos foram relatados como média ± desvio padrão e foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey com um nível de significância de 0,05. Dados não paramétricos foram relatados como mediana ± mínimo e máximo e foi realizado Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn com um nível de significância de 0,05.

Resultados

A tabela 1 mostra os resultados referentes à morfometria (peso e comprimento total) e aos parâmetros físico-químicos (temperatura e pH) dos peixes do laboratório (controles negativo) e do campo (Parque Ecológico Costa).

Tabela 1: Morfometria e parâmetros físico-químicos dos organismos do laboratório e do campo.

	Espécie	Peso (g)	Comprimento (cm)	T (°C)	pH
Laboratório	<i>A. altiparanae</i>	5,85 ± 1,75	8,1 ± 0,72	23,16 ± 0,26	7,53 ± 0,04
	<i>A. bifasciatus</i>	6,23 ± 1,03	8,51 ± 0,46	23,06 ± 0,04	7,56 ± 0,09
	<i>A. ribeirae</i>	30,46 ± 5,03	12,98 ± 0,53	23,26 ± 0,09	7,63 ± 0,04
Campo	<i>A. altiparanae</i>	2,18 ± 0,67	5,94 ± 0,56		
	<i>A. bifasciatus</i>	5,98 ± 1,88	8,46 ± 0,91	21,74 ± 0,74	7,61 ± 0,04
	<i>A. ribeirae</i>	3,26 ± 0,82	6,73 ± 0,5		

As análises químicas dos metais presentes na água da lagoa do Parque Ecológico Costa estão descritas na tabela 2 como média da concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) ± desvio padrão. Os valores máximos determinados pelo CONAMA 357/2005 para águas de classe I e II também estão representados. Pelos valores obtidos, nota-se que a água do Parque Ecológico Costa encontra-se com valores bem abaixo da legislação para cada um dos metais analisados.

Tabela 2: Valores médios da concentração de metais encontrados na água da lagoa do Parque Ecológico Costa e valores máximos permitidos pela legislação brasileira para águas de classe I e II (CONAMA 357/2005). Valores em $\mu\text{g L}^{-1}$ ± desvio padrão.

Referência	Cd	Pb	Cu	Cr	Fe	Mn	Ni	Zn
Campo	n.d.	0,18 ± 0,05	2,46 ± 1,51	n.d.	2,01 ± 0,60	0,37 ± 0,13	n.d.	0,20 ± 0,60
CONAMA 357/2005	1	10	9	50	300	100	25	180

A análise do espectro dos compostos orgânicos (Fig. 1) na água da lagoa do Parque Costa revelou que uma grande variedade de moléculas com massas molares distintas estavam presentes. A linha pontilhada é referente às moléculas detectadas com concentração iônica a partir de 2.5×10^5 íons. Os números sobre os histogramas referem-se à massa molar das moléculas encontradas nessa condição.

