

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL DIAS SIMEONI

BIOMONITORAMENTO DO RESERVATÓRIO DO IRAÍ, UTILIZANDO O TESTE DO
MICRONÚCLEO PÍSCEO E ENSAIO COMETA NAS ESPÉCIES *Geophagus*
brasiliensis E *Coptodon rendalli*

CURITIBA

2019

RAFAEL DIAS SIMEONI

BIOMONITORAMENTO DO RESERVATÓRIO DO IRAÍ, UTILIZANDO O TESTE DO
MICRONÚCLEO PÍSCEO E ENSAIO COMETA NAS ESPÉCIES *Geophagus*
brasiliensis E *Coptodon rendalli*

Monografia apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em biologia, Curso
de Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Margarete Cestari
Coorientadora: MSc Laís Fernanda Oya Silva

CURITIBA

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dr^a Marta Margarete Cestari pela confiança.

Aos colegas do laboratório de Mutagênese Ambiental pela amizade.

À Izonete Cristina Guiloski (A Cris), por ter sido minha segunda mãe, não só me ensinando as coisas do laboratório, como me dando conselhos para a vida.

Aos meus irmãos Marcello e Fernanda.

Em especial aos meus pais por todo apoio, mesmo nos momentos mais difíceis.

RESUMO

Os peixes são animais muito utilizados em estudos de biomonitoramento em ambientes aquáticos. Um dos principais motivos deve-se à eficiência deles em indicar a qualidade do ambiente em que vivem por meio de diversos biomarcadores. A partir disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos de substâncias presentes no Reservatório do Iraí (Quatro Barras/PR), utilizando o Teste do Micronúcleo Písceo (micronúcleos e alterações eritrocitárias nucleares (AENs)) e ensaio cometa do sangue, cérebro, fígado, rim e brânquias. Para isso, peixes das espécies *Coptodon rendalli* (tilápia) e *Geophagus brasiliensis* (acará) foram coletados no Reservatório do Iraí e no ponto referência Parque Ecológico Costa (Curitiba/PR). Para o teste do MNP, foram realizados esfregaços sanguíneos em lâminas de microscopia, as quais foram fixadas e coradas com Giemsa. Para o Ensaio Cometa alcalino, o sangue, fígado, brânquias, cérebro e rim dos peixes foram mantidos em soro bovino fetal, desagregados e processados a fim de se obter as lâminas com os respectivos nucleoides. A coloração foi realizada com brometo de etídio, e os nucleoides foram categorizados quanto ao dano no DNA em escala de 0 a 4 em relação ao comprimento da cauda dos cometas, o que originou um escore por lâmina (peixe). Em *G. brasiliensis* foi observado maior incidência de AENs totais nos peixes coletados no Reservatório do Iraí em relação ao ponto referência Parque Costa. Em *C. rendalli* não foi observado diferença de MN e AENs entre os peixes coletados nos dois pontos. Em relação ao Ensaio Cometa, foi observado maior dano no sangue e no fígado dos peixes coletados no Parque Costa, em relação aos coletados no Reservatório do Iraí. Para o rim e cérebro, foi observado maior dano no DNA dos peixes do reservatório do Iraí em relação aos coletados no Parque Costa. Dessa forma, tanto o reservatório quanto o Parque Costa podem estar impactados com substâncias genotóxicas. Além disso, o Parque Ecológico Costa não se demonstrou ser um bom ponto referência.

Palavras-chave: Genotoxicidade; Danos no DNA; Toxicologia ambiental; Mutagênese ambiental; Peixes nativos e exóticos.

ABSTRACT

Fish are animals widely used in biomonitoring studies in aquatic environments. One of the main reasons is their efficiency in indicating the quality of the environment in which they live through various biomarkers. From this, the present study aims to evaluate the genotoxic effects of substances present in the Iraí Reservoir (Quatro Barras / PR), using the Fish Micronucleus Test (micronuclei and nuclear erythrocyte alterations (NEAs)) and comet assay of blood, brain, liver, kidney. and gills. For this, fish of the species *Coptodon rendalli* (tilapia) and *Geophagus brasiliensis* (acar) were collected at Ira Reservoir and at the Costa Ecological Park reference point (Curitiba / PR). For the MNT test, blood smears were performed on microscopy slides, which were fixed and stained with Giemsa. For the Alkaline Comet Assay, the blood, liver, gills, brain and kidney of the fish were kept in fetal bovine serum, disaggregated and processed to obtain the slides with their nucleoids. Staining was performed with ethidium bromide, and the nucleoids were categorized for DNA damage on a scale from 0 to 4 in relation to the tail length of the comets, which resulted in a score per blade (fish). In *G. brasiliensis* a higher incidence of total NEAs was observed in the fish collected in the Ira Reservoir in relation to the Parque Costa reference point. In *C. rendalli* no difference of MN and NEAs was observed between the fishes collected in the two points. In relation to the Comet Assay, it was observed greater damage in the blood and liver of fish collected in Parque Costa, compared to those collected in the Ira Reservoir. For the kidney and brain, greater DNA damage was observed in the fish of Ira reservoir than in those collected in Parque Costa. Thus, both the reservoir and Parque Costa may be impacted with genotoxic substances. In addition, the Costa Ecological Park has not proved to be a good reference point.

