



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MANUELA SANTOS SANTANA

BIOMONITORAMENTO ATIVO NO RIO IGUAÇU: APLICAÇÃO DE MÚLTIPLOS BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE FONTES DIFUSAS DE CONTAMINAÇÃO EM *OREOCHROMIS NILOTICUS* (TILÁPIA)

**CURITIBA
2016**

MANUELA SANTOS SANTANA

BIOMONITORAMENTO ATIVO NO RIO IGUAÇU: APLICAÇÃO DE MÚLTIPLOS BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE FONTES DIFUSAS DE CONTAMINAÇÃO EM *OREOCHROMIS NILOTICUS* (TILÁPIA)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, no Curso de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maritana Mela Prodocimo.

**CURITIBA
2016**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Santana, Manuela Santos

Biomonitoramento ativo no Rio Iguaçu: aplicação de múltiplos biomarcadores para avaliação dos efeitos de fontes difusas de contaminação em *Oreochromis niloticus* (Tilápia). / Manuela Santos Santana. – Curitiba, 2016.

59 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Maritana Mela Prodocimo

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

1. Biomarcadores. 2. Ecotoxicologia. 3. Qualidade da Água. I. Título II. Prodocimo, Maritana Mela. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



ATA DA TRECENTÉSIMA NONAGÉSIMA SEGUNDA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aos trinta e um dias do mês de Março de dois mil e dezesseis, às 09h00min, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas, reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos professores: Drs. Wanessa Ramsdorf (Universidade Tecnológica Federal do Paraná), Luís Fernando Favaro (Universidade Federal do Paraná), e Maritana Mela Prodocimo (Universidade Federal do Paraná, como orientadora e presidente da Banca Examinadora), com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **Manuela Santos Santana**, intitulada: "Biomonitoramento ativo Rio Iguaçu: aplicação de múltiplos biomarcadores para avaliação dos efeitos de fontes difusas de contaminação em *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo)", para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular. A candidata teve em torno de 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação e cada examinador, teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de mais 30 (trinta) minutos para resposta do candidato ou de 60 (sessenta) minutos, quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo orientador, Dra. Maritana Mela Prodocimo. Após analisar a dissertação e arguida a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela "APROVAÇÃO", habilitando-a ao título de Mestre em Biologia Celular e Molecular. A emissão do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

<u>Examinador/Afiliação</u>	<u>Parecer</u>	<u>Assinatura</u>
Profa. Dra. Maritana Mela Prodocimo Orientadora e presidente da banca Universidade Federal do Paraná	<u>APROVADA</u>	
Profa. Dra. Wanessa Ramsdorf Universidade Tecnológica Federal do Paraná	<u>aprovada</u>	
Prof. Dr. Luís Fernando Favaro Universidade Federal do Paraná	<u>aprovada</u>	

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ivo e Conceição (Nega), por todo apoio e compreensão. Saber que sempre posso contar com o carinho e o amor de vocês fez toda essa distância entre a gente ser mais suportável. Obrigada por tudo! Nada desse trabalho seria possível sem vocês.

À minha irmã, Biga, que sempre esteve ao meu lado e foi por diversas vezes, um exemplo de força. Durante o mestrado, me deu o melhor presente, o TomTom, que já me ajudou e muito nesses últimos meses.

Às minhas tias, Lúcia, Augusta e Kátia e meus tios, Holanda e Lauro por ajudarem a concretização desse trabalho. Cada um à sua maneira, foi crucial para minha formação profissional e principalmente, pessoal. Muito obrigada por tudo!!

À minha orientadora, Maritana M. Prodocimo, por ter aceitado me orientar em uma situação um tanto não-convencional e ter acreditado que poderia realizar um bom trabalho. Se não fosse por ela, o mestrado poderia ter sido apenas uma lembrança ruim na minha vida.

Aos professores Francisco Filipak Neto, pela ajuda e santa paciência, durante as análises, e Ciro A. de Oliveira Ribeiro, por ter me ajudado a encontrar um novo projeto e conseqüentemente encontrar um grupo de pesquisa com o qual me identifiquei muito.

À Secretária da Pós-Graduação em Biologia Celular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas: Marlene B. de Camargo

A todos amigos e colegas do laboratório de toxicologia celular, que ajudaram durante as análises, durante os surtos e frustrações, mas fizeram o tempo de mestrado passar de maneira divertida: Dandie, Yvanna, Halina, Gisleine, Marcelle, Ludi, Renata, Andressa e Letícia.

À Flávia por me aceitar como parte de seu projeto e assim, me ajudar com a realização do meu mestrado.

À Carola, pela companhia nas coletas e no laboratório e pelo tempo que moramos juntas.

Às minhas amigas que estão espalhadas pelo mundo, mas são parte essencial na minha vida: Vanessa, Manu, Renata, Thaís e Deysi. Obrigada meninas!

Aos membros da banca, Prof. Dra. Wanessa Ramsdorf, Prof. Dr. Luís Fernando Fávaro e Célia R.C. Fontes por aceitarem o convite e avaliarem meu trabalho.

Ao Boris, que pra sempre vai ser meu Bobó, companheiro de todas as horas.

Ao Leo, amor, por toda cumplicidade, pelos quase 9 anos juntos que são só um tempinho comparado ao que temos a nossa frente. Obrigada por tudo!

RESUMO

A contaminação de ambientes aquáticos torna-se um problema cada vez maior à medida que o crescimento populacional humano se amplia. Assim, é necessário conhecer os diferentes tipos de contaminantes – agrícolas, industriais e urbanos –, além da fonte e da forma como esses resíduos agem no ambiente natural e nos organismos não alvos. Estressores naturais e antropogênicos são recorrentes em ambientes aquáticos e podem afetar a saúde da biota residente, assim como a saúde humana. Fontes difusas de contaminação exigem abordagens mais abrangentes, que considerem a complexidade e variabilidade de respostas biológicas frente a exposição a misturas complexas de poluentes. O biomonitoramento ativo (BMA) é uma ferramenta útil na detecção e quantificação de impactos ambientais e consiste em utilizar organismos coletados em ambientes não poluídos e translocá-los para ambientes contaminados, quantificando suas respostas, sejam elas bioquímicas, fisiológicas e/ou organísmicas. No presente estudo, múltiplos biomarcadores foram aplicados para avaliar os efeitos de um presumido gradiente de possíveis contaminantes nos reservatórios de Salto Caxias (SC), Salto Osório (SO), Salto Santiago (SS), Segredo (SG), localizados no Rio Iguaçu, utilizando a espécie *Oreochromis niloticus* como organismo bioindicador. Variações significativas dos bioquímicos, morfológicos e genéticos foram observadas. Os indivíduos apresentaram alterações do tecido hepático, como necrose e processos inflamatórios, entretanto o índice de lesão não indicou diferenças significativas entre reservatórios. Foi observada uma inibição da superóxido dismutase (SOD), bem como uma indução da catalase (CAT) em SO. Apenas em SG houve uma redução significativa dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). A atividade da glutathiona S-transferase (GST) foi induzida em todos os reservatórios, sendo apenas significativamente menor em SC. Níveis de peroxidação lipídica (LPO) foram maiores em SS, entretanto alterações morfológicas nucleares (AMN) foram menos frequentes no mesmo reservatório. Ainda em SS foram observadas grandes concentrações de metabólitos de HPAs na bile dos indivíduos. Por fim, a atividade colinesterásica do músculo foi inibida em todos os reservatórios, em relação a SS. Os resultados sugerem que não há um gradiente de contaminação, uma vez que o reservatório de SS, localizado entre os demais, apresentou respostas indicativas de maior impacto. Neste sentido, o biomonitoramento demonstra ser uma ferramenta viável no estudo dos efeitos prejudiciais de misturas complexas de poluentes para a saúde dos rios, para biodiversidade bem como para saúde humana. Com isso, é necessário que estudos futuros sejam realizados no Rio Iguaçu, principalmente nas áreas utilizadas como fontes de captação para o abastecimento urbano com o intuito de contribuir com as agências de controle ambiental para o estabelecimento de políticas públicas.

Palavras-chave: biomonitoramento ativo, Rio Iguaçu, sul do Brasil, qualidade da água, ecotoxicologia, misturas complexas, biomarcadores.

ABSTRACT

Contamination in aquatic environments has become a major problem due to population and urban expansion. Therefore, it is important to acknowledge the different classes of contaminants – agricultural, industrial and urban – as well as their sources and mode of action of these residues on natural environment and live organisms. Natural and anthropogenic stressors are recurrent in aquatic environment and can affect resident biota and human health. Diffuse sources of contamination require broader approaches that take into consideration the complexity and variability of biological responses after exposure to complex mixtures of contaminants. Active biomonitoring is a useful tool to detect and quantify environmental impact and consists of translocating organisms from a non-polluted site to a contaminated one in order to quantify their biochemical, physiological and/or organismic response. The present study used multiple biomarkers to assess the effects of a putative contamination gradient at Salto Caxias (SC), Salto Osório (SO), Salto Santiago (SS) and Segredo (SG) reservoirs, located in Iguaçu River, using *Oreochromis niloticus* species as a bioindicator organism. Significant variations of morphological, biochemical and genetic biomarkers were observed. Fish individuals showed hepatic tissue alterations, such as necrosis and inflammatory processes, however the lesion index did not indicate significant differences among reservoirs. Superoxide dismutase (SOD) inhibition, as well as catalase (CAT) induction was observed at SO. Only at SG there was a significant depletion of glutathione (GSH) levels. Glutathione S-transferase (GST) activity was induced at all reservoirs, with the exception of SC where it was significantly inhibited. Lipid peroxidation levels (LPO) were higher at SS, however nuclear morphological alterations (NMA) were less frequent at the same reservoir. Also at SS high concentrations of PAHs biliary metabolites were observed. Finally, muscle acetylcholinesterase activity was significantly reduced at all reservoirs when compared to SS. Results suggest that there is not a contamination gradient, since SS reservoir showed responses indicative of higher impact. Thus, active biomonitoring has proven to be a viable tool to assess deleterious effect of complex contaminant mixtures to river health status, to biodiversity as well as to human health. Additionally, further studies should be conducted in Iguaçu River, especially at areas primarily used for water supply, in order to contribute to environmental control agencies to establish public policies.

Keywords: active biomonitoring, Iguaçu River, southern Brazil, water quality, ecotoxicology, complex mixtures, biomarkers.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	10
1.2 METABÓLITOS BILIARES	13
1.3 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS	13
1.4 BIOMARCADORES GENÉTICOS	15
1.5 BIOINDICADOR <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> (TILÁPIA-DO-NILO)	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 ÁREA DE ESTUDO	19
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	20
3.3 ANÁLISES QUÍMICAS DE METAIS	21
3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	22
3.5 METABÓLITOS BILIARES	24
3.6 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	25
3.7 ANÁLISES DE GENOTOXICIDADE	26
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4 RESULTADOS	28
4.1 ANÁLISES QUÍMICAS	28
4.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	29
4.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	31
4.4 METABÓLITOS BILIARES DE HPAS	32
4.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS	33
4.4.1 Histopatologia do fígado de <i>Oreochromis niloticus</i>	33
4.4.2 Histopatologia de gônadas masculinas de <i>Oreochromis niloticus</i>	36
4.4.3 Histopatologia de brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i>	37
4.5 ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE	38
5 DISCUSSÃO	40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

Ambientes aquáticos estão sujeitos a uma variedade de agentes estressores, tanto naturais como antropogênicos, que podem afetar a saúde da biota residente e potencialmente a do homem. Devido a intensificação das atividades agropecuárias, industriais e do processo de urbanização, corpos d'água recebem misturas complexas de poluentes, como bifenilos policlorados (PCBs), dibenzodioxinas policloradas (PCDDs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), pesticidas organoclorados (DDTs) e metais pesados (LIVINGSTONE, 2001; RICCIARDI *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2011; BESSE *et al.*, 2012). Muitos desses poluentes, além de apresentarem uma alta toxicidade, persistem no ambiente, podendo ser bioacumulados na cadeia alimentar. Além disso, a redução nas concentrações de oxigênio dissolvido na água, o aumento da turbidez e alterações de habitats e regimes hidrológicos, podem afetar a biota através de processos pontuais, cumulativos ou sinérgicos (ADAMS, 2005).

Poluentes chegam aos corpos d'água através de fontes pontuais e/ou fontes difusas de contaminação. Fontes pontuais referem-se a resíduos concentrados em uma área limitada ou lançados por uma fonte identificável, como por exemplo um emissário. Resíduos de fontes difusas estão distribuídos ao longo de grandes áreas, decorrentes da aplicação de fertilizantes ou gases emitidos por indústrias ou transportados pluvialmente de áreas agrícolas (PETERS & MEYBECK, 2000). Tais formas de poluição acarretam na degradação do ecossistema aquático, com prejuízos muitas vezes irreversíveis à qualidade da água, tornando-a imprópria para o consumo humano.

Fontes difusas de contaminação são particularmente preocupantes em rios de grande extensão, uma vez que diversas atividades presumidamente impactantes ocorrem ao longo de suas margens. A intensidade dos distúrbios varia ao longo da extensão do corpo d'água e dependerá da densidade populacional e do tipo de atividade desenvolvida (e.g. agropecuária ou industrial). Assim, diferentes regiões de um mesmo corpo d'água podem apresentar cenários particulares de degradação.

Como exemplo, podemos citar o Rio Iguaçu, importante ao desenvolvimento do Estado do Paraná, com suas águas servindo a fins diversos, como abastecimento urbano, irrigação e geração de energia hidrelétrica. Esse rio tem sido intensamente afetado por intervenções antrópicas, como descarga de esgoto doméstico, resíduos

industriais e aporte de agrotóxicos, que ocorrem em intensidades diferentes entre as regiões do alto, baixo e médio Iguaçu (JULIO JR. *et al.*, 1997).

O baixo e médio Iguaçu, região de ocupação predominantemente agropecuária, são marcados pela presença de cinco grandes reservatórios voltados a geração de energia elétrica (Foz do Areia, Segredo, Salto Osório, Salto Santiago e Salto Caxias). Esses reservatórios são o destino final de misturas complexas de contaminantes, sendo classificados como pouco ou moderadamente degradados (IAP, 2009). A ocupação agropecuária pode contribuir para entrada, por exemplo de organofosforados ou metais pesados, nesses corpos d'água. Além disso, a intensificação da urbanização a montante do baixo Iguaçu, é responsável pela entrada constante de dejetos industriais e domésticos, que podem exercer efeitos a quilômetros do ponto de entrada. Este conjunto de fatores faz do Rio Iguaçu o segundo rio urbano mais poluído do país, atrás apenas do Tietê em São Paulo (IBGE, 2008).

Portanto, o aporte de poluentes em larga-escala – em decorrência de fontes difusas de contaminação – exige abordagens mais abrangentes, que considerem a complexidade e variabilidade de respostas biológicas a misturas complexas de poluentes, visto que exposições crônicas afetam processos biológicos em diferentes níveis de organização (WEPENER *et al.*, 2005). Sendo assim, técnicas como as de biomonitoramento ativo são ferramentas úteis na detecção e quantificação de impactos ambientais.

No biomonitoramento ativo (BMA) os organismos são coletados em ambientes não-poluídos e translocados para ambientes contaminados selecionados, quantificando suas respostas bioquímicas, fisiológicas e/ou orgânicas (WEPENER *et al.*, 2005; BIRUNGI *et al.*, 2007). Essa técnica foi desenvolvida recentemente como uma alternativa aos programas correntes de biomonitoramento passivo, no qual o impacto é estimado a partir de organismos coletados em seu hábitat natural (BESSE *et al.*, 2012). Como vantagens do BMA, podemos citar: (i) tempo de exposição determinado; (ii) utilização das mesmas espécies-alvo em diferentes pontos, possibilitando comparações válidas entre locais de exposição; (iii) organismos com parâmetros, como tamanho e peso, similares facilitando a comparação entre locais (SMOLDERS *et al.*, 2003). Adicionalmente, organismos translocados respondem a condições ambientais mais rapidamente e intensamente quando comparadas aos organismos residentes. Espécies nativas tornaram-se

“geneticamente protegidas“ através de mudanças adaptativas, portanto a aplicação de organismos translocados aumenta a sensibilidade do método, podendo indicar quão adaptadas as espécies nativas estão aos locais contaminados (WEPENER, 2008).

Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados como consequência da interação entre o agente químico e o organismo; entretanto, a determinação quantitativa destes parâmetros usados como biomarcadores só é possível se existir correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância. Desta forma, um biomarcador pode ser definido como respostas quantitativas em nível celular, bioquímico, molecular ou fisiológico, que podem ser medidos em células, fluidos corporais, tecidos ou órgãos de um indivíduo, indicando uma possível exposição a xenobióticos e/ou seus efeitos (LAM & GRAY, 2003; VIDAL-LIÑÁN & BELLAS, 2013).

Biomarcadores têm sido crescentemente utilizados em programas de biomonitoramento, por serem ferramentas sensíveis a distintos estressores ambientais (SMOLDERS *et al.*, 2003; VIDAL-LIÑÁN *et al.*, 2013). São sinalizações precoces dos efeitos de contaminação, podendo subsidiar tomadas de decisões em tempo hábil, no intuito de remediar situações de risco, antes que estas se manifestem em níveis de organização biológica superiores, como populações e ecossistemas (VIDAL-LIÑÁN *et al.*, 2010).

A aplicação de biomarcadores surgiu da necessidade de atualizar as práticas de monitoramento ambiental, tradicionalmente realizadas através da medição de variáveis químicas (*e.g.* concentrações de PCBs, HPAs, metais pesados, etc) na coluna d'água e no sedimento. Além disso, a poluição ambiental por misturas complexas é especialmente difícil de ser avaliada, pois os eventos de contaminação obedecem a uma dinâmica espacialmente difusa e temporalmente variável. O resultado é um quadro de contaminação baixa e contínua, que nem sempre é captado pelos métodos de *screening* químicos, pois esses registram apenas o instante exato em que foram coletadas as amostras e não acompanham a variação temporal e espacial da contaminação. Assim, o uso de biomarcadores permite avaliar respostas biológicas a exposições intermitentes, frequentemente não detectadas por medições químicas (HANDY *et al.*, 2003).

A eficácia das práticas de monitoramento depende da seleção de bioindicadores e biomarcadores relevantes, que forneçam um panorama integrador

de como a exposição a contaminantes afeta a saúde da biota. Especialmente em casos de misturas complexas de poluentes, a abordagem de múltiplos biomarcadores (bioquímicos, morfológicos e genéticos) é indispensável, uma vez que cada medida pode caracterizar relações de classes de contaminantes específicos a efeitos biológicos deletérios. Dentre os biomarcadores, as análises selecionadas para este trabalho têm sido intensamente aplicadas em monitoramentos de áreas poluídas, fornecendo evidências dos efeitos adversos sofridos pelos indivíduos expostos a contaminação, e dessa forma tornando-se útil na avaliação de estresse ambiental (RABITTO *et al.*, 2005; DE ANDRADE BRITO *et al.*, 2012; LIEBEL *et al.*, 2013; OSÓRIO *et al.*, 2013).

1.1 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Entre os biomarcadores bioquímicos, destacam-se aqueles que representam o sistema antioxidante das células. Inúmeros compostos químicos e orgânicos possuem um potencial oxidativo, ampliando o dano causado por espécies reativas de oxigênio. Desta forma, as quantificações destes danos celulares e defesas antioxidantes podem ser usadas como biomarcadores de contaminação aquática. A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ocorre naturalmente dentro das células, em menor escala, durante processos fisiológicos, como transferência de elétrons pela cadeia transportadora nas mitocôndrias e processos oxidativos mediados por citocromo P450 (CYP). As EROs geradas a partir do oxigênio molecular são radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^{\cdot}).

A aumento da produção de ERO pode ser dramaticamente induzido após exposição a xenobióticos, caso ocorra interação desses com um ou vários complexos da cadeia transportadora de elétrons dentro da mitocôndria; ou através de interações com CYP (BOELSTERLI, 2007).

Xenobióticos podem atuar como aceptores de elétrons, recebendo o elétron do NADPH através de reações catalisadas por reductase. Uma vez reduzido, o composto, radical xenobiótico, pode entrar em um ciclo redox: caso o potencial redox permita, o xenobiótico pode reduzir oxigênio molecular, gerando ânion superóxido. Assim, estará disponível para ser novamente reduzido. O ciclo continuará até que ocorra a depleção de redutores (WINSTON & DI GIULIO, 1991).

Portanto, uma única molécula de um composto tóxico pode gerar várias moléculas de superóxido, amplificando a geração de EROs.

Paralelamente à produção de EROs, há mecanismos protetivos (antioxidantes) que agem para minimizar os potenciais danos. Organismos mantêm um balanço entre a geração de pró-oxidantes e antioxidantes, garantindo dessa maneira a integridade celular. Quando há um desequilíbrio nesses níveis, em resposta a xenobióticos por exemplo, caracteriza-se um estresse oxidativo (HELLOU *et al.*, 2012).

Dependendo do nível de estresse ao qual o organismo possa estar submetido, as defesas antioxidantes podem induzir a atividade de enzimas ou aumentar os níveis de proteínas antioxidantes.

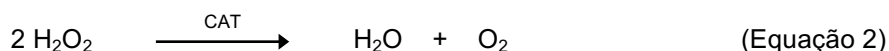
O tripeptídeo Glutathiona (GSH) é um dos antioxidantes mais importantes de um organismo. Encontra-se em altas concentrações nas células, existindo *pools* citosólicos, mitocondriais e nucleares. Portanto, uma das suas principais funções é manter as células em um estado reduzido e regenerar proteínas oxidadas. Atua sequestrando radicais não-enzimaticamente e é co-substrato para degradação enzimática de H_2O_2 (catalisada pela glutathiona peroxidase - GPx) (BOELSTERLI, 2007). A diminuição dos níveis de GSH pode levar a processos patofisiológicos de natureza oxidativa (ZHU *et al.*, 2013)

Enzimas como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) também compõem o sistema antioxidante das células. A SOD é uma metaloenzima que possui Cu e Zn, Mn ou Fe como metal ativo. Ocorre no citosol (SOD1), na mitocôndria (SOD2) e no meio extracelular (SOD3). Catalisa a dismutação do ânion superóxido, ou seja, catalisa a reação de moléculas de mesma espécie, gerando H_2O_2 e O_2 (Equação 1) (ZHU *et al.*, 2013).

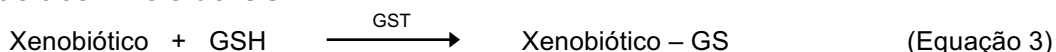


Portanto, durante a remoção do superóxido, a atividade da SOD gera outra ERO, capaz de atravessar membranas e levar a formação de espécies reativas mais tóxicas. Visto que H_2O_2 é constantemente produzido em diferentes compartimentos celulares, um sistema enzimático antioxidante eficaz é necessário para prevenir eventuais danos (BOELSTERLI, 2007). A catalase (CAT) é uma enzima encontrada

essencialmente no peroxissomos e muito abundante no fígado, responsável pela decomposição de H_2O_2 , formando H_2O e O_2 (Equação 2) (ZHU *et al.*, 2013).



A atividade das enzimas de biotransformação, como glutathione S-transferase (GST), também é um marcador importante de contaminação. A GST está envolvida na conjugação de xenobióticos, ou seus metabólitos, a ligantes endógenos, como GSH, durante a fase II da biotransformação (Equação 3) (van der OOST *et al.*, 2003). Portanto, possuem um papel importante na eliminação de compostos xenobióticos e alterações em sua atividade podem ser melhor interpretadas quando associadas aos níveis de GSH.



Quando o estresse oxidativo é excessivo e não mais compensado pelo sistema antioxidante de defesa, as EROs podem interagir com ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, comprometendo a integridade celular. A quantificação de alterações específicas em lipídios e proteínas - como peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO) - são importantes biomarcadores de exposição a contaminantes (van der OOST *et al.*, 2003). A LPO surge da geração de EROs em compartimentos hidrofóbicos das células, levando a peroxidação e subsequente dano a biomembranas. O dano pode ocorrer em um ponto específico da membrana, mas é rapidamente amplificado e propagado, comprometendo-a por inteiro. Além disso, os produtos da peroxidação (*e.g.* aldeídos tóxicos) podem ser tão reativos quanto as EROs iniciais, prejudicando ainda mais a célula (BOELSTERLI, 2007).

Danos oxidativos a proteínas acarretam na perda de função catalítica de enzimas e perda de função de proteínas estruturais. A PCO consiste na modificação de proteínas, através de grupamentos como aldeídos e cetonas em cadeias laterais de aminoácidos. Podem levar a perda das funções de algumas enzimas sensíveis a esse tipo de alteração, como a SOD (ROSSI, 2013).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela hidrólise de acetilcolina, neurotransmissor envolvido na transmissão de impulsos nervosos para células efetoras em junções sinápticas, colinérgicas e neuromusculares. Agrotóxicos organofosforados e carbamatos, assim como muitos metais, são capazes de inibir a

atividade dessa enzima levando a estímulo contínuo de fibras nervosas e musculares (FUKUTO, 1990). Sendo assim, a inibição da atividade da AChE tem sido amplamente utilizada como um indicador de exposição a pesticidas e inseticidas em diversas espécies de peixes (FULTON *et al.*, 2001; YADAV *et al.*, 2008; AL-GHAIS, 2013; OSÓRIO *et al.*, 2013).

1.2 METABÓLITOS BILIARES

Metabólitos biliares são biomarcadores amplamente utilizados como medidas indiretas dos efeitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, compostos reconhecidos como potentes carcinogênicos (BEYER *et al.*, 2010). Vertebrados aquáticos geram metabólitos reativos durante a biotransformação de HPAs, que podem ligar-se a macromoléculas celulares como DNA, RNA e proteínas, exercendo assim sua toxicidade. Os produtos da biotransformação de fase I e fase II de HPAs, que ocorre no fígado, são armazenados na vesícula biliar, e por isso, a quantificação da concentração desses compostos em tecidos é limitada e pode não refletir os níveis no ambiente (HEINRICH, 2006). A detecção e quantificação de metabólitos de HPAs em fluidos corporais, como a bile, são ferramentas recomendadas para avaliação de impactos por HPAs de fonte pirogênica, aquela associada à combustão incompleta de materiais orgânicos e combustíveis; e de fonte petrogênica, associada ao lançamento de óleo cru ou produtos do petróleo no ambiente (AAS *et al.*, 2000a; BEYER *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2012). A identificação da fonte dos HPAs é uma ferramenta importante para mitigar ou prevenir eventos de contaminação.

1.3 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

A histopatologia é um importante biomarcador, envolvido na verificação microscópica de células e tecidos de um organismo para determinação de anormalidades histológicas (RABITTO *et al.*, 2005; MADUREIRA *et al.*, 2012). Representa impactos endógenos ou exógenos, resultantes de alterações em níveis menores de organização. Fornece assim, uma melhor avaliação da saúde de organismos quando comparada apenas a utilização de parâmetros bioquímicos (TEH *et al.*, 1997), uma vez que está em uma posição intermediária entre os níveis de organização biológica (entre os níveis molecular e do indivíduo). Assim, quando

associados a outros métodos de análises, estudos histológicos podem auxiliar na compreensão ampla de determinadas situações.

Sua principal vantagem é a possibilidade de analisar alterações morfológicas em diferentes tecidos alvo de toxicidade, permitindo relacioná-las a funções fisiológicas (SMOLDERS *et al.*, 2003). Tecidos ou órgãos-alvo são aqueles que favorecem a maior concentração de contaminantes e por isso, os efeitos do impacto, seja ele crônico ou agudo, são mais facilmente detectados (OLIVEIRA RIBEIRO & NARCISO, 2013).

As brânquias – órgãos multifuncionais que executam funções vitais como respiração, osmorregulação e excreção de resíduos nitrogenados em peixes – são frequentemente utilizadas na avaliação de impactos ambientais. É o primeiro órgão a entrar em contato com poluentes e, devido a sua grande superfície de contato e um sistema detoxificante pouco robusto, a brânquia é muito vulnerável a presença de contaminantes (PANDEY *et al.*, 2008). Diversos trabalhos demonstram as análises histopatológicas das brânquias como biomarcador de exposição a diversos poluentes e, portanto, sua importância na avaliação de impactos ambientais (ALAZEMI *et al.*, 1996; MONTEIRO *et al.*, 2005; ABDEL-MONEIM *et al.*, 2012; MELA *et al.*, 2013a)

O fígado é o primeiro órgão a entrar em contato com xenobióticos após a incorporação, portanto, sua avaliação histopatológica é de particular interesse em práticas de monitoramento (OLIVEIRA RIBEIRO & NARCISO, 2013). As lesões encontradas no fígado podem refletir efeitos de exposição contínua, diferentemente dos biomarcadores bioquímicos, que podem refletir apenas respostas pontuais a impactos e por isso também são vastamente utilizados em programas de biomonitoramento (MOHAMED, 2008; EL-NAGGAR *et al.*, 2009; AMEUR *et al.*, 2012; DWIVEDI *et al.*, 2015)

Adicionalmente, muitos contaminantes podem atuar como desreguladores endócrinos e assim, influenciar a saúde reprodutiva de organismos aquáticos. Portanto, as alterações morfológicas das gônadas, como intersexo, necrose, neoplasia e eventos inflamatórios, podem indicar como contaminantes estão afetando o desenvolvimento reprodutivo e são utilizadas como Biomarcadores de contaminação (BLAZER, 2002; MOHAMED, 2008; CHAKRABARTI & BANERJEE, 2015). Sendo assim, a utilização da histopatologia de diferentes tecidos associada

às respostas bioquímicas, oferece um panorama integrador das condições ambientais.

1.4 BIOMARCADORES GENÉTICOS

A detecção de danos ao DNA pode ser empregada como biomarcadores de genotoxicidade. Diversos biomarcadores são utilizados para avaliar a exposição a contaminantes genotóxicos e seus efeitos: adutos de DNA, aberrações cromossomais, mensuração de micronúcleos e a frequência de outras anomalias nucleares (BOMBAIL *et al.*, 2001).

A formação de micronúcleos representa perda da integridade do DNA, consequência da fragmentação ou perda de cromossomos durante a mitose (DELLA TORRES *et al.*, 2012). Testes de micronúcleos são aplicados para avaliar o potencial mutagênico ou carcinogênico de poluentes no ambiente (MOORE *et al.*, 2004).

São considerados micronúcleos estruturas nucleares presentes no citoplasma de eritrócitos, com delineamento arredondado ou ovóide, apresentando de 1/5 a 1/20 do diâmetro da célula (especificamente de 1/10 a 1/30 no caso de peixes) e coloração consistente com o núcleo principal (CARRASCO *et al.*, 1990). Juntamente a outras alterações morfológicas nucleares, são importantes ferramentas para avaliação da qualidade da água. As alterações podem ser classificadas de acordo com Carrasco *et al.* (1990) em:

- *Blebbbed*: núcleos com evaginação do envelope nuclear que parece conter eucromatina ou heterocromatina. Remete ao micronúcleo, porém essas evaginações permanecem ligadas ao núcleo principal.
- *Notched*: núcleos com um corte pronunciado e bem definido, delimitado pelo envelope nuclear, que aparenta não possuir nenhum material nuclear.
- *Lobed*: núcleos com evaginações maiores que aquelas observadas em núcleo *blebbbed*, sem uma estrutura bem detalhada.
- *Vacuolizado*: núcleos com espaços vazios em seu interior, sem material nuclear, lembrando vacúolos.

1.5 BIOINDICADOR *OREOCHROMIS NILOTICUS* (TILÁPIA-DO-NILO)

Práticas de monitoramento exigem espécies que contribuam para o desenvolvimento prático de experimentos e que apresentem relação com o objeto de estudo. Peixes são um componente comum e familiar nos ecossistemas aquáticos, sendo vistos como excelentes indicadores das condições ambientais, uma vez que podem refletir os distúrbios em diversas escalas, devido às suas características de mobilidade, estilo de vida e por sua posição próxima do topo da cadeia alimentar (van der OOST *et al.*, 2003). Além disso, apresentam distribuição ampla em ambientes aquáticos e papel ecológico de grande importância, uma vez que atuam transferindo energia de níveis tróficos mais baixos para níveis superiores (van der OOST *et al.*, 2003).