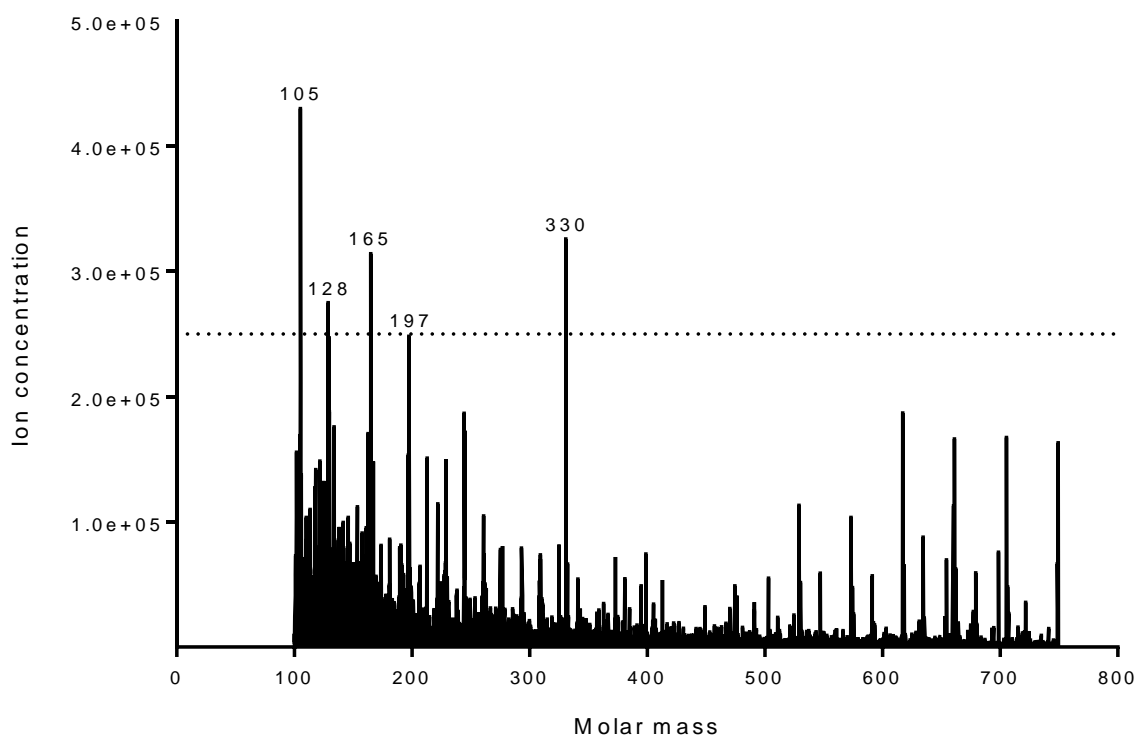


Fig. 1: Histograma representando as moléculas com massa molar entre 100 e 750 g/mol encontradas na água da lagoa do Parque Ecológico Costa. A linha pontilhada é referente à concentração iônica de 2.5×10^5 íons.

A análise dos biomarcadores referente às análises de estresse oxidativo (Fig. 2) mostraram que todos se comportam interespecificamente de maneira idêntica nos organismos do laboratório e do campo.

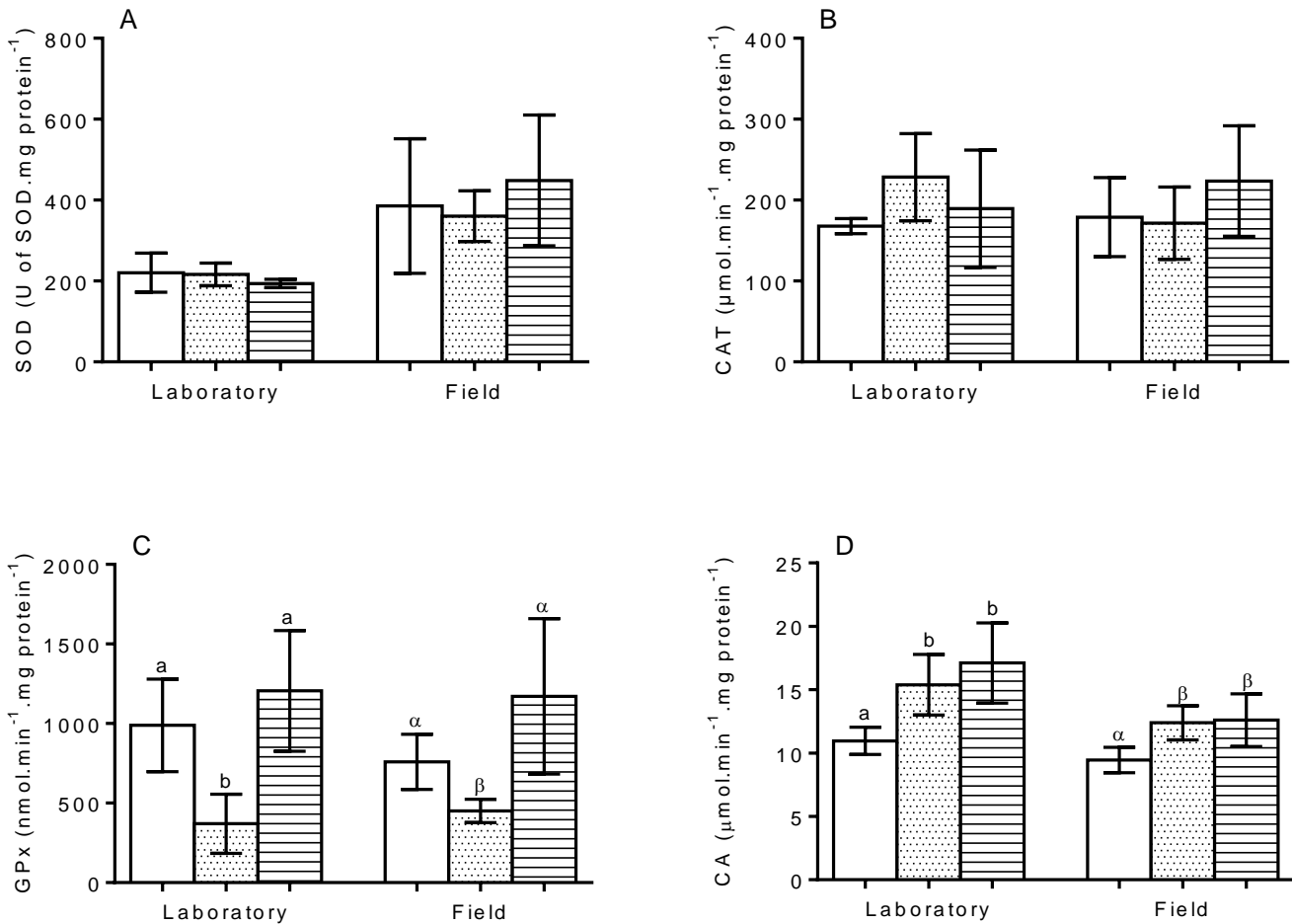


Fig. 2: A- Atividade da SOD; B- Atividade da CAT; C- Atividade da GPx; D- Atividade da CA. Cada histograma representa uma espécie de *Astyanax*: Brancos- *A. altiparanae*; Pontilhados- *A. bifasciatus*; Linhas- *A. ribeirae*. Caracteres latinos referem-se à comparação entre as espécies do laboratório enquanto que caracteres gregos, às espécies do campo. Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes, $p < 0,05$.