Keywords: Genotoxicity; DNA damage; Environmental Toxicology; Environmental mutagenesis; Native and exotic fishes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EXEMPLAR DE <i>Geophagus brasiliensis</i>	16
FIGURA 2 - EXEMPLAR DE <i>Coptodon rendalli</i>	16
FIGURA 3 - IMAGENS DO ENSAIO DO MICRONÚCLEO E ALTERAÇÕES ERITROCITÁRIAS NUCLEARES.....	19
FIGURA 4 - NUCLEOIDES COM DANOS DE 0 A 4 DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA	20
FIGURA 5 - LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA DE PEIXES, E DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (UFPR)	22
FIGURA 6 - DANOS NO DNA DE <i>Geophagus brasiliensis</i> E <i>Coptodon rendalli</i> COLETADOS NO PONTO REFERÊNCIA PARQUE ECOLÓGICO COSTA E NO RESERVATÓRIO DO IRAÍ	26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES ERITROCITÁRIAS NUCLEARES EM <i>Geophagus brasiliensis</i> E <i>Coptodon rendalli</i> COLETADOS NO PARQUE ECOLÓGICO COSTA E RESERVATÓRIO DO IRAÍ.....	25
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE SIGLAS

AEN - Alterações eritrocitárias nucleares

IAP - Instituto Ambiental do Paraná

MNP - Micronúcleo Písceo

OMS - Organização Mundial da Saúde

SNIS - Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	BIOMONITORAMENTO	11
1.2	PEIXES COMO ORGANISMOS BIOMONITORES.....	12
1.3	CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO	13
1.3.1	Reservatório do Iraí	13
1.3.2	Parque Ecológico Costa	14
1.4	ICTIOFAUNA DAS ÁREAS DE ESTUDO	14
1.4.1	<i>Geophagus brasiliensis</i>	14
1.4.2	<i>Coptodon rendalli</i>	16
1.5	BIOMARCADORES.....	17
1.5.1	Biomarcadores de genotoxicidade	17
1.5.1.1	Teste do Micronúcleo Písceo (MNP).....	18
1.5.1.2	Ensaio Cometa	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral.....	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	ÁREA DE ESTUDO	22
3.2	BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE	23
3.2.1	Teste do Micronúcleo Písceo (MNP).....	23
3.2.2	Ensaio Cometa	23
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Teste do Micronúcleo Písceo (MNP).....	25
4.2	Ensaio Cometa	26
5	DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÕES	30
7	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

O uso de substâncias químicas pelos seres humanos se intensificou nos últimos séculos, principalmente no período posterior à Revolução Industrial, no qual houve o aumento de sua produção de forma artificial (ROCHA, 2015). Metais, plásticos, agrotóxicos, medicamentos e produtos de limpeza e higiene pessoal são apenas alguns exemplos dessas substâncias as quais somos diariamente expostos (RICHARDSON e KIMURA, 2017). Seja por meio da ingestão, inalação ou contato direto com a nossa pele, muitas dessas substâncias podem causar diversos danos a nossa saúde (OMS, 2018).

Além disso, principalmente em regiões com grande atividade antrópica, como nos centros urbanos, essas substâncias químicas podem ser amplamente direcionadas aos ambientes aquáticos, tornando-os poluídos e prejudiciais aos seres vivos locais. Isso ocorre principalmente por meio de falhas no tratamento de efluentes industriais e domésticos, má estruturação de depósitos de lixo (REBOUÇAS et al., 2006), além do descarte inadequado de substâncias químicas como medicamentos (BORRELY et al., 2012).

Segundo dados de 2017 do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), na região sul do Brasil, apenas 43,9% da população possui acesso à rede de esgoto, e desse esgoto coletado, apenas 44,9% possui algum tipo de tratamento. O restante dos efluentes retorna em sua forma natural aos ambientes aquáticos. Já em relação ao destino do lixo, na região sul do Brasil, por volta de 11% de todos os resíduos sólidos coletados ainda são destinados a depósitos irregulares, sem quaisquer meios de permeabilização do solo (Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais, 2017).

Tanto a poluição atmosférica quanto a do solo, possuem a capacidade de também poluir de alguma forma os ambientes aquáticos. Um exemplo dessa situação se dá por meio do uso de agrotóxicos. Ao aplicar essas substâncias em plantações, uma parte dela pode sofrer deriva para a atmosfera por evaporação ou ação dos ventos e, por meio de chuvas, serem incorporadas aos ambientes aquáticos. Além disso, por percolação até o lençol freático ou escoamento superficial, essas substâncias também podem ser direcionadas através dos solos aos rios e lagos (SILVA e SANTOS, 2007). Dessa forma, os ambientes aquáticos podem se tornar ponto de acúmulo de substâncias químicas por diferentes vias (PEREIRA, 2004).

É notório que os ambientes aquáticos são de fundamental importância para a manutenção da vida na terra, e que nossa sociedade atual seja dependente desses ambientes para a possibilidade da agricultura, produção de energia, atividades de recreação, além do próprio consumo de água. Portanto, surge a necessidade de que seja realizado estudos que monitorem a qualidade desses ambientes (VAN DER OOST et al., 2003). Dessa forma, torna-se possível determinar os reais impactos que as substâncias químicas estão causando nesses ecossistemas, e assim, embasar a possibilidade de debates sobre as más gestões dos recursos hídricos.