Adicionalmente, espécies bioindicadoras devem ser espécies facilmente adaptáveis, razoavelmente resilientes e tolerantes a diversas condições ambientais, com taxas de crescimento e reprodução altas. Espécies raras e com pouca tolerância, são muito sensíveis a variações ambientais e, portanto, suas respostas a contaminação não podem representar a resposta biológica geral. Do mesmo modo, espécies ubíquas com tolerâncias muito elevadas podem ser muito pouco sensíveis a variações e por isso, pouco representativas (HOLT & MILLER, 2010).

A tilápia (*Oreochromis sp.*) é o segundo grupo de espécies mais cultivados mundialmente, sendo produzido em mais de 100 países (FAO, 2005; TURRA *et al.*, 2010). A espécie *Oreochromis niloticus* (FIGURA 1) está amplamente distribuída em ecossistemas tropicais e possui uma grande importância socioeconômica. Apresenta características que favorecem sua utilização, tais como: alta tolerância a variações de salinidade, temperatura e sistemas de produção; rápido crescimento e boa aceitação no mercado consumidor (BIRUNGI *et al.*, 2007; PATHIRATNE *et al.*, 2010; TURRA *et al.*, 2010).

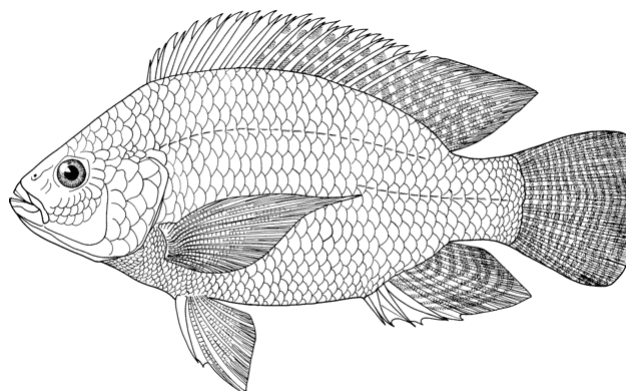


FIGURA 1 - Imagem de um exemplar de Tilápia-do-nylo – *Oreochromis niloticus*. (Fonte: FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2005)

A espécie *O. niloticus* foi introduzida no Brasil por volta de 1971, quando exemplares foram trazidos da África com o intuito de incrementar a produção aquícola nacional (BOSCOLO *et al.*, 2001). É uma espécie amplamente estudada, com registros de diferentes níveis biológicos disponíveis (BENTSEN *et al.*, 2012; TAO *et al.*, 2013; GUZMÁN-GUILLÉN, 2014). Trabalhos pretéritos demonstram que essa espécie pode ser utilizada em estudos ecotoxicológicos tanto em experimentos em laboratório (COIMBRA *et al.*, 2007; FIRAT *et al.*, 2011; GÚZMAN-GUILLÉN *et al.*, 2014) como em experimentos de campo (BIRUNGI *et al.*, 2007; ABDEL-MONEIM *et al.*, 2012; OMAR *et al.*, 2012; DWIVEDI *et al.*, 2015). Portanto, *Oreochromis niloticus* foi selecionada para este estudo como bioindicador para avaliação de qualidade das águas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar biomarcadores bioquímicos, morfológicos e genéticos para verificação de um presumido gradiente de contaminação, utilizando exemplares *Oreochromis niloticus* translocados para reservatórios do Rio Iguaçu.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar e quantificar, através de análises químicas, a presença de metais nas águas dos reservatórios do Baixo Rio Iguaçu;

Avaliar a bioacumulação de contaminantes em fígado e músculo;

Avaliar o sistema antioxidante através da atividade da glutathione S-transferase (GST) e catalase (CAT), carbonilação de proteínas (PCO), peroxidação lipídica (LPO), a quantificação de glutathione reduzida (GSH), em fígado;

Avaliar a neurotoxicidade dos poluentes em músculo através da determinação da atividade da acetilcolinesterase;

Avaliar o efeito dos poluentes em fígado, gônadas e brânquias através de análises histopatológicas utilizando técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura;

Detectar e quantificar metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em bile;

Avaliar a genotoxicidade dos poluentes presentes na água, através da avaliação de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A bacia do rio Iguaçu ocupa, dentro do estado do Paraná, uma área de 54.820,4 km², cerca de 28% da área total do estado. Com uma extensão total de 910 km, o Rio Iguaçu abastece as cidades de Porto União - SC e União da Vitória – PR, através de aproximadamente 25.000 pontos de ligação administradas pela Companhia de Saneamento do Paraná – Sanepar. É dividida em três unidades hidrográficas: Baixo Iguaçu, Médio Iguaçu e Alto Iguaçu (ANA, 2010).

No Alto Iguaçu há uma grande concentração populacional e as atividades industriais, comerciais e de serviços são as mais importantes. No Médio e Baixo Iguaçu, predomina a agropecuária, com destaque para as culturas de soja e trigo, além das pastagens (JULIO JR et al., 1997; ANA, 2010). Por ser um núcleo com alto volume de agrotóxicos comercializados, existe um grande potencial de contaminação por *run-off* agrícola no Médio e Baixo Iguaçu. Além disso, há um déficit na infraestrutura de esgotos e drenagem, o que pode contribuir para degradação das águas na região (ANA, 2010).

Cinco empreendimentos hidrelétricos foram construídos, em cascatas, no Médio e Baixo Iguaçu e operam de forma integrada: (montante a jusante) Foz do Areia, Segredo (SG), Salto Santiago (SS), Salto Osório (SO) e Salto Caxias (SC). O uso do solo nessas regiões é muito similar e os municípios limítrofes aos reservatórios estão voltados para primariamente para agropecuária, com a produção de milho, soja, trigo, arroz, feijão e mandioca e extração vegetal de erva mate e madeira (ANA, 2010). Segundo o IAP (2009), os reservatórios de Foz de Areia e Segredo, localizados no Médio Iguaçu, são classificados (por meio de análises físico-químicas da água) como Classe III, *i.e.*, moderadamente degradados; enquanto os reservatórios Salto Santiago, Salto Osório e Salto Caxias, localizados no Baixo Iguaçu, são considerados Classe II, *i.e.*, pouco degradados.

Os procedimentos experimentais do biomonitoramento ativo foram conduzidos nos quatro principais reservatórios do Médio e Baixo Iguaçu: SG, SS, SO e SC (FIGURA 2). Foi considerado como referência o reservatório Salto Caxias, dada a sua classificação segundo o IAP e a menor influência, devido a distância, das

águas provenientes de Curitiba e região Metropolitana. Enquanto o reservatório de Segredo foi considerado como reservatório com maior potencial de contaminação.

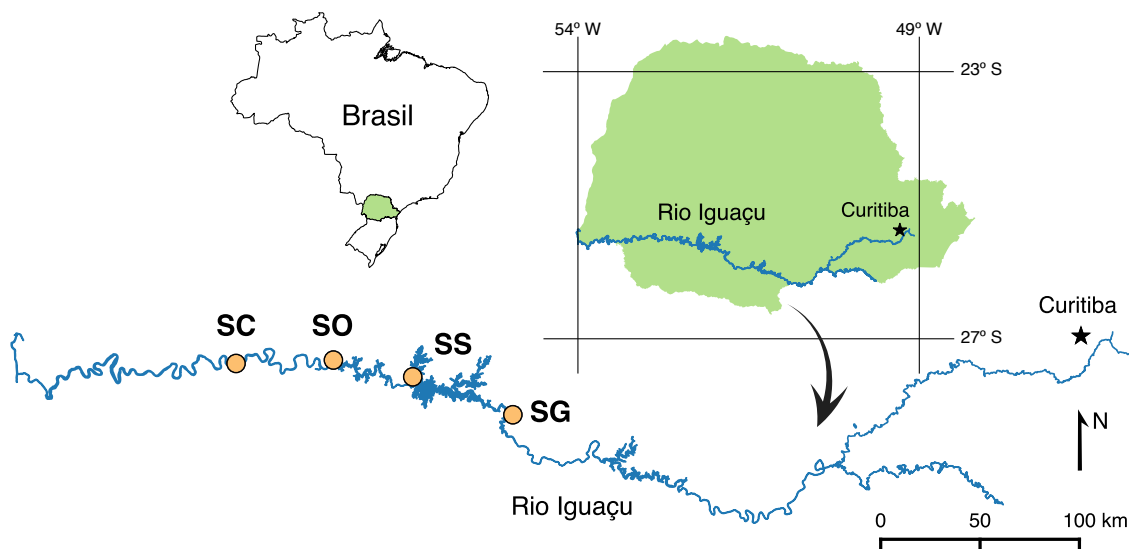


FIGURA 2 - Bacia do Rio Iguaçu. Reservatórios localizados no Baixo Iguaçu, onde o experimento foi conduzido, aparecem destacados: Segredo (SG), Salto Santiago (SS), Salto Osório (SO) e Salto Caxias (SC).

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Peixes adultos da espécie *Oreochromis niloticus*, com aproximadamente 16cm e com 60g, foram adquiridos na piscicultura do Instituto de Pesquisa e Produção em Aquicultura Avançada (INPAA), localizado no município de Toledo - PR. Em cada um dos 4 reservatórios, foram instalados tanque-redes de 8m³ aleatoriamente dispostos ao longo dos lagos. Cerca de 60 indivíduos foram transportados, sob oxigenação constante, para cada um dos reservatórios e alocados nos tanques-rede onde permaneceram de outubro a dezembro de 2014. Durante esse período, os peixes foram alimentados com ração a cada dois dias. Este número relativamente elevado de indivíduos em cada unidade experimental, foi

determinado para garantir um número suficiente de animais no momento da coleta, já que eventuais perdas devido a mortalidade era esperada.

Após 60 dias de exposição, cada exemplar foi anestesiado com MS222 200mg/L (metanosulfonato de triclaína) e dissecados para retirada do material biológico utilizado nas análises. Foram coletadas amostras de sangue – através de punção caudal – e imediatamente separados para análise genética. Para as análises bioquímicas, amostras de fígado e músculo foram armazenados em microtubos e mantidas em nitrogênio líquido e posteriormente congeladas em freezer -80°C até o momento das análises. Amostras de fígado e gônadas foram fixadas em ALFAC por 16 horas para análise histopatológica através de microscopia de luz. As brânquias foram fixadas em Fixador Karnovsky para posterior análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Adicionalmente, a bile foi coletada e igualmente armazenada a -80°C para detecção e quantificação de metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Para as análises de bioacumulação, amostras de fígado e músculo foram armazenadas a -80°C.

3.3 ANÁLISES QUÍMICAS DE METAIS

Água foi coletada para determinação da concentração de metais de transição (Co, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn) no mesmo local dos tanques-redes e no mesmo período de coleta dos peixes. A água foi coletada a 30 cm abaixo da superfície com adição de 5 ml de H₂SO₄/L de água para diminuição do pH. As amostras foram armazenadas em garrafas novas envolvidas com papel alumínio e mantidas a 4°C.

Estas determinações foram realizadas pelo grupo de química analítica ambiental e sanitária (QAAS) da UEPG de acordo com a metodologia proposta por Cotta *et al.* (2006). As amostras de fígado e músculo foram submetidas a digestão ácida e a detecção foi feita em espectrômetro de absorção atômica por chama (FAAS). As concentrações dos metais detectadas na água foram comparadas com os níveis estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005.

3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As amostras de fígado e músculo foram homogeneizadas em tampão Tris HCl 20mM, EDTA 0,1M, PMSF 1mM pH 7,4 (volume final de 2 ml) e tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5, respectivamente. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000 g, a 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante foi aliqotado em diferentes tubos (*ependorfs*), com volumes conhecidos, para evitar o recongelamento das amostras. Antes de realizar cada análise, as amostras foram diluídas de acordo com o método a ser utilizado, a fim de alcançar uma faixa de concentração de proteínas desejada (1mg de proteínas/ml) para a atividade das enzimas).

- *Concentração proteica*

A concentração de proteínas totais foi mensurada, em espectrofotômetro a 595 nm, pelo método de BRADFORD (1976) com modificações. Em microplaca, alíquotas (10 µL) de amostras diluída (1:40) em tampão de homogeneização (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6, PMSF 1 mM para fígado e fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5 para músculo) foram pipetadas. Em seguida, 250 µL de reagente de Bradford diluído (Bio Rad®) foi adicionado. Os valores finais da quantificação colorimétrica foram obtidos em miligramas de proteína por mililitros de amostra, utilizando-se uma curva padrão pré-estabelecida com diferentes concentrações conhecidas de soro de albumina bovina (BSA).

- *Peroxidação de lipídios (LPO)*

Os danos causados nos lipídios foram avaliados de acordo com o Método FOX (JIANG *et al.*, 1991, 1992). O princípio do método se baseia na rápida oxidação do Fe⁺² mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe⁺³ - laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a um comprimento de onda de 550-570 nm.

Em um microtubo de 2 mL foram pipetados 200 µL da amostra centrifugada concentrada acrescida de 1800 µL do meio de reação. Este preparado na hora, utilizando metanol 100%, Xilenol Laranja 100 µM, H₂SO₄ 25 mM, hidroxitolueno butilado 4mM e FeSO₄.NH₄ 25 µM. Após 20 minutos de reação à temperatura

ambiente, as amostras foram centrifugadas a 9.000g. Para a leitura, 300 µL do sobrenadante foram pipetados em microplacas e a absorbância medida a 550-570 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

- *Glutathione S-transferase (GST)*

A atividade da enzima GST foi mensurada de acordo com a formação de um tioéter a partir da reação do substrato CDNB com o GSH, catalizada pela GST (KEEN *et al.*, 1976 com modificações).

Na microplaca foram adicionados 10 µL de amostra, acrescidos de 200 µL do meio de reação com uma pipeta multicanal. O meio de reação foi preparado a partir de tampão fosfato a 0,1M pH 6,5; solução de GSH a 3mM (Sigma Aldrich) e solução de CDNB a 3mM (Sigma Aldrich). A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 340 nm durante 2 min em intervalos de 12 segundos. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o delta absorbância no intervalo de 1 minuto.

- *Glutathione reduzida (GSH)*

A concentração de glutathione reduzida (GSH) foi determinada a partir da reação com o DTNB 2,5 mM (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico). Para precipitar proteínas das amostras foi adicionado TCA (ácido tricloroacético) para chegar a uma concentração final 10%. A mistura foi centrifugada e 50 µl do sobrenadante foi pipetado na microplaca seguido de 230 µl de tampão tris-base a 0,4M, pH8,9 e 20 µL de DTNB 2,5mM. A leitura foi realizada a 415 nm (SEDLAK E LINDSAY, 1968)

- *Carbonilação de proteínas (PCO)*

A concentração de proteínas oxidadas/carboniladas foi determinada de acordo com sua reação com a 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) formando dinitrofenil hidrazonas detectadas a um comprimento de onda de 358-370 nm (LEVINE *et al.*, 1994).

A cada 200 µl de amostra foram adicionados 500 µl de reagente (DNPH a 10 mM, HCl 2M) e mantidos a 30-37°C por 90 minutos. Para precipitação das proteínas foi adicionado TCA a 28% e centrifugados a 9.000g por 10 minutos. O *pellet* foi lavado três vezes por ressuspensão (em etanol/acetato de etila) e centrifugação. As proteínas foram solubilizadas com cloreto de guanidina a 6M e posteriormente

centrifugadas para eliminar resíduos não solúveis. As carbonilas foram determinadas espectrofotometricamente a 360 nm.

- *Catalase (CAT)*

Para medir a atividade da CAT hepática foi utilizado o método de AEBI (1984) com modificações, que se baseia no consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exógeno pela CAT, gerando água e oxigênio, podendo ser mensurado por espectrofotometria a 240 nm. As amostras foram normalizadas para 0,2 mg/ml e como substrato foi utilizada uma solução de H_2O_2 a 30 mM. Em microplaca foram adicionados 10 μ L da amostra e 200 μ L da solução de H_2O_2 . A leitura da absorbância foi realizada a cada 12 segundos durante 1 minuto e a atividade foi expressa em μ mol. min^{-1} .mg de proteína $^{-1}$.

- *Acetilcolinesterase (AChE)*

Para avaliar a atividade da AChE foi utilizado o método descrito por ELLMAN *et al.* (1961) que tem como princípio a hidrólise do substrato acetiltiocolina pela AChE, em tiocolina e acetato. A tiocolina resultante reage com o DTNB gerando o ânion 5-Tio-2-nitrobenzoato responsável pelo aparecimento de coloração amarela que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância a 405 nm.