A análise dos biomarcadores referente ao metabolismo de biotransformação (Fig. 3A e B) e à neurotoxicidade (Fig. 3C e D) mostraram que, com exceção da AChE cerebral (Fig. 3D) de *A. altiparanae* e *A. ribeirae*, todos os outros obtiveram o mesmo padrão de resposta interespecífico tanto para o laboratório quanto para o campo.

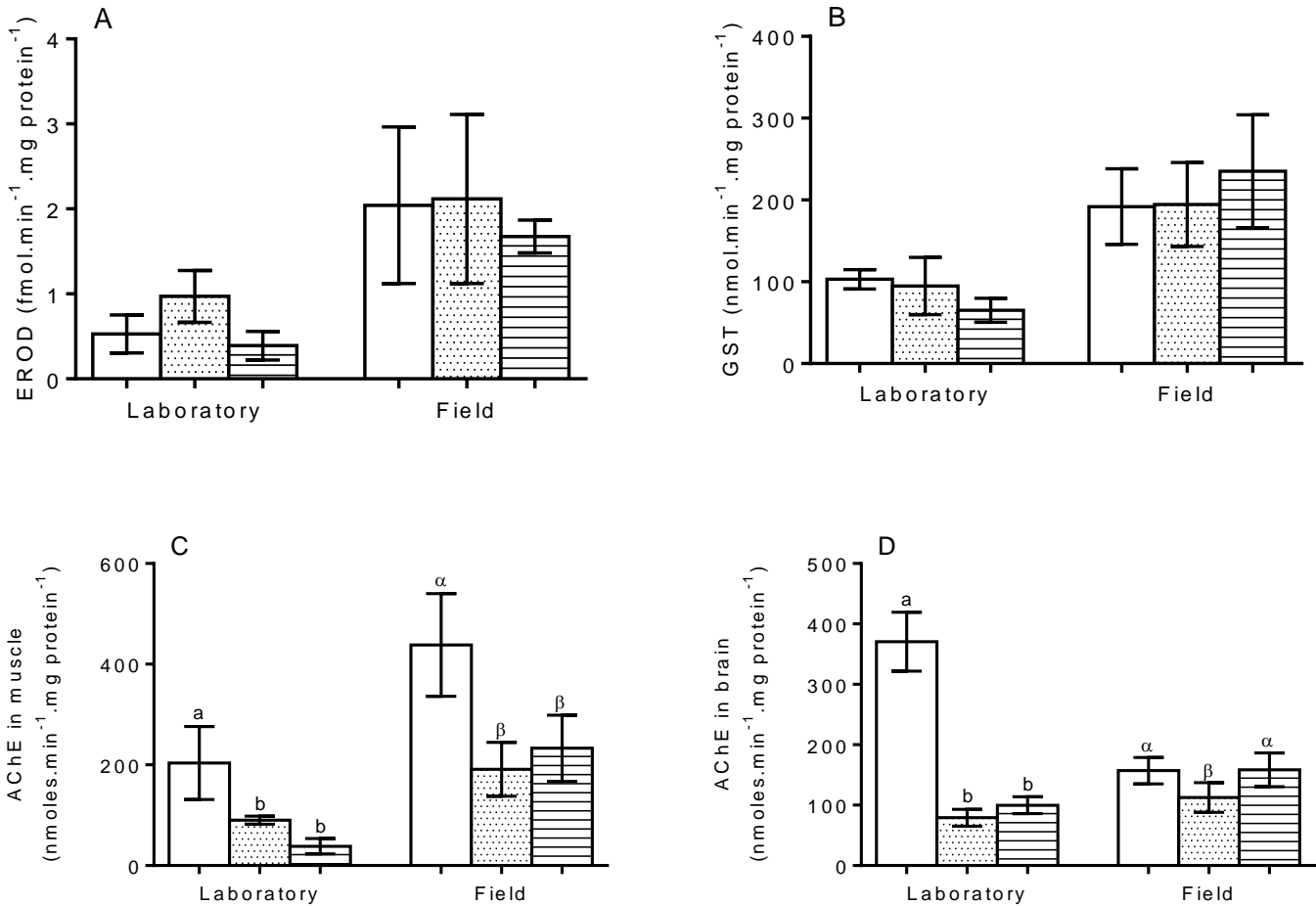


Fig. 3: A- Atividade da EROD; B- Atividade da GST; C- Atividade da AChE muscular; D- Atividade da AChE cerebral. Cada histograma representa uma espécie de *Astyanax*: Brancos- *A. altiparanae*; Pontilhados- *A. bifasciatus*; Linhas- *A. ribeirae*. Caracteres latinos referem-se à comparação entre as espécies do laboratório enquanto que caracteres gregos, às espécies do campo. Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes, $p < 0,05$.