Por meio de análises químicas dos ambientes aquáticos, é possível determinar a presença de diversas substâncias, denominadas xenobióticos, que podem ser tóxicas aos seres vivos. (GONÇALVES et al., 2014). Entretanto, apenas por meio dessa análise, não é possível determinar o real dano que o conjunto de xenobióticos causam aos seres vivos locais. Assim, surge o biomonitoramento, que é um método que visa avaliar a saúde dos seres vivos que habitam um determinado ecossistema (BUSS et al., 2003).

1.1 BIOMONITORAMENTO

Trata-se de uma ferramenta de estudo que busca diagnosticar as mudanças que ocorrem nos ambientes aquáticos ao longo do tempo, ou diferenciar dois ambientes diferentes, sendo um deles um ponto alvo de estudo, e o outro um ponto referência não poluído (MARKERT *et al.*, 2003). Os impactos avaliados nesses ambientes são geralmente ocasionados por atividades antropogênicas. Para isso, utilizam-se organismos chamados de biomonitores, que respondem às alterações que ocorrem no ambiente em que vivem (BUSS et al., 2003).

Buss et al (2003) trouxe alguns critérios que caracterizam um bom organismo biomonitor. Entre eles estão:

- Abundância e ampla distribuição geográfica;
- Baixa mobilidade ao longo do ciclo de vida;
- Baixa variabilidade genética e ecológica;
- Possibilidade de estudos em laboratório;
- Características ecológicas conhecidas;
- Taxonomia bem definida.

Além disso, é importante que os organismos biomonitores sejam sensíveis às mudanças ambientais, revelando a qualidade do ambiente em que eles estão por meio de diversos biomarcadores biológicos (BUSS et al., 2003).

Em um ambiente de laboratório, é possível realizar experimentos, com condições ambientais padronizadas, como temperatura e luminosidade, por exemplo. Além disso, é possível verificar o efeito tóxico que uma única substância tem sobre um organismo específico, por meio de testes ecotoxicológicos. Em algumas condições, é possível extrapolar os dados obtidos no experimento para o que ocorre na natureza. Esses métodos são conhecidos como "*bottom-up*" (BUSS et al., 2003).

Entretanto, na natureza as variáveis são muito maiores. Em um ecossistema aquático, pode haver diversas substâncias que quando misturadas podem aumentar o potencial lesivo aos seres vivos, por exemplo (ZHANG et al., 2007). Dessa forma, métodos que avaliam os ambientes em níveis macro, como o biomonitoramento, são conhecidos como "*top-down*", e possui diversas vantagens, se tratando da avaliação de um ecossistema aquático. Entre elas está a possibilidade de avaliar a soma dos danos causados a esses ambientes pelos humanos, por exemplo, por meio do desmatamento, uso de agrotóxicos, ou despejo de efluentes domésticos e industriais (BUSS et al., 2003).

1.2 PEIXES COMO ORGANISMOS BIOMONITORES

Como comentado, em estudos de biomonitoramento é essencial utilizar organismos que sejam considerados bons biomonitores. Dentro da perspectiva dos ambientes aquáticos, sem dúvida os peixes estão entre os animais mais utilizados. Primeiramente, esses animais podem responder de maneira semelhante a outros vertebrados quando expostos a contaminantes. Isso é importante para demonstrar indiretamente os possíveis efeitos tóxicos dessas substâncias em outros seres vivos (AL-SABTI e METCALFE, 1995). Além disso, os peixes ocupam diversos níveis tróficos da teia alimentar e são considerados organismos bioacumuladores. Portanto, possuem a capacidade de manter essas substâncias em seu organismo, e passá-las para outros animais através da alimentação (FREITAS e SIQUEIRA-SOUZA, 2009). Isso se reflete diretamente na saúde humana, tendo em vista que os peixes são importantes fontes de proteínas e outros nutrientes, e podem transferir contaminantes a populações humanas através da alimentação (BASTOS et al., 2006). Tudo isso,

somado a sua abundância e ampla distribuição geográfica, torna os peixes organismos importantes nos estudos da qualidade dos ambientes aquáticos por meio do biomonitoramento (FREITAS e SIQUEIRA-SOUZA, 2009).

1.3 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

1.3.1 Reservatório do Iraí

Nos estudos de biomonitoramento, ambientes aquáticos que definitivamente merecem atenção são os reservatórios de água. No Brasil, eles são normalmente construídos próximos a regiões urbanas e possuem principalmente os objetivos de controlar cheias de outros rios e de armazenamento de água. Além disso, os reservatórios podem ter a função de abastecimento público (ANDREOLI e CARNEIRO, 2005).

É notório, que devido a pressão urbana os reservatórios podem se tornar poluídos, causando assim uma série de problemas ambientais. Tratando-se de reservatórios de abastecimento público, ainda há o agravante que muitas vezes, substâncias químicas, tais como medicamentos, não são retirados da água pelo tratamento tradicional (PINTO et al., 2014). Assim, essas substâncias podem ser ingeridas pela população, e os reais efeitos que isso pode causar ainda são desconhecidos.