Em uma microplaca foram adicionados 50 μ L da amostra e com uma pipeta multicanal, 200 μ L de DTNB 0,75mM. A leitura foi realizada a 405 nm durante 4 minutos em intervalos de 30 segundos.

3.5 METABÓLITOS BILIARES DE HPAS

A detecção e quantificação de metabólitos de HPAs na bile foi realizada de acordo com o método proposto por AAS *et al.* (2000b), com modificações. A bile foi coletada em *pools* de 3 indivíduos e armazenadas em frascos âmbar a -80° C. As amostras serão diluídas em Etanol 48% (1:1000) e plaqueadas (200 μ l) em placas pretas. A leitura da fluorescência foi realizada em comprimentos de onda fixo (*fixed wavelength fluorescence* - FF) 288/330, 334/376, 364/406 e 380/422nm para detecção de das seguintes classes de HPAs: metabólitos de naftaleno (2 anéis);

metabólitos de pireno (4 anéis); metabólitos de benzo(a)pireno (5 anéis) e metabólitos de benzo(ghi)perileno (6 anéis) (AAS *et al.* 2000b).

3.6 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Gônadas, dos indivíduos machos, e fígados coletados para histopatologia foram fixados em ALFAC por 16 h e depois transferidos para Álcool 70%, onde permaneceram até o procedimento de inclusão. Para esta etapa, os órgãos foram desidratados em série crescente de etanol, transferidos para o xilol e paraplast plus (Sigma Aldrich) a 58°C e em seguida emblocados. Cortes de 5µm de espessura foram obtidos através de Micrótomo Leica e distendidos nas lâminas com solução de albumina 20%. Para a coloração, os cortes foram desparafinizados, hidratados e corados com Hematoxilina/Eosina. Após desidratação e diafanização, lâminas permanentes foram montadas com lamínula em Entellan (Merck®) para posterior análise e registro de imagens em câmera digital acoplada ao microscópio de luz e *scanner* de lâminas.

As gônadas foram avaliadas, bem como o fígado, através de microscopia de luz, para determinação de irregularidades do tecido, como necrose, intersexo (presença de tecido feminino e masculino no mesmo corte), células inflamatórias, parasitas e neoplasia. O estágio de desenvolvimento foi determinado segundo Blazer (2002), baseado nas proporções relativas de espermatócitos, espermátides e espermatozoides.

As alterações encontradas, nos cortes de fígado, foram analisadas segundo o Índice de Lesão, proposto por Bernet *et al.* (1999). Brevemente, o índice baseia-se no grau de ocorrência da lesão (0 – ausência; 2 – ocorrência ocasional; 4 – ocorrência moderada; 6 – alta ocorrência) e seu respectivo fator de importância que determina a relevância da lesão, dependendo da importância patológica, sendo: 1 – importância mínima, a lesão é facilmente reversível; 2 – importância moderada, a lesão é reversível se a perturbação for removida; 3 – importância pronunciada, lesão irreversível, comprometendo as funções do órgão. O índice é calculado a partir da equação:

$$IL = \sum_{pr} \sum_{alt} (a \times w)$$

Onde: *pr* = padrão de reação; *alt* = alteração; *a* = grau de ocorrência da alteração; *w* = fator de importância da alteração.

As brânquias foram fixadas em Fixador Karnovsky e desidratadas em série crescente de etanol (Merck®). Em seguida, foram submetidas ao ponto crítico (CO₂) e metalizadas. Posteriormente, foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Scanning Electron Microscope) JEOL JSM – 6360LV.

3.7 ANÁLISES DE GENOTOXICIDADE

As análises de genotoxicidade foram realizadas em parceria com o laboratório de Mutagênese Ambiental (departamento de Genética – UFPR).

- *Alterações morfológica nucleares (AMN)*

O sangue coletado da veia caudal foi utilizado para avaliação de micronúcleos e outras alterações morfológicas nucleares. Uma gota de sangue, de cada amostra coletada, foi colocada em lâmina de microscopia e foi realizado um esfregaço. Essas lâminas foram secas em temperatura ambiente por 24 horas e em seguida fixadas em etanol absoluto por 30 minutos. Por fim, foram coradas com laranja de acridina.

As alterações nucleares foram categorizadas, baseado nos critérios propostos por Carrasco *et al.* (1990), da seguinte forma: micronúcleos, núcleos “lobed”, núcleos “blebbed”, núcleos “notched” e núcleos vacuolizados. Foram analisados 2000 eritrócitos por peixe em um aumento de 1000x em um microscópio de epifluorescência e o resultado é o valor médio da soma de todas as alterações encontradas.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis bioquímicas, hepatossomáticas e de genotoxicidade foram separadamente analisadas por uma ANOVA unifatorial ($\alpha=0,05$), seguido do teste de comparações *a posteriori* Scott-Knott (SCOTT & KNOTT, 1974). A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Cochran, respectivamente. Para atender a ambos pressupostos da análise de variância, os dados foram transformados, quando

necessário, para raiz quadrada. Como o índice de lesão (Bernet *et al.*, 1999) possui um conjunto reduzido de valores possíveis, não se enquadrando como uma variável aleatória com distribuição normal, diferenças entre os reservatórios foram verificadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Adicionalmente, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) para investigar a relação entre as variáveis bioquímicas (SOD, CAT, GSH, GST, LPO e PCO) e os reservatórios avaliados. As variáveis foram checadas quanto a normalidade, existência de *outliers* e colinearidade e padronizadas para a realização da análise.

As análises estatísticas e gráficos foram gerados no ambiente R (R Core Team, 2014), utilizando os pacotes "outliers" (KOMSTA, 2011), "ScottKnott" (JELIHOVSCHI *et al.*, 2014) e "sciplot" (MORALES, 2012), "vegan" (OKSANEN *et al.*, 2012)

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES QUÍMICAS

Apenas os metais cobalto, zinco e manganês foram detectados em concentrações acima do limite de detecção do aparelho (TABELA 1). Entretanto, as concentrações encontradas estão abaixo daquelas estipuladas pelo CONAMA nº 357 (2005) para manutenção da qualidade da água. Portanto, não foi observado concentrações que oferecessem risco a biota e a saúde, segundo a legislação.

Entretanto, altas concentrações foram detectadas nos tecidos – fígado e músculo – dos indivíduos analisados (TABELA 2). No fígado, foi observada a acumulação de metais na seguinte ordem: Zinco (Zn) > Cobre (Cu) > Manganês (Mn) > Chumbo (Pb) > Cobalto (Co), e as maiores concentrações de todos os metais ocorreram em SG.

No músculo, a acumulação de Zn foi maior, seguida de Mn e Pb. Os metais ocorreram em concentrações similares, variando minimamente em todos os reservatórios, não sendo possível determinar onde houve maior bioacumulação.

TABELA 1 – Concentrações de metais (mg/L) detectadas nos reservatórios do Rio Iguaçu (SC=Salto Caxias; SO=Salto Osório; SS=Salto Santiago; SG=Segredo). Cobalto (Co), Chumbo (Pb), Zinco (Zn), Manganês (Mn), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Níquel (Ni), Cádmio (Cd). LD = Limite de detecção do aparelho.

	Co	Pb	Zn	Mn	Cu	Cr	Ni	Cd
CONAMA	0,05	0,01	0,18	0,1	0,009	0,05	0,025	0,001
SC	<LD	<LD	0.038	0.12	<LD	<LD	<LD	<LD
SO	<LD	<LD	0.039	0.10	<LD	<LD	<LD	<LD
SS	0.024	<LD	0.067	0.09	<LD	<LD	<LD	<LD
SG	<LD	<LD	0.060	0.12	<LD	<LD	<LD	<LD

TABELA 2 – Concentrações de metais (mg/kg) detectadas nos tecidos (Mus = músculo; Fíg= fígado) de *Oreochromis niloticus* alocados nos reservatórios de Rio Iguaçu (SC=Salto Caxias; SO=Salto Osório; SS=Salto Santiago; SG=Segredo). Cobalto (Co), Chumbo (Pb), Zinco (Zn), Manganês (Mn), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Níquel (Ni), Cádmio (Cd). LD = Limite de detecção.

	Co		Pb		Zn		Mn		Cu	
	Mus	Fíg	Mus	Fíg	Mus	Fíg	Mus	Fíg	Mus	Fíg
SC	<LD	<LD	2,44	5,13	31,00	436,33	5,23	12,26	<LD	26,98
SO	<LD	0,08	1,94	5,35	31,29	322,82	5,70	12,09	<LD	40,12
SS	<LD	0,14	1,36	3,73	29,14	269,15	5,76	8,85	<LD	78,31
SG	<LD	1,28	3,37	7,46	28,48	554,82	4,87	20,13	<LD	94,39

	Cr		Ni		Cd	
	Mus	Fíg	Mus	Fíg	Mus	Fíg
SC	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
SO	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
SS	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
SG	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

4.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

No presente estudo, a atividade hepática da superóxido dismutase (SOD) não diferiu entre os grupos SC, SS e SG, contudo houve um decréscimo significativo no reservatório de SO (ANOVA, $gl=3:92$; $F=4,352$; $p<0,007$) (FIGURA 3a). Por outro lado, a atividade da catalase (CAT) foi significativamente induzida em SO comparativamente aos demais reservatórios, que não diferiram entre si (ANOVA, $gl=3:97$; $F=16,85$; $p<0,0001$) (FIGURA 3b).

As concentrações médias de tióis não protéicos (GSH e outros tióis) apresentaram diferenças extremamente significativas entre os reservatórios (ANOVA, $gl=3:101$; $F=9,142$; $p<0,0001$) (FIGURA 3c). O grupo transferido para SG apresentou as menores concentrações observadas, diferindo de todos os grupos.

A atividade da glutatona S-transferase (GST) apresentou diferenças significativas entre os reservatórios. O grupo de SC apresentou uma inibição da atividade dessa enzima, diferindo dos demais reservatórios (ANOVA, $gl=3:100$; $F=5,708$; $p<0,001$) (FIGURA 3d).

Os níveis médios de peroxidação lipídica (LPO) diferiram significativamente entre os reservatórios (ANOVA, $gl=3:97$; $F=3,018$; $p<0,05$) (FIGURA 3e). O grupo

alocado no reservatório de SS apresentou concentrações significativamente maiores de hidroperóxidos em relação aos demais reservatórios, que não variaram entre si. Enquanto que os níveis de carbonilação de proteínas (PCO) (ANOVA, $g/3:88$; $F=2,188$; $p>0,05$) (FIGURA 3f) não apresentaram diferenças significativas entre os reservatórios avaliados.

Finalmente, a atividade da AChE, no músculo, foi significativamente inibida em SC, SO e SG quando comparado aos indivíduos de SS (ANOVA, $g/3:101$; $F=4,287$; $p<0,007$) (FIGURA 4)

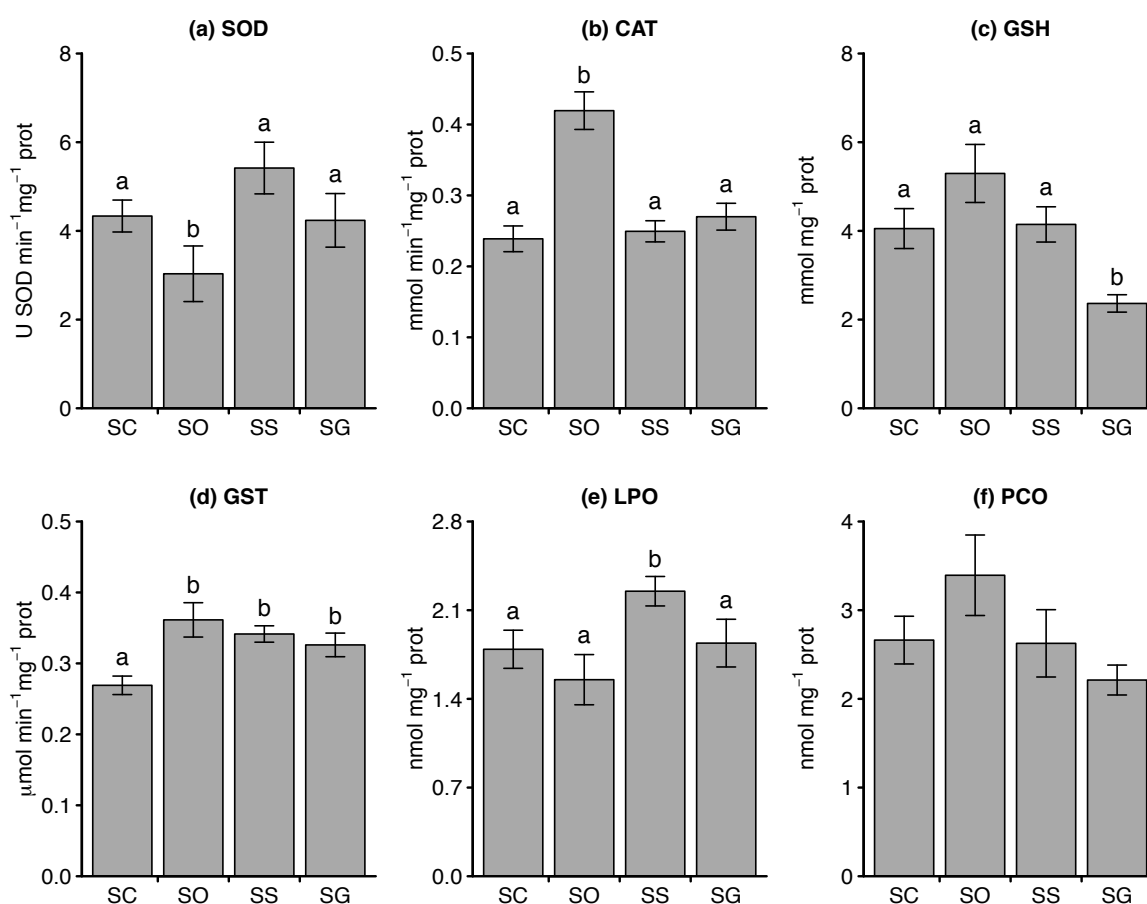


FIGURA 3 - Atividade da (a) superóxido dismutase (SOD); (b) catalase (CAT); níveis de (c) glutatona reduzida (GSH); atividade da (d) glutatona S-transferase (GST); e níveis de (e) peroxidação lipídica (LPO); (f) carbonilação de proteínas (PCO) (média \pm erro padrão) em fígado de *Oreochromis niloticus* translocados para reservatórios do Baixo Rio Iguaçu (SC=Salto Caxias; SO=Salto Osório; SS=Salto Santiago; SG=Segredo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) pelo teste *a posteriori* de Scott-Knott.

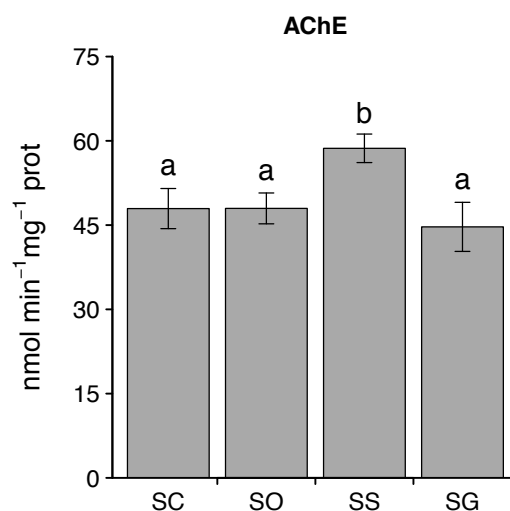


FIGURA 4 - Atividade de acetilcolinesterase (AChE) (média \pm erro padrão) em músculo de *Oreochromis niloticus* alocados em reservatórios do Rio Iguaçu (SC=Salto Caxias; SO=Salto Osório; SS=Salto Santiago; SG=Segredo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste *a posteriori* de Scott-Knott.

4.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

Não foi possível distinguir claramente os reservatórios a partir das respostas dos biomarcadores (FIGURA 5). De maneira geral, houve uma diferença no padrão de respostas encontradas nos reservatórios de Salto Osório e Salto Santiago. Observa-se que o reservatório de SO foi caracterizado por maiores atividades da CAT e altas concentrações de GSH. Enquanto o reservatório de SS apresentou maiores níveis de LPO e maior atividade da SOD. Além disso, a alta atividade da CAT está inversamente relacionada à atividade da SOD e aos níveis de LPO, *i.e.*, o aumento da atividade da CAT está associado a uma diminuição da LPO. Os demais biomarcadores e reservatórios não mostraram um padrão específico. Contudo, vale destacar que apenas 44% da variabilidade dos dados pode ser explicada pelo primeiro (PC1) e segundo componente (PC2).