A comparação interespecífica da LPO e do ECA (Fig. 4A e B) apresentou semelhanças para os peixes do laboratório e do campo. O HCA (Fig. 4C), por sua vez, apresentou-se elevado em *A. altiparanae* do campo em comparação com *A. bifasciatus* e *A. ribeirae* também do campo.

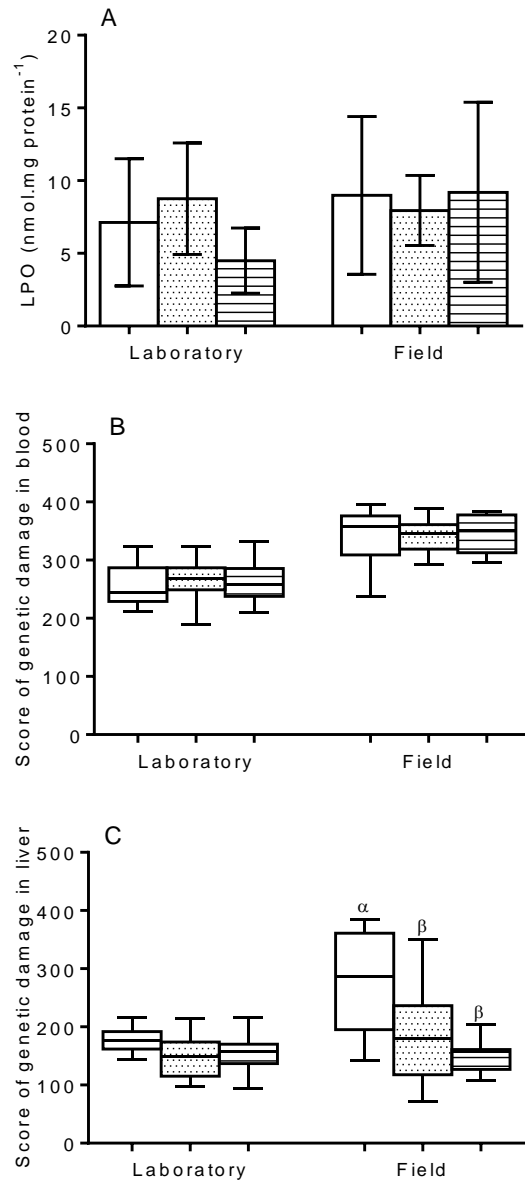


Fig. 4: A- Concentração de hidroperóxidos; B- Escore do ECA; C- Escore do HCA. Cada histograma e boxplot representa uma espécie de *Astyanax*: Brancos- *A. altiparanae*; Pontilhados- *A. bifasciatus*; Linhas- *A. ribeirae*. Caracteres latinos referem-se à comparação entre as espécies do laboratório enquanto que caracteres gregos, às espécies do campo. Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes, $p < 0,05$.

Ainda com relação às análises genéticas, os mesmos padrões interespecíficos foram observados para a frequência de alterações morfológicas nucleares (MNA) (Fig. 5A) e para a frequência de eritrócitos policromáticos (PCE) (Fig. 5B) dos peixes do laboratório e do campo.