Dentro desta perspectiva, próximo a região de Curitiba há um ambiente aquático que sofre grande pressão urbana e despejo de substâncias químicas. Trata-se do Reservatório do Iraí. Localizado entre os municípios de Quatro Barras, Pinhais e Piraquara (Paraná), esse reservatório foi inaugurado em agosto de 2000 com dois propósitos: controlar cheias do rio Iraí, e de abastecimento público da região da Grande Curitiba. Um relatório publicado pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP) em 2017, classificou as águas desse reservatório como Criticamente Degradada á Poluída, eutrofizada, com baixa transparência das águas e déficit de Oxigênio, ocasionando mortandade de peixes. Além disso, alguns trabalhos mostraram elevada concentração de substâncias no reservatório, tais como cobre, cloretos, sulfetos dissolvidos, sólidos suspensos e cianotoxinas (SODRÉ et al., 2012), e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) (LEITE; PERALTA-ZAMORA; GRASSI, 2011). Os HPAs estão inclusive associados ao aumento de mutações, além

de efeitos carcinogênicos em diversas espécies de animais, incluindo os seres humanos (NETTO, 2000). Entretanto, os reais danos à saúde que essas substâncias causam aos seres vivos, incluindo a seres humanos, permanecem desconhecidos.

1.3.2 Parque Ecológico Costa

Em estudos de biomonitoramento em ambientes aquáticos, é importante utilizar organismos de áreas não impactadas e com o mínimo de interferência humana possível. Essas áreas são conhecidas como pontos Referência e os organismos destes locais desempenham funções de controle negativo para efeito de comparação com organismos presentes em um ambiente alvo de estudo (SILVEIRA, 2004).

Um exemplo de um ambiente aquático utilizado como ponto referência é o Parque Ecológico Costa, localizado no sul do município de Curitiba/PR. Esse local já foi utilizado em atividades de extração de areia e argila, destinados à construção civil. Nas duas últimas décadas, após a exaustão dos recursos e fim das atividades de extração, foi iniciado procedimentos de recuperação ambiental nesse local, sendo criado assim o Parque Ecológico Costa (MOLETTA, 2004). Atualmente, esse local é dedicado a atividades de turismo ecológico e lazer, com ênfase na educação ambiental (RAMSDORF, 2007).

1.4 ICTIOFAUNA DAS ÁREAS DE ESTUDO

Em estudos de biomonitoramento comparativo, em que um alvo de estudo é comparado com um ponto referência, torna-se imprescindível que em ambos os locais haja espécies residentes em comum. Tratando-se da ictiofauna do Reservatório do Iraí, bem como do Parque Ecológico Costa, duas das espécies mais abundantes são *Geophagus brasiliensis* e *Coptodon rendalli* (ABILHOA, 2003).

1.4.1 *Geophagus brasiliensis*

Popularmente conhecido como Cará ou Acará (FIGURA 1), *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824), é uma espécie nativa do Brasil com distribuição desde a bacia Amazônica até a bacia do Rio Prata. Vive em ambientes lânticos, como lagos e reservatórios, ou estuários (NUNES et al., 2014). Possui

hábitos diurnos e comportamento solitário (CABI, 2019). Além disso, essa espécie possui grande tolerância a variações de temperatura e salinidade de seu habitat (BEATTY et al., 2013). Podendo atingir até 35cm de comprimento, *G. brasiliensis* possui uma mancha escura característica na região central lateral, além de manchas azuis por toda a extensão corporal (SILVA et al., 2003).

Estudos de Moraes et al. (2004) mostraram que *G. brasiliensis* possui uma alimentação bastante variada. Após a observação do conteúdo estomacal dessa espécie, foram encontrados principalmente insetos (Ephemeroptera, Odonata, Trichoptera e Diptera), seguido de Gastropoda, fragmentos de Arthropoda, fragmentos vegetais, sedimentos e algas. Tais características classificam *G. brasiliensis* como uma espécie onívora (ABELHA, 2004).

A taxonomia de *Geophagus brasiliensis* (CABI, 2019) é a seguinte:

Domínio: Eukaryota

Reino: Metazoa

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Gênero: *Geophagus*

Espécie: *Geophagus brasiliensis*

FIGURA 1 - EXEMPLAR DE *Gepagus brasiliensis*.

FONTE: Mariana Torres (2019).

1.4.2 *Coptodon rendalli*

Coptodon Rendalli (BOULENGER, 1897), inicialmente classificado como *Tilapia rendalli*, conhecido como Tilápia ou Tilápia do Congo (FIGURA 2), é uma espécie exótica, com distribuição nativa da bacia do Congo no sul do continente africano (AWAISS et al, 2010). Foi introduzida no Brasil em 1952, com o objetivo principal de combater a proliferação de macrófitas. Possuem hábitos diurnos e comportamento solitário, vivem em regiões bentônicas e lânticas, que preferencialmente possuam vegetação. Possuem nutrição onívora, e se alimentam principalmente de plantas, algas, insetos e pequenos invertebrados (ZAGANINI, 2009).

FIGURA 2 - EXEMPLAR DE *Coptodon rendalli*.

FONTE: Fish the Fly (2019).