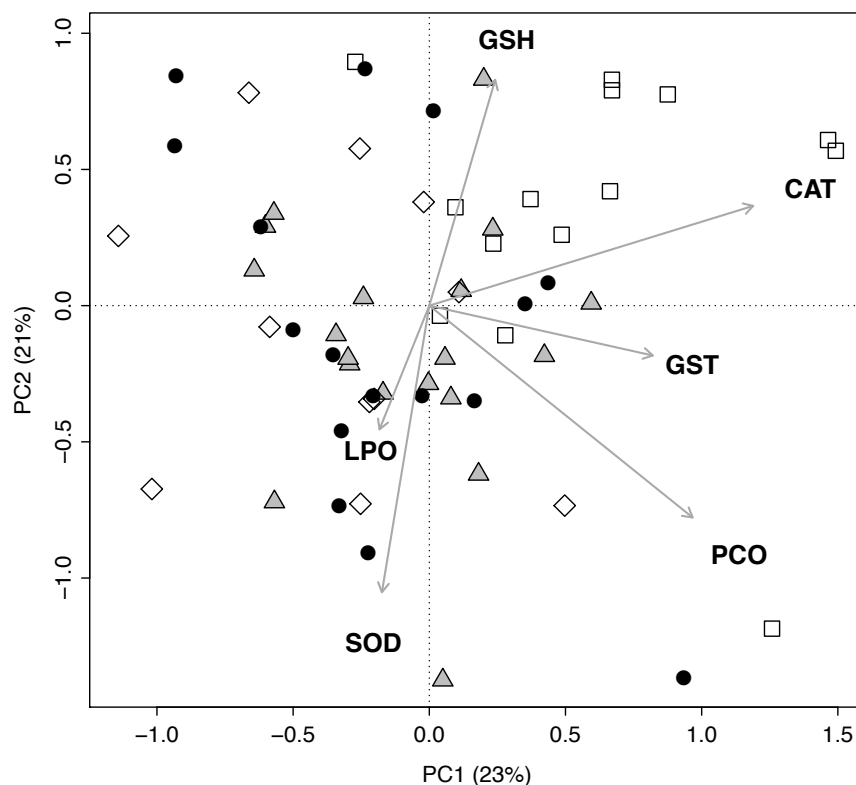


FIGURA 5 – Diagrama da análise de PCA exibindo a relação dos biomarcadores bioquímicos: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); níveis de glutatona reduzida (GSH); glutatona S-transferase (GST); peroxidação lipídica (LPO); carbonilação de proteínas (PCO) e os reservatórios avaliados: Salto Caxias(◇); Salto Osório (□); Salto Santiago(●) e Segredo (▲).

4.4 METABÓLITOS BILIARES DE HPAS

Independentemente do comprimento de onda empregado, foram detectadas diferenças significativas entre os grupos (FIGURA 6). Nos reservatórios de Salto Osório (SO) e Salto Santiago (SS), foram detectadas elevadas concentrações de compostos com 2 anéis aromáticos (metabólitos de naftaleno) ($gl=3:16$; $F=4,23$; $p<0,05$) (FIGURA 6a). Os compostos com 4 ($gl=3:16$; $F=7,805$; $p<0,001$), 5 ($gl=3:16$; $F=5,942$; $p<0,007$) e 6 ($gl=3:16$; $F=3,201$; $p<0,05$) anéis aromáticos, características de metabólitos de pireno, benzo(a)pireno e benzo(ghi)perileno, respectivamente, apresentaram altas concentrações apenas no reservatório de SS.

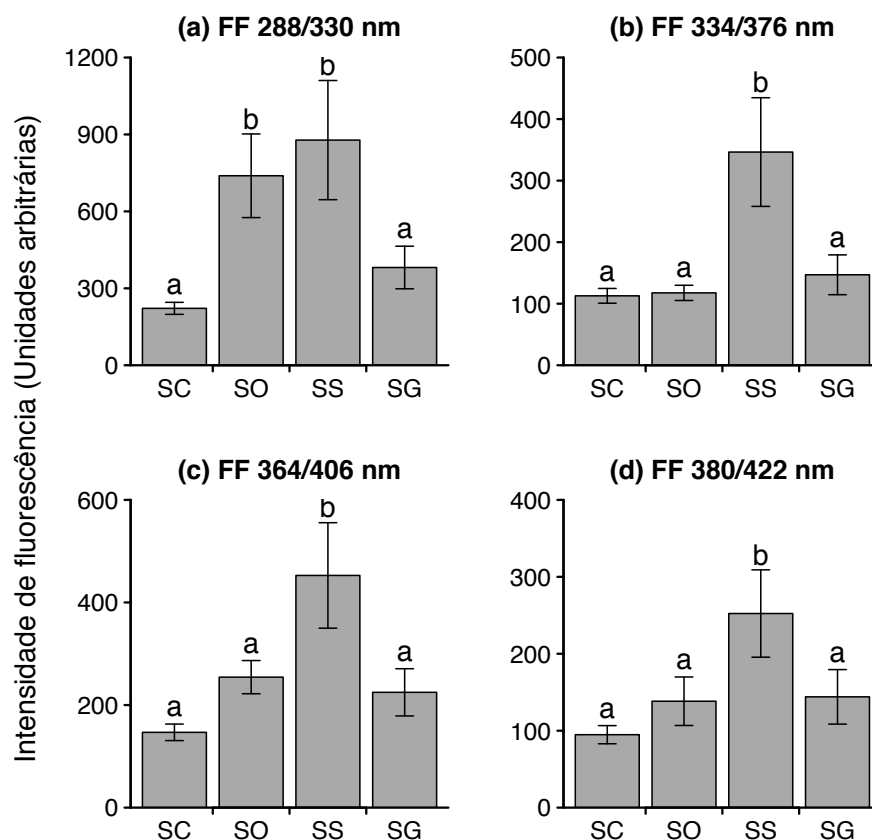


FIGURA 6 - METABÓLITOS BILIARES DE HPAs. Fluorescência em comprimento de onda fixo (\pm ep) da bile, refletindo níveis de metabólitos de HPAs dos peixes alocados em reservatórios do Rio Iguazu (SC=Salto Caxias; SO=Salto Osório; SS=Salto Santiago; SG=Segredo) (a) FF 288/330 (2 anéis - metabólitos de naftaleno); (b) FF 334/376 (4 anéis - metabólitos de pireno); (c) FF 364/406 (5 anéis - metabólitos de benzo(a)pireno); (d) FF 380/422 (6 anéis - metabólitos de benzo(ghi)perileno). Níveis expressos como intensidade de fluorescência. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste *a posteriori* de Scott-Knott.

4.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

4.4.1 Histopatologia do fígado de *Oreochromis niloticus*

O fígado é uma glândula digestiva composta por parênquima celular (hepatócitos) e por fibras que promovem sua sustentação. A estrutura do fígado da espécie *Oreochromis niloticus* é similar àquela descrita para outras espécies de água doce, como *Hoplias malabaricus* e *Pimelodus maculatus* (DE ANDRADE BRITO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2009; LIEBEL *et al.*, 2013). No fígado de teleosteos não é possível distinguir subdivisões hexagonais do parênquima (lóbulo hepáticos).

As tríades portais, constituídas pela ramificação da veia porta, a artéria hepática e ducto biliar, são indistintos, se não ausentes, em quase todos os teleósteos. Os hepatócitos apresentam-se como células grandes e poliédricas, com núcleos arredondados, formando cordões ao redor de sinusóides capilares que irradiam de uma veia central (FIGURA 7A).

Os indivíduos apresentaram diversos danos, tais como áreas de necrose (FIGURA 7B), eventos pré-necróticos, como a infiltração de células inflamatórias (FIGURA 7C e 7D) e inflamação ao redor de vasos e ductos, *i.e.* granulomatose perivascular e peritubular, respectivamente (FIGURA 7E e 7F). A ocorrência dos principais danos consta na TABELA 3. Destaca-se a maior ocorrência de granulomatose em SS, em relação aos outros reservatórios. Contudo, o índice de lesões hepáticas não diferiu significativamente entre os reservatórios (teste de Kruskal-Wallis, $p>0,4$) (FIGURA 8). Melanomacrófagos livres e centros de melanomacrófagos também foram observados em alguns exemplares, embora não tenha sido realizada uma análise quantitativa.

TABELA 3 - Ocorrência dos danos histopatológicos (%) encontrados em *Oreochromis niloticus* alocadas nos reservatórios do Rio Iguazu.

Lesão	Salto Caxias	Salto Osório	Salto Santiago	Segredo
Necrose	100	92,3	100	100
Infiltração leucocitária	78,6	69,2	67	72,2
Granulomatose	28,6	23,1	66,7	27,3

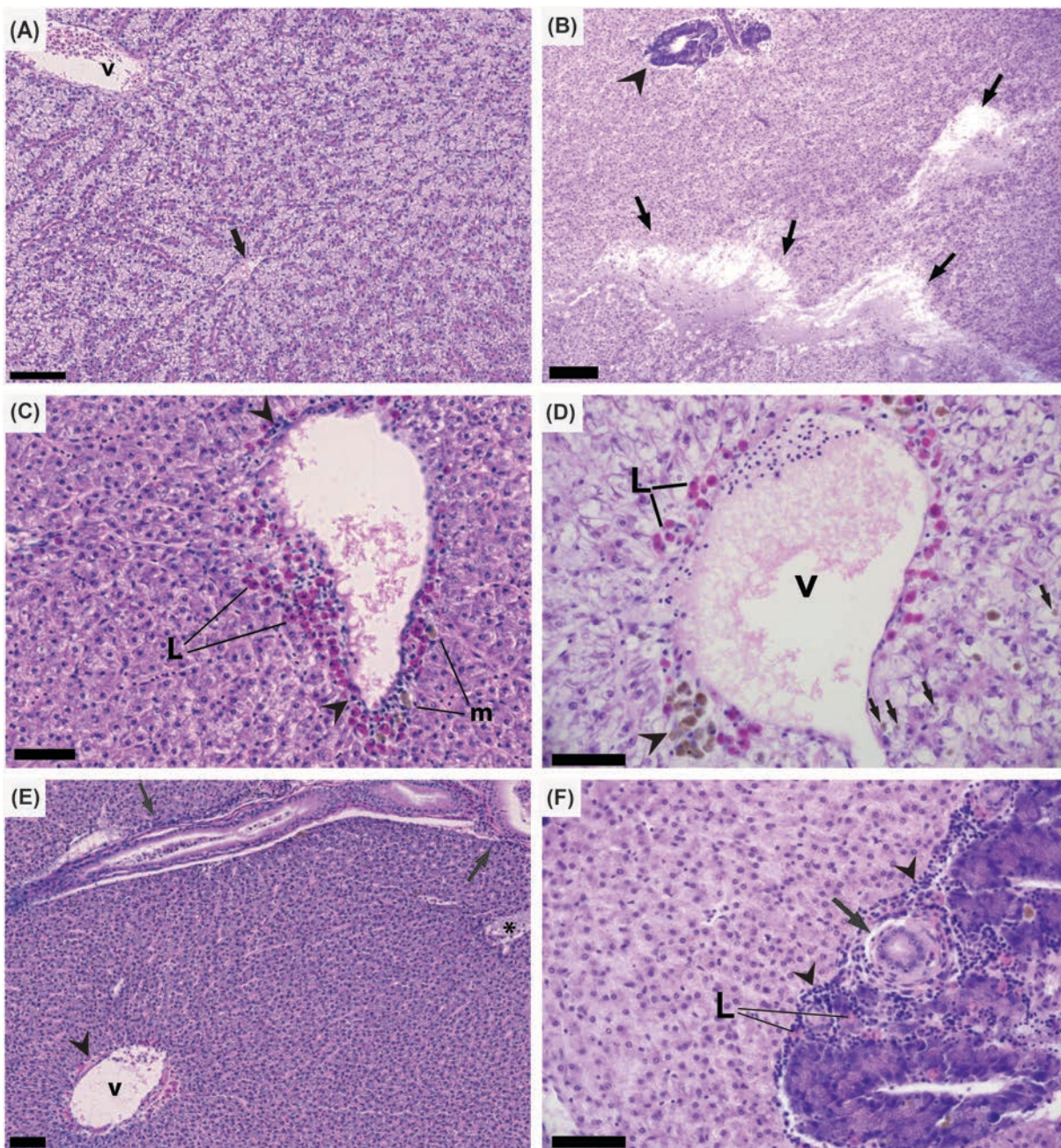


FIGURA 7 - Organização estrutural do fígado de *Oreochromis niloticus* e principais lesões encontradas. **(A)** Parênquima hepático normal, com hepatócitos em formato poliédrico, veia centro lobular com eritrócitos (v) e vaso (→). **(B)** Extensa área de necrose (→) próxima ao tecido pancreático (▷). **(C)** Presença de diferentes tipos de leucócitos (L) e (▷) e melanomacrófagos (m) ao redor de uma veia centro lobular (v). **(D)** Veia centro lobular com leucócitos (L), centro de melanomacrófagos (▷). Citoplasma apresenta depósitos granulares, consistentes com colestase (→). **(E)** Granulomatose peritubular (→) e perivascular (▷), área de necrose (*). Observe o espessamento do tecido ao redor da veia e do ducto, devido à inflamação. **(F)** Área com amplo processo inflamatório, apresentando granulomatose peritubular (→), infiltração leucocitária (▷). Note que em **(B)**, **(C)** e **(E)** os hepatócitos apresentam citoplasma altamente basófilo. Escalas **(A)** – **(C)** e **(E)** = 100 µm; **(D)** e **(F)** = 50 µm. Coloração HE.

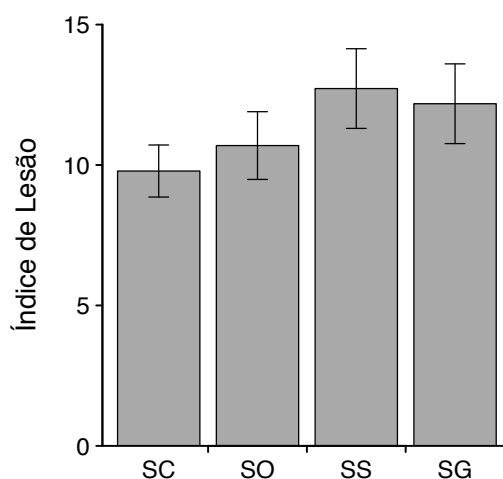


FIGURA 8 - Índice de lesão (calculado segundo Bernet *et al.*, 1999) do fígado de *Oreochromis niloticus*, alocados em reservatórios do Rio Iguaçu. (SC=Salto Caxias; SO=Salto Osório; SS=Salto Santiago; SG=Segredo).

4.4.2 Histopatologia de gônadas masculinas de *Oreochromis niloticus*

Todos os indivíduos avaliados eram sexualmente maduros e os cortes histológicos apresentaram tecido testicular normal e bem preservado. O estágio espermatogênico intermediário, que apresenta proporções iguais de espermatócitos, espermatídes e espermatozoides, foi predominante, ocorrendo em 91% dos cortes analisados (FIGURA 9B). O estágio pré-espermatogênico ou testículos regredidos, que contém apenas espermatogônia com a presença eventual de espermatozoides, foi menos frequente, sendo observado apenas em alguns indivíduos (8,5%) (FIGURA 9A).

Foi observada a presença de leucócitos (FIGURA 9C) e melanomacrófagos (FIGURA 9D) em alguns dos cortes analisados, sendo estes o único tipo de alteração observada.