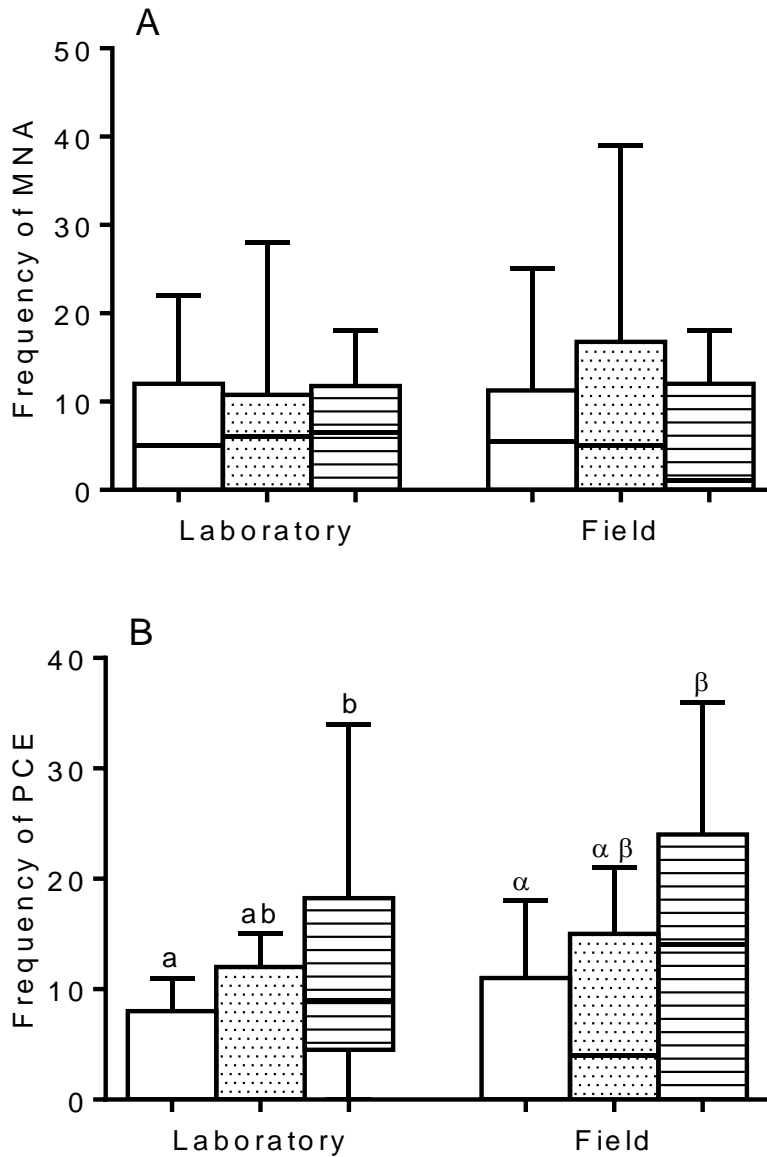


Fig. 5: A- Frequência de MNA; B- Frequência de PCE. Cada boxplot representa uma espécie de *Astyanax*: Brancos- *A. altiparanae*; Pontilhados- *A. bifasciatus*; Linhas- *A. ribeirae*. Caracteres latinos referem-se à comparação entre as espécies do laboratório enquanto que caracteres gregos, às espécies do campo. Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes, $p < 0,05$.

A análise histopatológica por meio do índice de Bernet (Fig. 6) não apresentou nenhuma diferença interespecífica para os lambaris do laboratório e do campo. As alterações observadas foram descritivamente representadas de acordo com o número de observações por indivíduo na tabela 3.

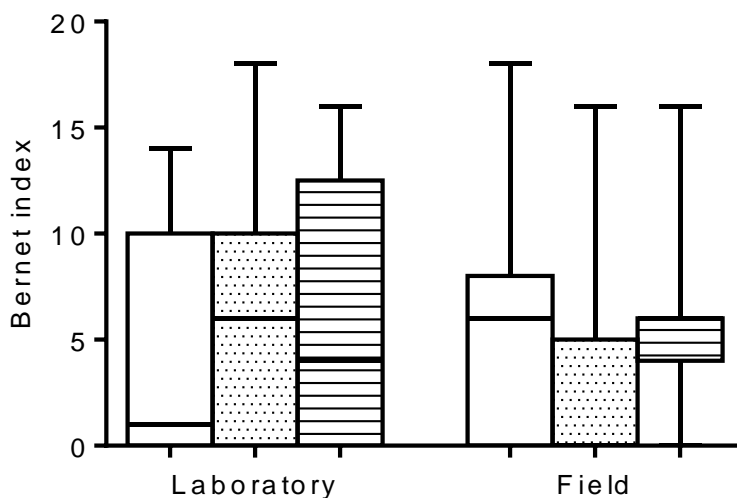


Fig. 6: Boxplot do índice de Bernet baseado nas alterações morfológicas encontradas. Pontilhados- *A. bifasciatus*; Linhas- *A. ribeirae*. $p < 0,05$.

Tabela 3. Alterações histopatológicas observadas em fígado de *Astyanax sp.* O número entre parênteses ao lado do nome de cada espécie representa o total de indivíduos analisados em cada grupo.

	Espécie	Necrose	Inf. Leuco.	Vacuol.	Granulo.	Congest.
Laboratório	<i>A. altiparanae</i>	1	4	0	0	1
	<i>A. bifasciatus</i>	1	3	2	0	2
	<i>A. ribeirae</i>	2	3	0	0	2
Campo	<i>A. altiparanae</i>	5	2	0	0	2
	<i>A. bifasciatus</i>	4	1	0	2	1
	<i>A. ribeirae</i>	4	5	3	2	0

Inf. Leuco.- infiltração leucocitária; Vacuol.- vacuolização; Granulo.- granulomas; Congest.- congestão

Discussão

“To understand is to perceive patterns.”

Isaiah Berlin

A ciência é um rigoroso e sistemático processo de criação, construção e organização de conhecimento através de explicações e previsões testáveis sobre o universo. Este rigor é proveniente do método científico e se baseia em observações repetidas, formulação e verificação de hipóteses, descrição e geração de modelos, integridade ética e revisão comunitária.

Na ecotoxicologia, o objetivo final da aplicação do método científico é a avaliação dos riscos ecológicos através do fornecimento de informações para as tomadas de decisão que visam proteger o ambiente dos efeitos indesejáveis de produtos químicos (Breitholtz *et al.*, 2006). A geração dessas informações se dá através da identificação do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco (EC, 2003).