A taxonomia de *Coptodon rendalli* (KONINGS et al., 2019) é a seguinte:

Domínio: Eukaryota

Reino: Metazoa

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Gênero: *Coptodon*

Espécie: *Coptodon rendalli*

1.5 BIOMARCADORES

Algumas formas dos peixes e de outros seres vivos indicarem as condições dos seus respectivos ambientes, são por meio de diversos biomarcadores. Eles podem ser definidos como qualquer resposta biológica a um estresse químico presente no ambiente, que indique diferenças entre os organismos afetados dos não afetados. Essas respostas biológicas podem ocorrer em diversos níveis de organização dos seres vivos, tais como moleculares, celulares ou teciduais. As mudanças que ocorrem nos menores níveis de organização são chamados de biomarcadores de efeitos imediatos, ou precoces, em que geralmente são os primeiros a indicar exposições de um organismo a um estresse químico, enquanto que mudanças que ocorrem nos maiores níveis de organização, tais como populações ou comunidades biológicas são chamados de biomarcadores de efeitos tardios (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

1.5.1 Biomarcadores de Genotoxicidade

Alguns dos biomarcadores também possuem a capacidade de indicar a genotoxicidade de substâncias químicas, ou seja, o dano que elas causam ao DNA das células, e são chamados de biomarcadores genéticos (RIVERO, 2007). Alguns

danos genéticos podem acarretar em mutações, que podem ocorrer tanto em células somáticas, comprometendo o funcionamento delas e possivelmente causando a morte celular, quanto em células germinativas, que pode impactar os descendentes do indivíduo afetado (MIR et al., 2014). Dentre os biomarcadores de genotoxicidade, dois deles merecem destaque: o Teste do Micronúcleo Písceo (MNP) e o Ensaio Cometa.

1.5.1.1 Teste do Micronúcleo Písceo (MNP)

O Teste do Micronúcleo se baseia na detecção de efeitos aneugênicos, clastogênicos, ou danos no fuso mitótico não passíveis de reparo, causados por substâncias citotóxicas. Essas substâncias possuem a capacidade de causar quebras nos cromossomos celulares, que após a divisão celular, permanecem separados do núcleo principal, sendo visíveis por meio da microscopia óptica (FENECH, 2000) (FIGURA 3). Por meio das análises de micronúcleos, é possível avaliar o potencial de genotoxicidade de substâncias presentes nos ambientes aquáticos, utilizando espécies de peixes (ERGENE et al., 2007).

Proposto inicialmente por Schmid (1975), o teste do micronúcleo foi desenvolvido para células da medula óssea de mamíferos, principalmente roedores. Baseado nos estudos de Schmid, Hoofman e Raat (1982) adaptaram a técnica para eritrócitos de peixes.

Tolbert et al (1992) estabeleceu alguns critérios que caracterizam um micronúcleo. Entre eles estão estrutura e cor da cromatina igual ao do núcleo principal, presença de membrana nuclear, forma arredondada e diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal.

Junto a análise dos micronúcleos, outras alterações na forma do núcleo celular também podem ser avaliadas. Elas recebem o nome de alterações eritrocitárias nucleares (FIGURA 3) e podem estar relacionadas com exposições celulares a substâncias potencialmente genotóxicas ou citotóxicas (CARRASCO et al., 1990; 2007; SANTOS, 2017; TASNEEM, 2017). O conjunto das alterações eritrocitárias nucleares e micronúcleos caracterizam o chamado Teste do Micronúcleo Písceo (CARRASCO et al, 1990).

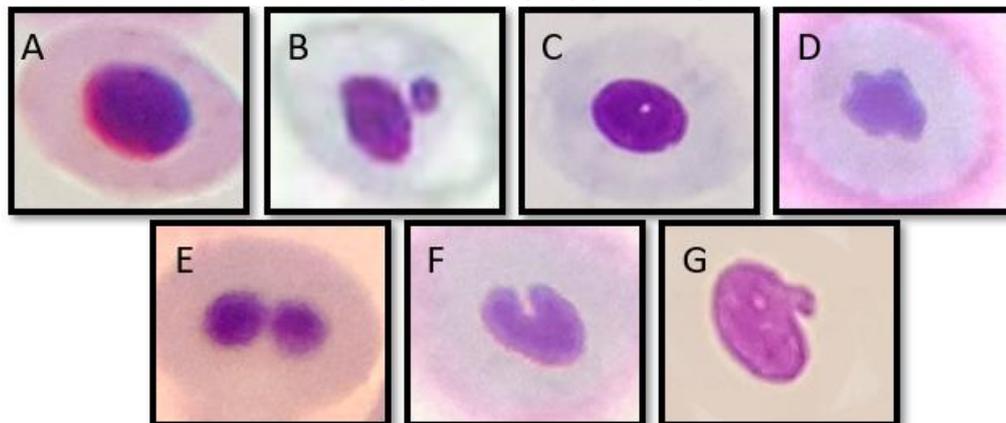
Embora a formação das alterações eritrocitárias nucleares não esteja totalmente elucidada, alguns estudos, tais como o de Shimizu et al., (1998), sugere que essas alterações eritrocitárias estão relacionadas com mecanismos celulares de

reparo, de modo que os núcleos adquiram as formas anormais por meio da exocitose do material danificado. Carrasco et al., (1990) classificou as alterações eritrocitárias nucleares em alguns grupos:

- *Blebbled*: evaginações da membrana nuclear;
- *Lobed*: evaginações numerosas e maiores, formando lóbulos,
- *Notched*: invaginação da membrana nuclear,
- *Vacuolated*: presença de um vacúolo no interior do núcleo celular
- *Binucleus*: células binucleadas.

Atualmente, a metodologia de Heddle (1973) e Schmid (1975) é bastante utilizada para o MNP, no qual é confeccionada uma lâmina de esfregaço sanguíneo para cada peixe em lâminas de microscopia. Após a coloração e fixação das lâminas, são contabilizados 2000 eritrócitos analisando-se a frequência de micronúcleos e das alterações eritrocitárias nucleares (AENs) propostas por Carrasco et al (1990).