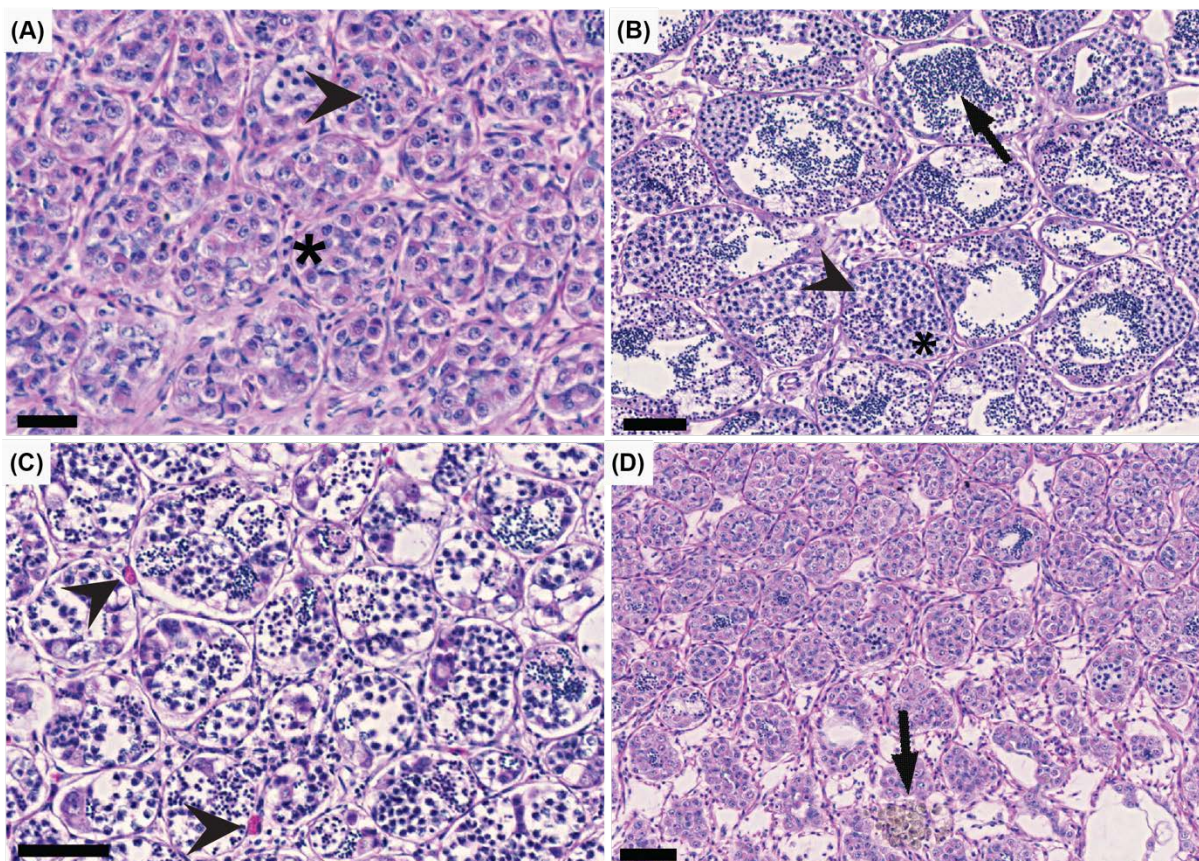


FIGURA 9 - Gônadas de machos de *Oreochromis niloticus* em diferentes estágios de espermatogênese: **(A)** pré-espermatogênico ou regredido, contendo um predomínio de espermatogônia (*), apesar de apresentar alguns espermatozoides no lúmen lobular (➤). **(B)** espermatogênico intermediário, apresentando proporções iguais de espermatócitos (➤), espermátides (*) e espermatozoides (➔). **(C)** Presença de leucócitos entre os túbulos seminíferos (➤), indivíduo em estágio espermatogênico intermediário. **(D)** Presença de centro de melanomacrófagos (➔), indivíduo em estágio pré-espermatogênico. Escalas **(A)** = 25µm; **(B)** - **(D)** = 50µm. Coloração HE.

4.4.3 Ultraestrutura de brânquias de *Oreochromis niloticus*:

As brânquias apresentaram estruturas já descritas para teleósteos. Lamelas secundárias estão lateralmente dispostas nas lamelas primárias e constituem área responsável pelas trocas gasosas (FIGURA 10A). Apresentam células de cloreto, que possuem papel importante na osmorregulação, e microdigitações das células pavimentosas, que são estruturas responsáveis pela distribuição de muco sobre a superfície do epitélio (EVANS *et al.*, 2005). Alterações na estrutura e organização das brânquias dos indivíduos alocados para o Rio Iguaçu foram observadas em todos os reservatórios avaliados. Aumento das células de cloreto (Figura 10B), perda das microdigitações (FIGURA 10B), hipertrofia das lamelas secundárias (FIGURA 10C) bem como hiperplasia da lamela primária, com princípio de fusão

parcial das lamelas secundárias (FIGURA 10D), foram observadas em todos os grupos.

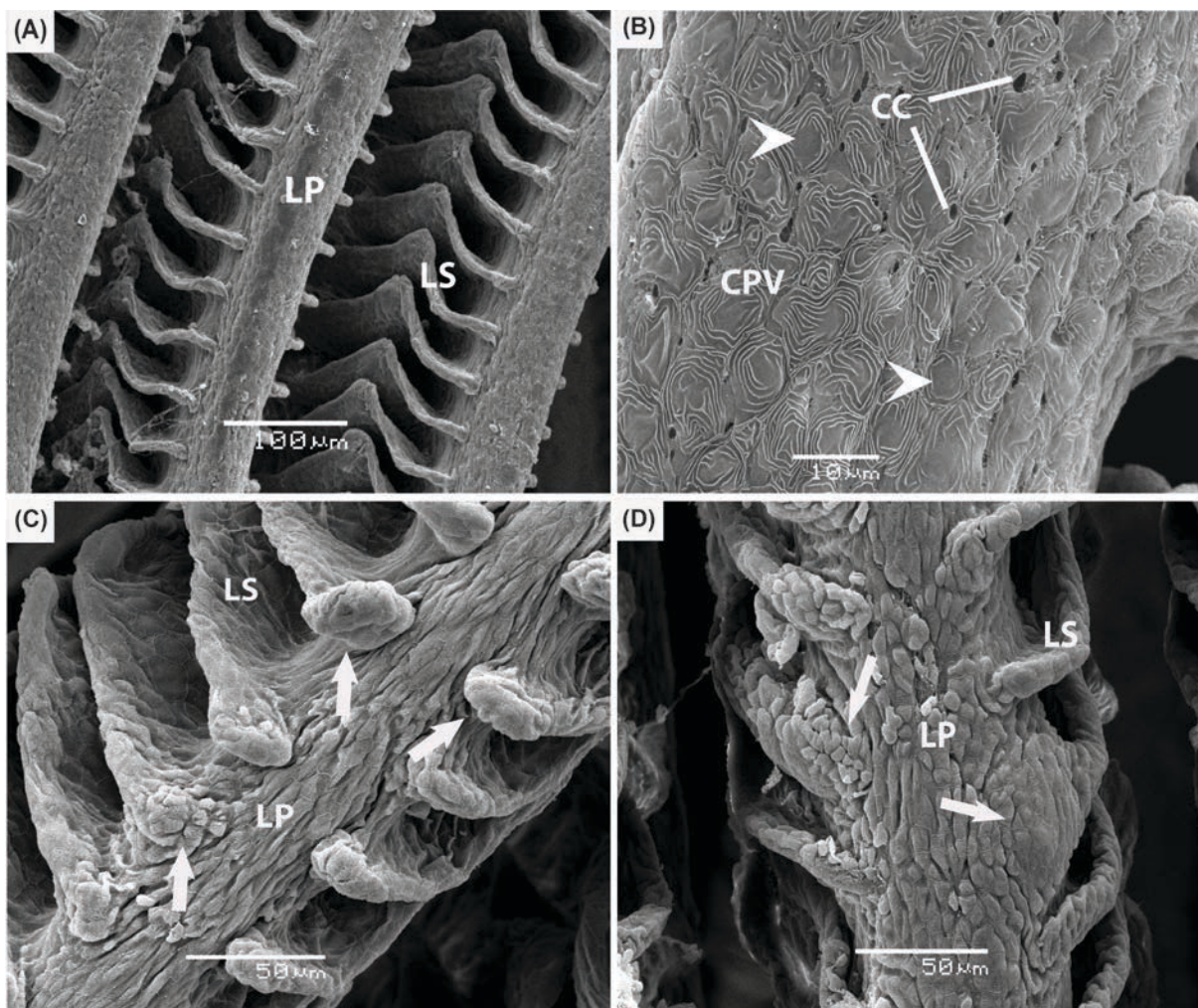


FIGURA 10 - Ultraestrutura das brânquias de *Oreochromis niloticus* alocadas nos reservatórios do Rio Iguaçu. (A) Brânquias normais, sem alterações nas lamelas primárias (LP) ou secundárias (LS); (B) Perda das microditações (▶) das células pavimentosas (CPV) e aumento das células de cloreto (CC); (C) Hipertrofia das lamelas secundárias (▶); (D) Hiperplasia da lamela primária e início de fusão de lamelas secundárias (▶).

4.6 ANÁLISE DE GENOTOXICIDADE

Os eritrócitos dos peixes transferidos para os reservatórios apresentaram anormalidades morfológicas nucleares, como micronúcleos, núcleos *blebbed*, *lobed*, *notched* e vacuolados. As ocorrências de cada tipo de anormalidade morfológica nuclear constam na TABELA 4, com os núcleos tipo “blebbed” e tipo “notched” foram os mais predominantes. Essas anormalidades foram significativamente induzidas nos reservatórios de SC, SO e SG, comparativamente ao reservatório de SS, que

apresentou médias menores ($g/l=3:57$; $F=3,586$; $p<0,05$) (FIGURA 11). nos eritrócitos dos peixes alocados nos reservatórios do Rio Iguaçu.

TABELA 4 – Ocorrência das alterações morfológicas nucleares observadas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* alocados para reservatórios do Rio Iguaçu.

	Micronúcleo	“Blebbed”	“Lobed”	“Notched”	“Vacuolizado”
Salto Caxias	2	127	5	387	70
Salto Osório	4	148	4	318	20
Salto Santiago	2	41	0	173	34
Segredo	6	93	2	288	72

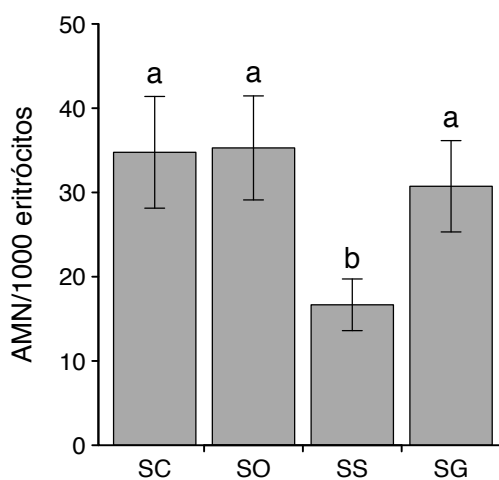


FIGURA 11 - Alterações morfológicas nucleares (AMN) (média \pm erro padrão) encontradas em *Oreochromis niloticus* alocados em reservatórios do Rio Iguaçu. (SC=Salto Caxias; SO=Salto Osório; SS=Salto Santiago; SG=Segredo). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) pelo teste *a posteriori* de Scott-Knott.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi possível observar que os sessenta dias de exposição às águas dos reservatórios do Rio Iguaçu foram suficientes para provocar respostas em *Oreochromis niloticus* nos distintos níveis de organização analisados, como a nível do indivíduo, celular e molecular. Baseados em levantamentos de qualidade da água (IAP, 2009), considerou-se um presumido gradiente de contaminação, no qual o reservatório de Segredo apresenta o maior nível de degradação e o reservatório de Salto Caxias, tomado como referência, apresenta os menores níveis de contaminação. Observou-se variações significativas dos índices morfométricos, bem como dos biomarcadores bioquímicos e genéticos, entretanto não há um padrão claro nas respostas para definição deste gradiente.

As análises químicas da água mostraram que não houve diferenças nas concentrações de metais, já que ocorreram em todos os reservatórios abaixo do nível de contaminação permitido pelo CONAMA. Entretanto, porque os metais tendem a acumular em tecidos em concentrações até 2000 vezes maiores que as encontradas nas águas circundantes (MOHAMED, 2008), altas concentrações de Zn, Cu, Mn, Pb e Co foram detectadas no fígado e músculo de *O. niloticus* alocados para os reservatórios do Rio Iguaçu. As maiores concentrações de todos os metais foram detectadas nos fígados dos indivíduos alocados para o reservatório de Segredo, sendo este um padrão recorrente na literatura (YAP *et al.*, 2015) e sugere uma maior biodisponibilidade desse metal no local que podem levar a respostas deletérias dos peixes.

Trabalhos pretéritos observaram grande acumulação de metais – em níveis similares aos observados neste estudo – nos tecidos de *Oreochromis niloticus* expostos a efluentes domésticos e/ou resíduos industriais (MOHAMED, 2008; EL-NAGGAR *et al.*, 2009; YAP *et al.*, 2015; DWIVEDI *et al.*, 2015). Contudo, as concentrações de Zn observadas em todos os reservatórios excederam àquelas descritas na literatura para o fígado (até 100 mg/kg), sugerindo uma grande ocorrência de resíduos domésticos, principalmente em Segredo, visto que a essa é principal fonte do metal (EL-NAGGAR *et al.*, 2009). O padrão de acumulação normalmente encontrado, descreve o fígado como o órgão com maiores níveis de acumulação, devido a atividade de enzimas que se ligam a metais para diminuir a sua toxicidade (YAP *et al.*, 2015). Sendo assim, altos níveis de bioacumulação

podem provocar diversas alterações bioquímicas e histológicas ou até alterações em maiores níveis de organização (MOHAMED, 2008).

A nível celular, foram observadas alterações no tecido hepático avaliado através da histopatologia. As principais lesões encontradas neste trabalho foram necrose e processos inflamatórios, como infiltração de leucócitos, centros de melanomacrófagos e granulomatose. Os centros de melanomacrófagos são agrupamentos de monócitos que possuem pigmentos como melanina e lipofucsina, compostos que agem contra radicais livres, cátions e compostos tóxicos e atuam contra infestações parasitárias (CAMPOS *et al.*, 2008). Assim como as infiltrações leucocitárias, os melanomacrófagos são relacionados com a primeira linha de defesa do organismo (RABITTO *et al.*, 2005). Necrose é a morte de uma célula ou parte de um tecido em um organismo vivo, sendo considerada relativamente comum em peixes (OLIVEIRA RIBEIRO e NARCISO, 2013). Entretanto, a alta incidência em todos os reservatórios é indicativo de que há uma redução da qualidade da água com comprometimento da saúde dos peixes.

A alta ocorrência de infiltração leucocitária pode estar relacionada a presença de necrose. Considerando que a necrose está associada ao comprometimento da membrana celular, que constitui uma barreira física, a lesão desta estrutura pode implicar no aumento da presença de antígenos, conseqüentemente ativando o recrutamento de leucócitos. Além de estarem associadas a eventos de necrose, respostas inflamatórias podem ser atribuídas também a presença de parasitas ou estresse nutricional. Respostas como granulomatose peritubular e perivascular, com alta ocorrência em SS, estão normalmente associadas a presença de parasitas, bactérias ou fungos (BUCKE *et al.*, 1996; OTTEM *et al.*, 2009), apesar de não ter sido observada nas análises desse experimento. Granulomas caracterizam-se por intensa reação fibroblástica formando uma cápsula espessa, tendo de permeio, nas regiões mais externas, macrófagos e linfócitos (CAMPOS *et al.*, 2008).

Coimbra *et al.* (2007) observaram um aumento de células inflamatórias (melanomacrófagos e eosinófilos) ao redor de vasos como uma resposta a exposição a pesticidas. Adicionalmente, van Dyk *et al.* (2012) observaram essas respostas em bagres (*Clarias gariepinus*) expostos a misturas complexas de contaminantes. Talvez em Salto Santiago a interação dos contaminantes que entram no reservatório contribua para predominância de eventos inflamatórios como um mecanismo de defesa para superar os impactos negativos dos contaminantes.

Sendo assim, embora o índice de lesão de Bernet (BERNET *et al.*, 1999) não tenha mostrado diferenças de exposição entre grupos, é sugestivo que as lesões histopatológicas encontradas sejam resultantes da contaminação ambiental, uma vez que foram encontradas em todos os reservatórios

Contaminantes podem exercer sua toxicidade através do estresse oxidativo, aumentando a produção de espécies reativas ou até mesmo inibindo o sistema antioxidante das células (AMEUR *et al.*, 2012). Os sistemas de defesa (antioxidantes) que inibem a formação de espécies reativas incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Essas enzimas são comumente aplicadas como biomarcadores, porém apresentam alta variabilidade de respostas a poluentes específicos e a misturas complexas de poluentes. Além disso, a atividade enzimática pode permanecer inalterada, aumentar ou diminuir dependendo da espécie de peixe estudada (van der OOST *et al.*, 2003).