As abordagens ecotoxicológicas tradicionais buscam conciliar os dados bióticos e abióticos do meio a fim de gerar essas informações. Contudo, a dificuldade em separar a grande variedade biológica e ambiental, as respostas dependentes de condições específicas do experimento e da população investigada e a dificuldade de simular condições naturais no laboratório (Coutellec e Barata, 2011; Klerks *et al.*, 2011) são os grandes limitantes da disciplina, fazendo com que os conhecimentos obtidos em laboratórios nem sempre reflitam a realidade.

Neste estudo, as análises abióticas foram comparadas à legislação mais restritiva que possuímos com relação à qualidade da água (CONAMA 357/2005). A avaliação de metais da água da lagoa do Parque Costa indica que esse local pode ser utilizado como ponto de referência, uma vez que todos os metais analisados apresentam-se abaixo dos valores determinados pela lei para águas de classes I e II.

Outros trabalhos que utilizaram esse local como referência, mas que não haviam realizado as análises químicas, mostraram resultados semelhantes tanto para *Astyanax* (Ramsdorf *et al.*, 2012), quanto para *Geophagus brasiliensis* (Beninca *et al.*, 2012),

destacando, assim, que o Parque Ecológico Costa ainda é um local pouco afetado pela contaminação por metais.

A obtenção do espectro de compostos orgânicos na água do campo, por sua vez, é uma interessante abordagem a ser realizada quando não temos conhecimento prévio sobre as moléculas que podem estar presentes em determinado ambiente. Neste estudo encontramos, a partir de uma concentração iônica de $2,5 \times 10^5$, moléculas com massas molares de 105, 128, 165, 197 e 330 g mol^{-1} .

Para melhor exemplificar a abordagem, 330 g mol^{-1} é a massa molar aproximada do malathion, contudo 330 g mol^{-1} é também a massa molar aproximada dos nucleotídeos (Santos *et al.* 2013), portanto isso não significa que todas as moléculas encontradas na varredura são, necessariamente, algum composto nocivo. No caso do Parque Ecológico Costa, é provável que a maioria das leituras seja referente às moléculas biológicas, já que não há áreas agrícolas no entorno do parque e a lagoa estudada está relativamente longe do rio que abastece as demais cavas.

Já quanto às análises bióticas, os biomarcadores analisados mostraram os mesmos padrões de respostas entre os resultados dos bioensaios e os do campo para as atividades da SOD, CAT, GPx, CA, EROD, GST e AChE muscular, também foram verificados padrões similares para a LPO, ECA, MNA, PCE e índice de Bernet.

Do ponto de vista ecotoxicológico e para os objetivos deste estudo, tal fato é extremamente importante, haja vista que foram utilizadas diferentes populações de *Astyanax*, *i.e.* espécies provenientes de locais distintos, para as comparações entre laboratório e campo.

Há uma linha tênue, e muitas vezes mal compreendida pelos ecotoxicólogos, que separa os conceitos de replicabilidade e reprodutibilidade. Enquanto replicabilidade diz respeito ao nível de similaridade entre unidades experimentais, reprodutibilidade refere-se a um fenômeno que pode ser previsto que volte a ocorrer, mesmo quando as condições experimentais variam em certo grau (Drummond, 2009).

Assim sendo, pode-se dizer que os resultados interespecíficos obtidos para as três espécies através dos biomarcadores estudados no laboratório foram altamente reprodutíveis e refletem a realidade do padrão de resposta interespecífica esperada

para o ambiente natural, neste caso um ambiente relativamente isento de contaminação.

De forma correlata, a discordância entre os biomarcadores AChE cerebral e HCA observada na relação interespecífica dos peixes do laboratório e do campo encontram-se dentro de um nível aceitável, haja vista que são diversos os fatores ambientais e ecológicos, e.g. temperatura, pH, salinidade, alimentação, competição etc que atuam sobre a homeostase dos organismos e que podem influenciar a resposta dos biomarcadores, mas que não condizem, necessariamente, com um prejuízo/benefício à saúde geral das populações.

Portanto, a abordagem interespecífica fornecida por este estudo parece razoável para compreender como os resultados obtidos em laboratório podem ser verificados e extrapolados para o ambiente natural. Em outras palavras, é importante que pelo menos duas espécies sejam investigadas para observar se o padrão de resposta interespecífico obtido em laboratório é condizente com aquele observado no campo, ao invés de simplesmente investigarmos e compararmos a resposta de uma população *in vivo* com a sua respectiva população *in situ*, as quais podem apresentar respostas bastante distintas, mas que não reflitam um quadro de contaminação *per se*.

Em contrapartida, ao se realizar um bioensaio com um contaminante específico que é conhecido como sendo o principal composto que afeta determinado ambiente natural, a abordagem apresentada teria potencial para mostrar se a relação interespecífica entre as respostas ecotoxicológicas obtidas *in vivo* pode ser extrapolada para o campo e se essa extrapolação é condizente com o cenário de contaminação da área.