FIGURA 3 - IMAGENS DO ENSAIO DO MICRONÚCLEO E ALTERAÇÕES ERITROCITÁRIAS NUCLEARES.



Fonte: O autor (2019)

Célula normal (A); célula com micronúcleo (B); Alterações eritrocitárias nucleares (C-G) dos tipos *vacuolated* (C); *lobed* (D); *binucleus* (E); *notched* (F); e *blebbed* (G).

1.5.1.2 Ensaio cometa

Outro método, além do MNP, muito utilizado com o objetivo de mensurar danos causados ao DNA por substâncias genotóxicas é denominado ensaio cometa, ou gel de eletroforese de célula única (NERI et al., 2015). Esse método pode detectar danos no DNA ainda passíveis de reparos celulares (AZQUETA et al., 2019), tais como quebras de fita simples, além de sítios apurínicos ou apirimídínicos no DNA

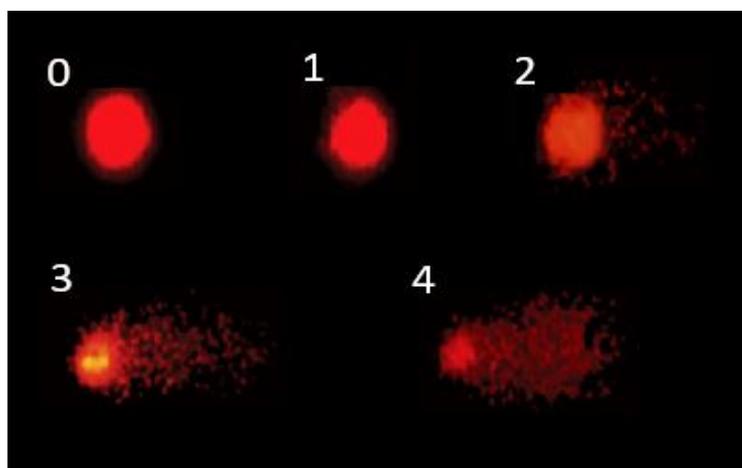
(LANGIE et al., 2015).

Inicialmente desenvolvida por O. Ostling e K. J. Johanson em 1984, o ensaio cometa foi utilizado em células de linfoma e fibroblastos de roedores com o objetivo de detectar danos no DNA ao nível de células individualizadas. Com o intuito de identificar não apenas danos de fita simples, Singh et al., em 1988 desenvolveram uma versão alcalina do ensaio cometa, no qual a eletroforese acontece em pH alcalino e amplia o número de danos genotóxicos possíveis de serem avaliados.

O conceito básico do ensaio cometa alcalino consiste em inserir células em agarose, e lisar todas as suas estruturas com exceção do núcleo celular (chamado de nucleoides após a etapa de lise). Em seguida, esses nucleoides passam por uma corrida de eletroforese em tampão alcalino. Dessa forma, o DNA que estiver mais fragmentado migrará de forma mais acentuada para o polo positivo da cuba de eletroforese, formando uma cauda visível em microscopia de fluorescência. Já o DNA que estiver menos danificado permanecerá de forma mais agrupada (AZQUETA et al., 2011).

Dependendo da quantidade de DNA presente na cauda, se pode relacionar os nucleoides em diferentes classes de dano: 0 (sem danos aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano extenso) e 4 (dano máximo) (FIGURA 4). A partir da contagem dos nucleoides (100 por lâmina), é calculado um escore com base no número de nucleoides encontrados em cada classe, multiplicado pelo número da classe do dano. Esse escore é importante na determinação da intensidade de genotoxicidade ao qual um determinado organismo foi exposto (COLLINS et al., 2004).

FIGURA 4 - NUCLEOIDES COM DANOS DE 0 A 4 DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA



FONTE: adaptado de Cesar e Trento (2017)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos genotóxicos de substâncias químicas presentes no Reservatório do Iraí, por meio do Teste do Micronúcleo Písceo e Ensaio Cometa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o sangue das espécies *Geophagus brasiliensis* e *Coptodon rendalli* quanto a presença de micronúcleos e outras alterações eritrocitárias nucleares.
- Analisar o sangue, fígado, cérebro, rim e brânquias das espécies *Geophagus brasiliensis* e *Coptodon rendalli* quanto a danos no DNA evidenciados pelo ensaio cometa alcalino
- Comparar as diferenças na sensibilidade das espécies *Geophagus brasiliensis* (nativa) e *Coptodon rendalli* (invasora) quanto a genotoxicidade;
- Avaliar se as espécies *Geophagus brasiliensis* e *Coptodon rendalli* podem representar bons organismos biomonitores de genotoxicidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREAS DE ESTUDO

Espécimes de *Coptodon rendalli* e *Geophagus brasiliensis* foram coletados no ponto Referência Parque Ecológico Costa (município de Curitiba, 25°36'23"S 49°16'49"W), e no Reservatório do Iraí (município de Quatro Barras, 25°23'11"S 49°05'34"W) (FIGURA 5) na primavera de 2019.

Em cada ponto, foram coletados 20 exemplares de cada espécie com tarrafas de pesca. Esses peixes foram transportados em sacos de 20 litros ao laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (FIGURA 5). Até o momento da coleta de tecidos (entre 2h e 15h horas) os peixes foram mantidos em caixas de isopor, com água do local de coleta conectada aos aeradores.