A inibição da atividade da SOD, como o observado em SO, pode estar relacionado a falhas nos mecanismos de defesa antioxidante (LENÁRTOVÁ *et al.*, 1997; VUTUKURU *et al.*, 2006; SAGLAM *et al.*, 2014). O aumento da geração de radicais superóxido, após exposição a metais ou a contaminantes orgânicos, pode atuar inibindo a atividade da SOD. Entretanto, respostas enzimáticas a xenobióticos exibem um aumento inicial de atividade devido a indução, seguido de um decréscimo devido a taxas catabólicas e/ou inibição direta pelo composto ao qual o indivíduo foi exposto (VIARENGO *et al.*, 2007).

A alta atividade da CAT, observada no reservatório SO, pode estar contribuindo para a inibição da SOD no mesmo reservatório. A taxa de degradação do H₂O₂ pela CAT é muito maior que sua taxa de geração pela SOD e, por isso, essa espécie reativa é prontamente convertida (BOELSTERLI, 2007). Possivelmente, devido a elevada taxa de catabolismo exibida pela CAT, houve a inibição da atividade da SOD. Adicionalmente, um xenobiótico pode induzir a transcrição de antioxidantes e o aumento de mRNAs pode não ser igualmente representado no nível proteico. Assim, o decréscimo da atividade de alguns antioxidantes pode induzir um aumento da transcrição, por vezes não detectada pontualmente (BOELSTERLI, 2007).

Além dos mecanismos de defesa enzimáticos, os níveis de GSH em células hepáticas garantem respostas eficientes a potenciais injúrias que xenobióticos possam causar. GSH age não-enzimaticamente ou como co-substrato em sistemas

enzimáticos, como GST. A GSH está envolvida em diversos processos bioquímicos importantes à manutenção celular: síntese proteica, transporte de aminoácidos e mais amplamente detoxificação celular (GATÉ *et al.*, 1999). Age como um substrato ou cofator para reações enzimáticas, como conversão de H₂O₂ em água e redução de hidroperóxidos lipídicos (ELIA *et al.*, 2006). Portanto, a quantificação da variação dos níveis de GSH é importante em estudos de biomonitoramento.

Trabalhos pretéritos desenvolvidos em laboratório e campo, observaram aumento dos níveis de GSH após exposição a metais (CHEN *et al.*, 1998; EROGLU *et al.*, 2015), PCBs (STEIN *et al.*, 1993), HPAs (OLIVEIRA *et al.*, 2008), herbicidas (STARA *et al.*, 2012) e a misturas complexas de poluentes (ALMROTH *et al.*, 2008). Concentrações significativamente altas de GSH no fígado podem ser interpretadas como um mecanismo adaptativo celular. Sob condições de estresse oxidativo moderado ou baixo, pode ocorrer um aumento na síntese de GSH e na atividade de enzimas detoxificantes. Já em condições severas de estresse, a célula pode apresentar uma redução dos níveis de GSH e das atividades enzimáticas antioxidantes (STARA *et al.*, 2012). Assim, os altos níveis de GSH encontrados em SC, SS e principalmente SO, podem representar uma resposta ao estresse oxidativo baixo a moderado induzido nesses locais. Enquanto os baixos níveis observados em SG podem refletir condições ambientais mais deletérias.

A atividade da GST depende dos níveis de GSH, uma vez que catalisa sua conjugação a uma variedade de xenobióticos (ZHU *et al.*, 2013). A sua indução em SO, SS e SG sugere que a presença de xenobióticos ativou o sistema de biotransformação das células hepáticas, mas sem alteração nos níveis de GSH. Apenas em SG, a alta atividade da GST levou a depleção de GSH. Possivelmente, nesse reservatório, a presença de xenobióticos exija mais do sistema de biotransformação para levar a essa resposta. Trabalhos pretéritos reportaram a indução dessa enzima após exposição a metais (EROGLU *et al.*, 2014), HPAs (SHAIJALA *et al.*, 2003) e misturas complexas de contaminantes (LENÁRTOVÁ *et al.*, 1997), com redução significativa de GSH apenas em situações de agressão mais pronunciada (OSÓRIO *et al.*, 2013).

As defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas são cruciais para integridade celular. Decréscimos significativos podem resultar em danos a macromoléculas, como DNA, proteínas e lipídios. O estresse oxidativo, ao qual as células estão submetidas, deve ser demasiado para danificar essas moléculas, uma

vez que a defesa antioxidante é robusta e altamente regulada transcricionalmente (BOELSTERLI, 2007). Assim, a ausência de diferenças significativas de danos proteicos, indicados pelos níveis de PCO, e as baixos níveis de LPO encontrados nos reservatórios de SC, SO e SG sugerem que o sistema antioxidante do fígado respondeu de maneira eficiente ao impacto nesses locais. Contrariamente, o alto dano lipídico observado em SS pode refletir um sistema antioxidante sobrecarregado, incapaz de proteger a células de eventuais injúrias.

Freire *et al.* (2015) observou, em lambaris (*Astyanax spp.*) do Alto Iguaçu, que a atividade da CAT tem uma relação indireta com os níveis de LPO (*i.e.* quando há uma menor atividade da CAT, observa-se maior dano lipídico). No presente trabalho, a maior atividade da CAT ocorreu no reservatório de SO, onde não foi observado danos lipídicos. Entretanto, onde houve menor atividade da CAT e não ocorreu aumento da LPO, a atividade da SOD foi alta, o que sugere que essa primeira linha de defesa foi suficiente para impedir eventuais danos. Exceto em Salto Santiago, a indução da SOD não foi suficiente para conter a peroxidação lipídica. O acúmulo de H_2O_2 pode danificar a CAT e inibir sua atividade (GUZMÁN-GUILLÉN *et al.*, 2014), possibilitando que a ação de EROs prejudique compartimentos específicos da célula.

A análise de componentes principais (PCA) confirmou a relação inversa da atividade da CAT com a LPO, bem como identificou a existência de uma relação desta enzima com a atividade da SOD. Além disso, esses padrões de respostas estiveram associados especificamente aos reservatórios de SO e SS, que parecem se diferenciar baseados nas respostas bioquímicas observadas. Essa análise de ordenação mostrou-se uma ferramenta útil para identificar padrões envolvendo respostas múltiplas, integrando eficientemente os resultados.

Tal como LPO e PCO, alterações morfológicas nucleares (AMN) são importantes biomarcadores de efeito, utilizados para avaliação da qualidade da água e o potencial risco de contaminação para diferentes espécies (NWANI *et al.*, 2015). A indução dessas alterações já foi extensamente descrita na literatura como resposta a diferentes tipos de contaminantes em espécies distintas, como carpa (*Cyprinus carpio*) e cascudo (*Corydoras paleatus*) expostas a metais pesados (CAVAS *et al.*, 2005a; KUMAR *et al.*, 2013) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta a efluentes de uma refinaria de petróleo (CAVAS *et al.*, 2005b; SILVA SOUZA *et al.*, 2006). Contudo, o aumento do dano genético é recorrentemente associado a

presença de pesticidas (FREIRE *et al.*, 2015; NWANI *et al.*, 2015), que ocorrem em maiores concentrações em áreas sujeitas a *run-off* agrícola. Logo, o aumento na frequência de AMN nos reservatórios de SC, SO e SG podem estar associados a entrada de pesticidas nessas águas.

Altas concentrações de metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram detectados na bile dos indivíduos avaliados. A detecção dos metabólitos na bile é um biomarcador bem estabelecido. Entre as técnicas utilizadas, a fluorescência em comprimento de onda fixo (*fixed wavelength fluorescence*) é a mais rápida e eficiente para trabalhos de monitoramento. Através de pares de excitação/emissão de comprimentos de onda fixos, é possível determinar a presença de diferentes metabólitos baseado na quantidade de anéis aromáticos (AAS *et al.*, 2000b; BEYER *et al.*, 2010).

Compostos com 2 anéis são provenientes de fontes petrogênicas e aqueles com 3 ou mais são de fontes pirogênicas (NEFF *et al.*, 2004). A presença de metabólitos de ambas as fontes, no reservatório de SS, pode ser resultante da circulação de pequenos barcos na região, lançando diesel ou gasolina (fonte petrogênica). Adicionalmente, HPAs pirogênicos são produtos da queima de matéria orgânica como madeira ou carvão, que podem ser transportados pluvialmente para o reservatório a partir de regiões adjacentes onde possa ter ocorrido. Tanto em SO como em SS, a indústria madeireira tem um papel de destaque nas adjacências, bem como a indústria de papel e papelão e a produção agrícola de soja, milho, feijão, trigo e cevada (TRACTEBEL, 2002). Essas atividades podem contribuir enormemente para constante entrada de HPAs pirogênicos nas águas do reservatório de SS e, conseqüentemente, levar às respostas encontradas nos diversos níveis de organização. Principalmente, quando consideramos a inibição da CAT e a presença de danos lipídicos apresentados pelos indivíduos desse reservatório.

A inibição da acetilcolinesterase (AChE) em músculo é comumente utilizada como biomarcador para avaliar a neurotoxicidade de compostos químicos. Alguns compostos são capazes de interferir na neurotransmissão normal do sistema nervoso parassimpático e simpático de vertebrados e invertebrados (HOLTH *et al.*, 2012). Os resultados encontrados podem ser um reflexo da intensa ocupação agrícola nas regiões estudadas, uma vez que o transporte pluvial pode ser responsável pela introdução de pesticidas e herbicidas, comumente utilizados nas

áreas adjacentes aos reservatórios. A inibição da AChE já foi observada em locais onde há intensa atividade agrícola (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2006), em locais expostos a descarga de esgoto (AL-GHAIS, 2013) como resposta a organofosforados, metais e/ou produtos químicos industriais presentes nos corpos d'água avaliados. Pathiratne *et al.* (2009) descreveu que *Oreochromis niloticus* expostos a fontes difusas de contaminação apresentaram uma inibição significativa da AChE em músculo, bem como observado nos indivíduos alocados nos reservatórios SC, SO e SG, sugerindo que a mistura de contaminantes presentes nesses locais interfere na atividade dessa enzima.

Complementarmente ao fígado, as gônadas de *Oreochromis niloticus* foram avaliadas através das análises histológicas, e as brânquias foram visualizadas através do microscópio de varredura para identificação de lesões histopatológicas. As análises do tecido podem fornecer informações importantes sobre o desenvolvimento do indivíduo. Além disso, é possível detectar lesões capazes de reduzir a capacidade de reprodução (MOHAMED, 2008). No presente trabalho, foi possível observar que os machos estavam no mesmo estágio de desenvolvimento, com a ocorrência eventual de eosinófilos e melanomacrófagos em todos os grupos. Logo, devido a uniformidade dos estágios de desenvolvimento entre grupos observada histologicamente, pode-se inferir, então, que o tecido gonadal não foi afetado pela contaminação dos reservatórios avaliados durante o período do experimento (*i.e.* 60 dias).

As análises das brânquias mostraram que os peixes dos reservatórios sofreram com a exposição, visto que todos os indivíduos apresentaram alterações consistentes com respostas a contaminantes. Perda das microdigações, aumento das células de cloreto, hiperplasia e fusão lamelar já foram observadas em peixes expostos a herbicidas (MELA *et al.*, 2013a), a metais (RABITTO *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2012; MELA *et al.*, 2013b) e a misturas complexas de poluentes (DE ANDRADE BRITO *et al.*, 2012; FREIRE *et al.*, 2015). São alterações comuns e não-específicas, mas que indicam a presença de contaminantes. A pouca especificidade deve-se ao constante contato desse órgão com água e conseqüentemente com poluentes que podem estar presentes. Considerando as diversas respostas dos demais biomarcadores, que refletem a ocorrência de uma mistura complexa de poluentes nos reservatórios do Rio Iguaçu, é esperada a perda de organização epitelial das brânquias, como observada neste trabalho.

As respostas variáveis dos diferentes biomarcadores utilizados evidencia a complexidade da avaliação de ambientes impactados por fontes difusas de misturas de contaminantes. Alguns biomarcadores são mais sensíveis que outros, podem responder diferentemente a classes distintas de contaminantes ou podem mostrar respostas específicas a interações de contaminantes (FREIRE *et al.*, 2015). A utilização de um vasto número de biomarcadores forneceu um panorama integrador para condição dos reservatórios do Rio Iguaçu. Através deles, conclui-se que o gradiente inicialmente esperado não ocorre, uma vez que em Salto Santiago os biomarcadores a nível individual, celular e molecular apresentaram respostas indicativas de uma maior contaminação. Muitas dessas respostas podem estar relacionadas às grandes concentrações de HPAs detectadas, porém não é possível atribuir todos os resultados apenas a esse contaminante. O grande nível de contaminação encontrado em Salto Santiago, indicado pelas diversas respostas encontradas, vão de encontro com a classificação proposta pelo Instituto Ambiental do Paraná, que determina a qualidade da água dessa área como “pouco degradada” (IAP, 2009).

Inicialmente, foi proposto que Segredo seria o reservatório mais degradado e Salto Caxias seria o reservatório referência, considerado o menos degradado de todos. As respostas dos biomarcadores bioquímicos, histológico e genético confirmaram que, de fato, em Segredo há uma grande degradação da qualidade da água, com alterações perceptíveis em todos os níveis de organização investigados. Possivelmente devido a baixa infraestrutura de esgotos e drenagem (ANA, 2009), a ocupação agrícola e a maior proximidade a Curitiba, a entrada de contaminantes e ação nos indivíduos seja mais intensa. Similarmente, as poucas alterações observadas nos indivíduos de Salto Caxias confirmam um menor grau de impacto dessas águas, possivelmente resultante da menor ocupação nas adjacências e maior distância de Curitiba, entretanto ainda foi observada uma degradação da qualidade das águas nesse local.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através deste estudo, pode-se concluir que o biomonitoramento ativo associada à aplicação de múltiplos marcadores foi essencial para avaliação da qualidade das águas.

O monitoramento de áreas como às do Rio Iguaçu, que recebem constantemente misturas complexas de contaminantes através de fontes difusas, exige que o maior número possível de biomarcadores seja utilizado, contemplando diferentes níveis de organização.

Adicionalmente, a espécie *Oreochomis niloticus* mostrou-se um bioindicador relevante, pois adaptou-se bem às condições do procedimento experimental e apresentou respostas relevantes para o estudo. Além disso, a seleção dos biomarcadores neste trabalho foi adequada para avaliar a degradação da qualidade da água nas áreas estudadas.

Esses resultados refletem a necessidade de uma nova abordagem para avaliação de impacto ambiental, baseado não somente nas características físico-químicas da água, mas também nas respostas da biota residente em diferentes níveis de organização, como apresentado no presente estudo. Essas respostas exigem uma interpretação integrada, dessa forma contribuindo para uma conscientização da sociedade e empresas, no tocante do cumprimento de leis ambientais, bem como para o monitoramento e fiscalização destes ecossistemas.

REFERÊNCIAS

AAS, E.; BAUSSANT, T.; BALK, L.; LIEWENBORG, B.; ANDERSEN, O. K. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. **Aquatic Toxicology**, v. 51, n. 2, p. 241–258, 2000a.

AAS, E.; BEYER, J.; GOKSOYR, A. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. **Biomarkers**, v. 5, p. 9-23, 2000b.

ADAMS, S. M. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n. 8-12, p. 649–657, 2005.

ABDEL-MONEIM, A. M.; AL-KAHTANI, M. A.; ELMENSHAWY, O. M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments. **Chemosphere**, v. 88, n. 8, p. 1028–1035, 2012.

ADAMS, S. M. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n. 8-12, p. 649–657, 2005.

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

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Bacias Hidrográficas do Paraná**. BRASIL, 2010.

AL-GHAIS, S. M. Marine Pollution Bulletin. **Marine Pollution Bulletin**, v. 74, n. 1, p. 183–186, 2013.

ALAZEMI, B. M.; LEWIS, J. W.; ANDREWS, E. B. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus Petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. **Environmental Technology**, v. 17, n. 3, p. 225–238, 1996.