É evidente que o ambiente natural é complexo, tanto nas variáveis que o determina quanto na gama de compostos químicos que o atinge, contudo a necessidade de compreendermos os reais prejuízos que esses compostos oferecem ao ecossistema é urgente. Infelizmente tal complexidade ambiental é, muitas vezes, utilizada como desculpa para a inércia casualística existente entre laboratório e campo. Desculpas não farão com que a ciência avance e que as medidas protetivas adequadas sejam tomadas, e, por esse motivo, é necessário que compreendamos quanto do conhecimento laboratorial pode ser encontrado no meio ambiente.

Ao que tudo indica, a tradicional e direta forma intraespecífica de investigação que vem sendo feita para encontrar essa relação é ineficiente, haja vista que não incorpora a complexidade ambiental ora descrita. Em contrapartida, a abordagem interespecífica oferecida neste trabalho parecer ser simples e eficaz para incorporar a complexidade e compreender os efeitos que determinado contaminante poderia ter sobre um ambiente, além de elevar o status do efeito ao nível ecológico de comunidades.

Conclusão

Referente às análises químicas, a realização do espectro de compostos orgânicos, além de ser rápida e possuir menor custo, é uma estratégia interessante de ser utilizada quando não se tem indícios diretos da possível contaminação de um ambiente por determinado composto.

Com relação à abordagem dada às respostas dos biomarcadores neste estudo, a semelhança interespecífica observada no padrão de respostas das espécies de *Astyanax* estudadas, tanto *in vivo* quanto *in situ*, evidenciam que, apesar das variações populacionais e ambientais, é possível atingir um relevante grau de reprodutibilidade ecotoxicológica entre os dois tipos de estudos.

Tendo em vista a existência de uma grande complexidade ambiental que influencia diretamente as populações residentes, a observação intrapopulacional dos padrões de respostas ecotoxicológicas parece ser eficiente em reconciliar o laboratório com o campo. Contudo, uma vez que este estudo foi realizado em ambientes limpos, é importante que a eficiência dessa abordagem seja testada em cenários de contaminação para que conclusões mais robustas possam ser tomadas.

Por fim, este estudo exalta a necessidade da geração de conhecimento com o intuito de auxiliar as tomadas de decisão necessárias para o monitoramento e conservação do ambiente natural. Portanto, acreditamos que a mudança de paradigma quanto à forma como apreciamos a reprodutibilidade de dados ecotoxicológicos é necessária e encorajamos outros trabalhos a investir na metodologia proposta.

Referências

Aebi, H. Catalase in Vitro. *Method Enzymol*, 105:121–126, 1984.

Beninca, C.; Ramsdorf, W.; Vicari, T.; Oliveira Ribeiro, C. A.; Almeida, M. I.; Silva de Assis, H. C.; Cestari, M. M. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil. *Environ Monit Assess*, 184:2045-2056, 2012.

Bernet, D.; Schimidt, H.; Meier, W.; Burkhardt-Holm, P.; Wahli, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis*, 22:25-34, 1999.

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

Breitholtz, M.; Rudén, C.; Hansson, S. O.; Bengtsson, B. E. Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment. *Ecotox Environ Safe*, 63:324-335, 2006.

Burke, M. D.; Mayer, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos*, 2(6):583-588, 1974.

Carrasco, K. R.; Tilbury, K. L.; Myers, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci*, 1990.

Cavaş, T.; Ergene-Gözükara, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environ Toxicol Phar*, 19(1):107–111, 2005.

Cestari, M. M.; Lemos, P. M. M.; Oliveira Ribeiro, C. A.; Alves Costa, J. R. M.; Pelletier, E.; Ferraro, M. V. M.; Mantovani, M. S.; Fenocchio, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genet Mol Biol*, 27(2):270–274, 2004.

Collins, A. R.; Dobson, V. L.; Dusinská, M.; Kennedy, G.; Stětina, R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*, 375(2):183–93, 1997.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), 2005. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõem sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 18 de março 2005, pp. 58-63.

Connon, R. E.; Geist, J.; Werner, I. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors*, 12:12741-12771, 2012.

Coutellec, M.; Barata, B. An introduction to evolutionary processes in ecotoxicology. *Ecotoxicology*, 20:493–496, 2011.

Drummond, C. *Replicability is not Reproducibility: Nor is it Good Science*. Proc Eval Methods Mach Learn Workshop 26th ICML, Montreal, Quebec, Canada.

Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. J.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7:88–95, 1961.

European Commission. *Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission*

regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances. Luxembourg. 2003.

Ferraro, M. V. M.; Fenocchio, A. S.; Mantovani, M. S.; Ribeiro, C. D. O.; Cestari, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the 89 fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genet Mol Biol*, 27(1):103–107, 2004.

Gao, R.; Yuan, Z.; Zhao, Z.; Gao, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectroch Bioener*, 45(1):41-45, 1998.

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. *Anal Biochem*, 202:384- 389, 1992.