FIGURA 5 - LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA DE PEIXES, E DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (UFPR).



FONTE: Adaptado de Google maps (2019).

3.2 BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE

Em laboratório, os peixes foram anestesiados com benzocaína (1% diluído em água). O sangue foi retirado por punção cardíaca utilizando hematócritos heparinizados e então direcionado para o Teste do Micronúcleo Písceo e Ensaio Cometa. Em seguida foi realizada a eutanásia dos peixes por secção medular. As amostras de fígado, cérebro, rim e brânquias dos peixes também foram coletadas e direcionadas para o Ensaio Cometa.

3.2.1 Teste do Micronúcleo Písceo (MNP)

Para o Teste de Micronúcleo Písceo foi utilizado a metodologia de Heddle (1973) e Schmid (1975). Primeiramente, uma gota de sangue de cada peixe foi transferida para lâminas de microscopia, previamente higienizadas com etanol 70%, e então foi feito um esfregaço sanguíneo. As lâminas secaram em temperatura ambiente por 24 horas e após esse período os esfregaços foram fixados em etanol (96%) por 30 minutos. Em seguida, essas lâminas foram coradas com Giemsa (10%) diluída em tampão fosfato (pH 6.8) por 15 minutos, e secas novamente em temperatura ambiente por 24 horas.

A observação de micronúcleos (MN) e alterações eritrocitárias nucleares (AENs) foi realizada utilizando microscópio óptico com o aumento de 1000x na objetiva de imersão. Em cada lâmina foram observados 2000 eritrócitos e contabilizados o número de MN, assim como a incidência de AENs dos tipos *blebbed*, *lobed*, *notched*, *vacuolated* e *binucleus* propostas por Carrasco et al (1990). Apenas as células que possuíam citoplasma e núcleo intactos foram consideradas na contagem. As lâminas foram codificadas e a leitura foi realizada em teste cego por apenas um único observador.

3.2.2 Ensaio Cometa

Para o Ensaio Cometa, foi utilizada a metodologia de Speit e Hartmann, (1999) com adaptações de Cestari et al., (2004) e Ferraro et al., (2004). Primeiramente, o sangue, fígado, cérebro, rim e brânquias foram misturados em tubos com 1 mL de soro bovino fetal, formando uma solução que foi mantida ao abrigo da luz. Em seguida,

todos os tecidos com exceção do sanguíneo foram homogeneizados a 15.000 rpm com um homogeneizador. Após esse procedimento, entre 10 e 30 μL dessas soluções de tecidos foram misturados em 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão, e aplicadas sobre uma lâmina de microscopia previamente coberta com uma fina camada de agarose ultrapura (concentração de 1,5%, diluída em água ultrapura). Uma lamínula foi colocada sobre cada uma das lâminas, as quais se mantiveram em um refrigerador por 15 minutos. Após isso, as lamínulas foram retiradas, e as lâminas foram mantidas em cubetas com a solução de lise [NaCl (2.5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (10%), Triton X-100 (1%) e DMSO (10%)] por 24 horas em um refrigerador. Após esse período, as lâminas foram retiradas da solução de lise e transferidas à cuba de eletroforese, onde ficaram imersas em uma solução alcalina (pH>13) de NaOH (300mM), e EDTA (1mM) por 25 minutos. Logo em seguida, a corrida de eletroforese foi realizada a 300mA e 25V (1V/cm de cuba de eletroforese) por 25 minutos. Essas lâminas foram neutralizadas em solução tampão de Tris (0,4M e pH 7,5) em 3 banhos de 5 minutos cada, e fixadas em etanol 96% por 5 minutos.

Para a análise das lâminas em microscópio de epifluorescência (aumento de 400 vezes), foi utilizado 25 μL do corante Brometo de etídio (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Em cada lâmina, 100 nucleoides foram contabilizados e classificadas visualmente de acordo com as classes de dano, que são divididas em 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano extenso) e 4 (dano máximo). O escore foi obtido pela relação número de nucleoides em cada classe multiplicado pela classe do dano.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o Teste do Micronúcleo Písceo e Ensaio Cometa, foram feitas comparações par-a-par entre Reservatório do Iraí e o ponto referência Parque Ecológico Costa, além de *Geophagus brasiliensis* e *Coptodon rendalli*. Para isso, foi utilizado o teste de Kolmogorov–Smirnov para verificar a normalidade dos dados. Como os dados não apresentaram distribuição normal, as análises estatísticas foram feitas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO (MNP)

Foi observado em *G. brasiliensis* maior incidência da AEN do tipo *vacuolated*, além das AENs totais, nos peixes do Reservatório do Iraí em relação ao ponto referência Parque Ecológico Costa ($p < 0.05$). Em relação aos MNs e outras AENs não foram observadas diferenças significativas entre os dois pontos de coleta ($p > 0.05$) (TABELA 1).

Em *C. rendalli*, não foi observado diferenças significativas de MNs e AENs entre os peixes do reservatório e do Parque Costa ($p > 0.05$) (TABELA 1).

Comparando as duas espécies, foi observado uma maior frequência de AENs totais em *C. rendalli* em relação a *G. brasiliensis* na coleta do Parque Costa ($p < 0.05$) (TABELA 1).