ALMEIDA, J. R.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: A case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Chemosphere**, v. 86, n. 9, p. 926–937, 2012.

ALMROTH, B. C.; ALBERTSSON, E.; STURVE, J.; FÖRLIN, L. R. Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 3, p. 370–378, 2008.

AMEUR, W. B.; DE LAPUENTE, J.; MEGDICHE, EL, Y.; et al. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 2, p. 241–251, 2012. Elsevier Ltd.

AZEVEDO, J. S.; SERAFIM, A.; COMPANY, R.; et al. Biomarkers of exposure to metal contamination and lipid peroxidation in the benthic fish *Cathorops spixii* from two estuaries in South America, Brazil.

BENTSEN, H. B.; GJERDE, B.; NGUYEN, N. H.; et al. Genetic improvement of farmed tilapias: Genetic parameters for body weight at harvest in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during five generations of testing in multiple environments. **Aquaculture**, v. 338-341, n. C, p. 56–65, 2012.

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

BESSE, J.-P.; GEFFARD, O.; COQUERY, M. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 36, n. C, p. 113–127, 2012.

BEYER, J.; JONSSON, G.; PORTE, C.; KRAHN, M. M.; ARIESE, F. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 3, p. 224–244, 2010.

BIRUNGI, Z.; MASOLA, B.; ZARANYIKA, M. F.; NAIGAGA, I.; MARSHALL, B. Active biomonitoring of trace heavy metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator species. The case of Nakivubo wetland along Lake Victoria. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, v. 32, n. 15-18, p. 1350–1358, 2007.

BLAZER, V. S. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 85–101, 2007.

BOELSTERLI, U.A. **Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets**. 2 ed. London: Taylor and Francis, 2002.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, p. 1–10, 2001.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1391–1396, 2001.

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

BUCKE, D.; VETHAAK, D.; LANG, T.; MELLERGAARD, S. Common diseases and parasites of fish in the North Atlantic: Training guide for identification. **ICES Techniques in Marine Environmental Sciences**, p. 1–27, 1996.

CAMPOS, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lieatus* e *Pseudoplatysoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no Rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 200–205, 2008.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator chemical contaminant effects. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 47, p. 2123–2136, 1990.

CAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 3, p. 264–271, 2005a.

CAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and chemical toxicology**, v. 43, n. 4, p. 569–574, 2005b.

CHAKRABARTI, P.; BANERJEE, A. S. Histological findings and seasonal distribution of different germ cells in the testicles of freshwater needle fish, *Xenentodon cancila* (Hamilton). **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 2, n. 3, p. 74–80, 2015.

CHEN, G.; XU, Y.; XU, L.; et al. Influence of dioxin and metal-contaminated sediment on phase I and II biotransformation enzymes in silver crucian carp. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, n. 3, p. 234–238, 1998.

COIMBRA, A. M.; FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; REIS-HENRIQUES, M. A. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), liver morphology, CYP1A activity and thyroid hormones after Endosulfan dietary exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 89, n. 3, p. 230–236, 2007.

CONAMA nº 357/2005 – Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005.

DE ANDRADE BRITO, I.; ARRUDA FREIRE, C.; YAMAMOTO, F. Y.; et al. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. **J. Environ. Monit.**, v. 14, n. 2, p. 615–625, 2012. The Royal Society of Chemistry.

DELLA TORRE, C.; TORNAMBÈ, A.; CAPPELLO, S.; et al. Modulation of CYP1A and genotoxic effects in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to weathered oil: A mesocosm study. **Marine Environmental Research**, v. 76, n. C, p. 48–55, 2012.

DWIVEDI, A. C.; TIWARI, A.; MAYANK, P. Seasonal determination of heavy metals in muscle, gill and liver tissues of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) from the tributary of the Ganga River, India. **Zoology and Ecology**, v. 25, n. 2, p.

166–171, 2015.

EL-NAGGAR, A.; MAHMOUD, S.; TAYEL, S. Bioaccumulation of some heavy metals and histopathological alterations in liver of *Oreochromis niloticus* in relation to water quality at different localities along the River Nile, Egypt. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 1, p. 105-114, 2009.

ELIA, A. C.; ANASTASI, V.; DÖRR, A. J. M. Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of *Cyprinus carpio* exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid, for superficial water potabilization. **Chemosphere**, v. 64, n. 10, p. 1633–1641, 2006.

ELLMANN, G.L.; COUTNEY, K.O.; ANDRES, V. & FEATHERSTONE, R.M.A. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v. 7, p. 88-95, 1961.

EROGLU, A.; DOGAN, Z.; KANAK, E. G.; ATLI, G.; CANLI, M. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3229–3237, 2014.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. **Physiological reviews**, v. 85, n. 1, p. 97–177, 2005.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Cultured Aquatic Species Information Programme: *Oreochromis niloticus*. Cultured Aquatic Species Information Programme. **Texto por Rakocy, J. E.** In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online], 2005

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FERREIRA-CARDOSO, J. V.; GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S. M.; CARROLA, J.; MATOS, P.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 103–109, 2007.

FIRAT, Ö.; COGUN, H. Y.; YÜZEREROĞLU, T. A.; et al. A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 657–666, 2011.

FREIRE, C. A.; SOUZA-BASTOS, L. R.; CHIESSE, J.; et al. A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 17, p. 13263–13277, 2015.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental health perspectives**, v. 87, p. 245–254, 1990.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 37–45, 2001.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN BA, G.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomed&Pharmacother**, v. 53, p. 169–180, 1999.

GUZMÁN-GUILLÉN, R.; PRIETO, A. I.; MORENO, I.; et al. Effects of depuration on oxidative biomarkers in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after subchronic exposure to cyanobacterium producing cylindrospermopsin. **Aquatic Toxicology**, v. 149, p. 40–49, 2014.

HANDY, R. D.; GALLOWAY, T. S.; DEPLEDGE, M. H. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 12, n. 1-4, p. 331–343, 2003.

HE, X.; NIE, X.; WANG, Z.; et al. Assessment of typical pollutants in waterborne by combining active biomonitoring and integrated biomarkers response. **Chemosphere**, v. 84, n. 10, p. 1422–1431, 2011.

HEINRICH, A. PAH metabolites in bile Fluids of dab (*Limanda limanda*) and flounder (*Platichthys flesus*): spatial distribution and seasonal changes (7 pp). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 14, n. 2, p. 102–108, 2006.

HELLOU, J.; ROSS, N. W.; MOON, T. W. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 6, p. 2007–2023, 2012.

HOLT, E. A. & MILLER, S. W. Bioindicators: Using organisms to measure environmental impacts. **Nature Education Knowledge** v. 10, n. 3, 2010.

HOLTH, T. F.; TOLLEFSEN, K. E. Acetylcholine esterase inhibitors in effluents from oil production platforms in the North Sea. **Aquatic Toxicology**, v. 112-113, p. 92–98, 2012. Elsevier B.V.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP) Monitoramento da qualidade das águas dos reservatórios do estado do Paraná, no período de 1999 a 2004. Curitiba, 2009. pp. 12.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Brasil, 2008. pp. 472.

JELIHOVSCHI, E.G.; FARIA, J.C.; ALLAMAN, I.B. ScottKnott: a package for performing the Scott-Knott Clustering algorithm in R. **Trends in Applied and Computational Mathematics** 15(1), 3-17. 2014

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

JULIO JR HF, BONECKER CC, AGOSTINHO AA. 1997. Reservatório de Segredo e sua inserção na bacia do Iguaçu. In: *Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo*, Agostinho AA, Gomes LC (eds). EDUEM: Maringá; 1-17.

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

KOMSTA, L. outliers: Tests for outliers. R package version 0.14. <http://CRAN.R-project.org/package=outliers>. 2011

KUMAR, P.; KUMAR, R.; NAGPURE, N. S.; NAUTIYAL, P.; KUSHWAHA, B.; DABAS, A. Genotoxicity and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in *Cyprinus carpio* after *in vivo* exposure. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 451–460, 2013.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182–186, 2003.

LENÁRTOVÁ, V.; HOLOVSKÁ, K.; PEDRAJAS, J.-R.; et al. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. **Biomarkers**, v. 2, p. 247–252, 1997.

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

LIEBEL, S.; TOMOTAKE, M. E. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 2, p. 9–15, 2013.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 8, p. 656–666, 2001.

LÓPEZ-LÓPEZ, E.; SEDEÑO-DÍAZ, J. E.; PEROZZI, F. Lipid peroxidation and Acetylcholinesterase activity as biomarkers in the Black Sailfin Goodeid, *Girardinichthys viviparous*(Bustamante) exposed to water from Lake Xochimilco (Mexico). **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 9, n. 3, p. 379–385, 2006.

MADUREIRA, T. V.; ROCHA, M. J.; CRUZEIRO, C.; et al. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): Evaluation of impacts on fish liver, by histopathology, stereology, vitellogenin and CYP1A immunohistochemistry, after sub-acute exposures of the zebrafish model. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 34–45, 2012.

MELA, M.; GUILOSKI, I. C.; DORIA, H. B.; et al. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 13–21, 2013a.

MELA, M.; GUILOSKI, I. C.; DORIA, H. B.; et al. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, p. 1–9, 2013b.

MOHAMED, F. A. S. Bioaccumulation of selected metals and histopathological alterations in tissue of *Oreochromis niloticus* and *Lates niloticus* from Lake Nasser, Egypt. **Global Veterinaria**, v. 2, p. 205–218, 2008.

MONTEIRO, S. M.; MANCERA, J. M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; SOUSA, M. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 141, n. 4, p. 375–383, 2005.

MOORE, M. N.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. W.; PAUL LEONARD, D. R. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 552, n. 1-2, p. 247–268, 2004.

MORALES, M. *sciplot: Scientific Graphing Functions for Factorial Designs*. R package version 1.1-0. <http://CRAN.R-project.org/package=sciplot>. 2012

NEFF, J. M.; STOUT, S. A.; GUNSTERT, D. G. Ecological Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments: Identifying Sources and Ecological Hazard. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 1, n. 1, p. 22–33, 2005.

NWANI, C. D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; et al. Induction of micronuclei and nuclear lesions in *Channa punctatus* following exposure to carbosulfan, glyphosate and atrazine. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 370–377, 2015.

OKSANEN, J., BLANCHET, F.G., KINDT, R., LEGENDRE, P., MINCHIN, P.R., O'HARA, R.B., SIMPSON, G.L., SOLYMOS, P., HENRY, M., STEVENS, H., WAGNER, H. **vegan: Community Ecology Package**. R package version 2.0–4. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>, 2012.

OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. **The Science of The Total Environment**, v. 396, n. 1, p. 70–78, 2008.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; NARCISO, M. Histopathological Markers in Fish Health Assessment. In: C. Oliveira Ribeiro, C.A. (Org.); **Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems**. CRC Press 2014. p.206–242.

OMAR, W. A.; ZAGHLOUL, K. H.; ABDEL-KHALEK, A. A.; ABO-HEGAB, S. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 746, n. 1, p. 7–14, 2012.

OSÓRIO, F. H. T.; SILVA, L. F. O.; PIANCINI, L. D. S.; et al. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, 2013.

OTTEM, K. F.; NYLUND, A.; KARLSBAKK, E.; FRIIS-MØLLER, A.; KAMAISHI, T. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al.(2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al.(2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1231–1243, 2009.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; ANSARI, R. A.; et al. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 3, p. 183–192, 2008.

PATHIRATNE, A.; HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, K. A. S. Assessment of Bile Fluorescence Patterns in a Tropical Fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene and Chrysene Using Fixed Wavelength Fluorescence and Synchronous Fluorescence Spectrometry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, n. 5, p. 554–558, 2010.

PETERS, N. E.; MEYBECK, M. Water Quality Degradation Effects on Freshwater Availability: Impacts of Human Activities. **Water International**, v. 25, n. 2, p. 185–193, 2000.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; et al. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, n. 2, p. 147–156, 2005.

RABITTO, I.; BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; et al. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environment International**, v. 37, n. 1, p. 56–65, 2011.

RICCIARDI, F.; MATOZZO, V.; BINELLI, A.; MARIN, M. G. Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments. **Water Research**, v. 44, n. 6, p. 1725–1736, 2010.

ROSSI, S. C. **Estudo ecotoxicológico da exposição ao chumbo e à nanopartícula de dióxido de titânio em Hoplias malabaricus**. 101 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2013.

SAGLAM, D.; ATLI, G.; DOGAN, Z.; et al. Response of the Antioxidant System of Freshwater Fish (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Metals (Cd, Cu) in Differing Hardness. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, n. 1, p. 43-52, 2014.

SCOTT, A.J., KNOTT, M., 1974. **A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance**. *Biometrics* 30, 507–512, 1974

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

SHAILAJA, M. S.; D'SILVA, C. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. **Chemosphere**, v. 53, p. 835–841, 2003.

SILVA, C. A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; KATSUMITI, A.; et al. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 2, p. 400–409, 2009.

SILVA SOUZA, T.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, n. 1-2, p. 87–93, 2006.

SMOLDERS, R.; BERVOETS, L.; WEPENER, V.; BLUST, R. A Conceptual Framework for Using Mussels as Biomonitors in Whole Effluent Toxicity. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 9, n. 3, p. 741–760, 2003.

STARA, A.; MACHOVA, J.; VELISEK, J. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 334–343, 2012. Elsevier B.V.

STEIN, J. E.; COLLIER, T. K.; REICHERT, W. L.; et al. Bioindicators of Contaminant Exposure and Sublethal Effects in Benthic Fish from Puget Sound, WA, USA. **Marine Environmental Research**, v. 35, p. 95–100, 1993.

TAO, W.; YUAN, J.; ZHOU, L.; et al. Characterization of gonadal transcriptomes from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) reveals differentially expressed genes. (L. Orban, Org.) **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63604, 2013.

TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish population exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, p. 51–70, 1997.

TRACTEBEL ENERGIA. UHE SALTO SANTIAGO: Plano de Uso e Ocupação das Águas e Entorno do Reservatório da Usina Hidrelétrica Salto Santiago. Volume 1. 2002

TURRA, E. M.; OLIVEIRA, D. A. A.; TEIXEIRA, E. A.; et al. Uso de medidas morfométricas no melhoramento genético do rendimento de filé da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 34, p. 29–36, 2010.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003. Elsevier.

VAN DYK, J. C.; COCHRANE, M. J.; WAGENAAR, G. M. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. **Chemosphere**, v. 87, n. 4, p. 301–311, 2012.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 281–300, 2007.

VIDAL-LIÑÁN, L.; BELLAS, J.; CAMPILLO, J. A.; BEIRAS, R. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 265–272, 2010.

VIDAL-LIÑÁN, L.; BELLAS, J. Practical procedures for selected biomarkers in mussels, *Mytilus galloprovincialis* — Implications for marine pollution monitoring. **Science of the Total Environment**, v. 461-462, n. C, p. 56–64, 2013.

VUTUKURU, S. S.; CHINTADA, S.; RADHA MADHAVI, K.; VENKATESWARA RAO, J.; ANJANEYULU, Y. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 221–229, 2006.

WEPENER, V. Application of active biomonitoring within an integrated water resources management. **South African Journal of Science**, v. 104, p. 1–7, 2008.

WEPENER, V.; VAN VUREN, J. H. J.; CHATIZA, F. P.; et al. Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, v. 30, n. 11-16, p. 751–761, 2005.

WINSTON, G. W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 19, p. 137–161, 1991.

YADAV, A.; GOPESH, A.; PANDEY, R. S.; RAI, D. K.; SHARMA, B. Acetylcholinesterase: a potential biochemical indicator for biomonitoring of fertilizer industry effluent toxicity in freshwater teleost, *Channa striatus*. **Ecotoxicology**

(London, England), v. 18, n. 3, p. 325–333, 2008.

YAP, C. K.; JUSOH, A.; LEONG, W. J.; KARAMI, A.; ONG, G. H. Potential human health risk assessment of heavy metals via the consumption of tilapia *Oreochromis mossambicus* collected from contaminated and uncontaminated ponds. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 9, p. 584–16, 2015. Springer International Publishing.

ZHU, H.; WANG, J.; SANTO, A.; LI, Y. Downregulation of antioxidants and phase 2 proteins. In: Villamena, F.A. (Ed.) **Molecular Basis of Oxidative Stress: chemistry, mechanisms, and disease pathogenesis**. New Jersey: John Wiley & Sons. p. 113-121, 2013.