Keen, J.H.; Habig, W.H.; Jakoby, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S- transferases. *J Biol Chem*, 251:6183-6188, 1976.

Klerks, P. L.; Xie, L.; Levinton, J. S. Quantitative genetics approaches to study evolutionary processes in ecotoxicology; a perspective from research on the evolution of resistance. *Ecotoxicology*, 20:513–523, 2011.

Levin, S. A. The problem of pattern and scale in ecology: the Robert H. MacArthur award lecture. *Ecology*, 73(6):1943-1967, 1992.

Martin, B. *Linking Individual-based Models and Dynamic Energy Budget Theory: Lessons for Ecology and Ecotoxicology*. Alemanha. Universidade de Potsdam, 2013.

Martin, B. T.; Jager, T.; Nisbet, R. M.; Preuss, T. G.; Hammers-Wirtz, M.; Grimm, V. Extrapolating ecotoxicological effects from individuals to populations: a generic

approach based on Dynamic Energy Budget theory and individual-based modeling. *Ecotoxicol*, 22:574–583, 2013.

Moore, M. N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquat Toxicol*, 59:1–15, 2002.

Paglia, D. E.; Valentine, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Transl Res*, 70(1):158-169, 1967.

Ramsdorf, W. A.; Vicari, T.; Almeida, M. I. M; Artoni, R. F.; Cestari, M. M. Handling of *Astyanax sp.* for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. *Environ Monit Assess*, 184(10):5841-5849, 2012.

Ramsdorf, W. A; Guimarães, F. D. S. F.; Ferraro, M. V. M.; Gabardo J.; Trindade Eda, S.; Cestari, M. M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for 95 analysis with both comet assay and flow cytometry. *Mutat Res*, 673(1):78–81, 2009.

Santos, S.; Piculell, L.; Medronho, B.; Miguel, M. C.; Lindman, B. Phase behavior and rheological properties of DNA–cationic polysaccharide mixtures. *J Colloid Interf Sci*, 383:63-74, 2013.

Silva de Assis, H. C. *Der Einsatz Von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen*. Alemanha. Universidade Técnica de Berlim, 1998.

Speit, G.; Hartmann, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*, 113:203–12, 1999.

Staton, J. L.; Schizas, N. V.; Chandler, G. T.; Coull, B. C.; Quattro, J. M. Ecotoxicology and Population Genetics: The Emergence of “Phylogeographic and Evolutionary Ecotoxicology”. *Ecotoxicology*, 10:217–222, 2001.

Vighi, M.; Villa, S. Ecotoxicology: the challenges for the 21st century. *Toxics*, 1:18-35, 2013.

Vitale, A. M.; Monserrat, J. M.; Casthilo, P.; Rodriguez, E. M. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp Biochem Phys C*, 122(1):121- 129, 1999

3. Considerações Finais

Em tempos de declínio da biodiversidade e da qualidade ambiental devido às severas pressões antropogênicas sobre o meio ambiente, somos desafiados, mais do que nunca, com a tarefa de ligar os conhecimentos dos mecanismos de ação dos contaminantes com as suas possíveis interferências nos processos ecossistêmicos, a fim de desenvolver previsões confiáveis para um mundo em rápida mudança.

A ecotoxicologia desempenha um papel central nessa questão, identificando os perigos, avaliando as exposições e caracterizando os riscos. Portanto, acima de tudo, é necessário que o ecotoxicólogo possua domínio do método científico e consiga empregá-lo com maestria nas investigações que realiza.

Um desses domínios diz respeito à correta delimitação experimental do estudo. Surpreendentemente, existe uma grande confusão relativa a um tema principal do delineamento experimental, a pseudorreplicação. Neste estudo, buscamos esclarecer o conceito do ponto de vista ecotoxicológico e fornecer uma nomenclatura que facilite que o cientista compreenda o assunto e, conseqüentemente, auxilie a melhor planejar os seus experimentos.

Com base na nomenclatura proposta, investigamos as respostas de biomarcadores de três espécies de lambaris do gênero *Astyanax* (*A. altiparanae*, *A. bifasciatus* e *A. ribeirae*) expostos ao cobre e ao malathion. Foi observado que, apesar das espécies combaterem a contaminação por mecanismos enzimáticos distintos, as três são sensíveis aos dois contaminantes e apresentam danos fixados às suas macromoléculas e ao tecido hepático, sendo possível, dentro de certos limites, agrupar as espécies de modo a utilizar o gênero como bioindicador de testes ecotoxicológicos.

Finalmente, a investigação dos padrões entre as respostas ecotoxicológicas das espécies mostrou que existe um alto grau de reprodutibilidade entre os resultados obtidos *in vivo* com aqueles presentes *in situ*. Devido a essa alta reprodutibilidade, é importante que haja uma mudança de paradigma na ecotoxicologia no sentido de compreender como a complexidade ambiental atua sobre a saúde dos organismos, com o intuito de gerar subsídios sólidos para as políticas públicas que visam à proteção dos ecossistemas.