Nota-se também, que houve diferença nas respostas das duas espécies em relação a formação de AENs. Em *G. brasiliensis*, foi observado maior frequência das AEN do tipo *vacuolated* nos peixes do reservatório e *notched* nos peixes do Parque Costa. Em relação a *C. rendalli* foi observado maior incidência da AEN do tipo *notched* nos peixes dos dois pontos (TABELA 1).

TABELA 1 - FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES ERITROCITÁRIAS NUCLEARES EM *Geophagus brasiliensis* E *Coptodon rendalli* COLETADOS NO PARQUE ECOLÓGICO COSTA E RESERVATÓRIO DO IRAÍ.

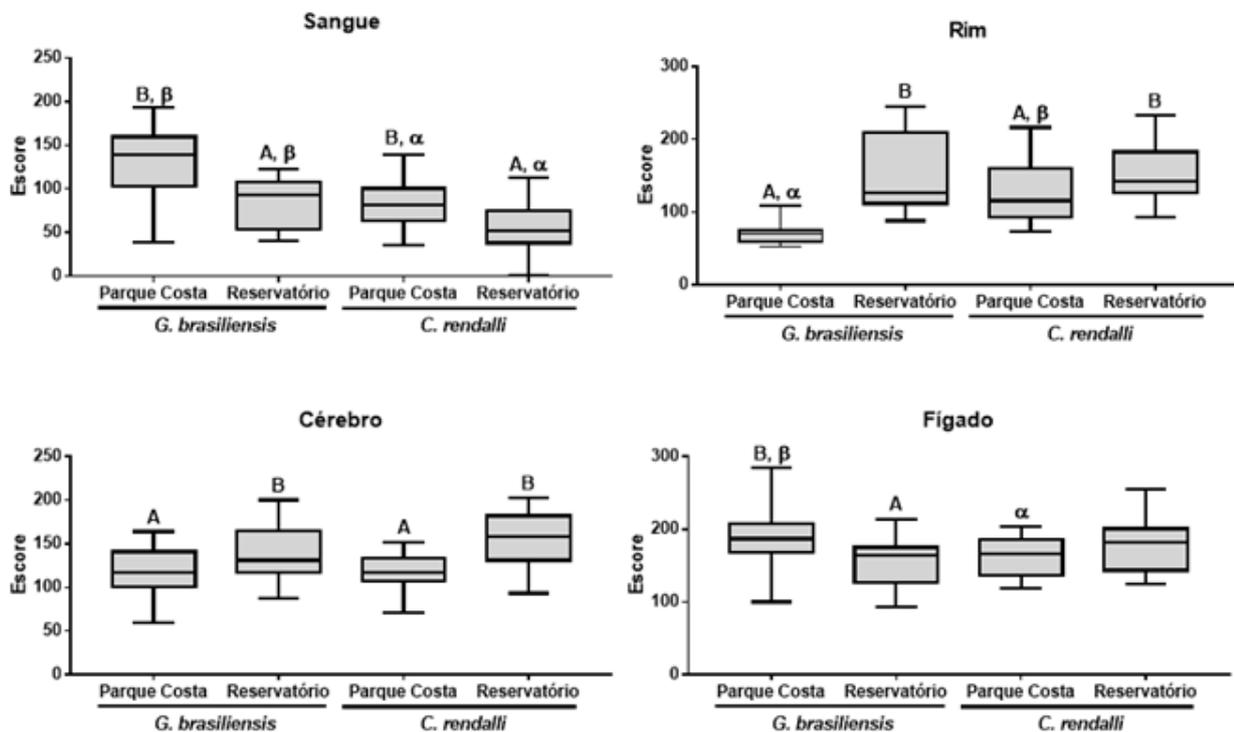
	MN	BD	LB	NT	BN	VD	AENT
<i>G. brasiliensis</i>							
Parque Costa	0 (0; 0)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	2 (1; 3.5)	0 (0; 0)	1 (0; 2) ^A	4 (2; 6.5) ^{A α}
Reservatório	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	3 (1; 7)	0 (0; 0)	6 (2; 11) ^B	10 (5; 16) ^B
<i>C. rendalli</i>							
Parque Costa	0 (0; 0)	1 (0; 2)	0 (0; 1)	8 (5; 14)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	8 (6; 17.5) ^β
Reservatório	0 (0; 0.25)	0 (0; 2.25)	0 (0; 0)	5.5 (0.75; 10.25)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	7 (0.75; 13.75)

MN: micronúcleos, BD: *blebbed*, LB: *lobed*, NT: *notched*, BN: *binucleus*, VD: *vacuolated*, AENT: alterações eritrocitárias totais. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre Parque Costa e Reservatório do Iraí (A, B). Letras gregas indicam diferenças significativas entre *G. brasiliensis* e *C. rendalli* (α, β). Dados expressos em mediana (1º quartil; 3º quartil). Teste de Mann-Whitney.

4.2 ENSAIO COMETA

Em *G. brasiliensis*, foi observado maior dano no DNA no cérebro e rim dos peixes do reservatório ($p < 0.05$). Além disso, foi observado maior dano no DNA no sangue e fígado dos peixes do Parque Costa ($p < 0.05$) (FIGURA 6). Com relação as brânquias, não foram observadas diferenças significativas entre os peixes coletados nos dois pontos ($p > 0.05$).

FIGURA 6 - DANOS NO DNA DE *Geophagus brasiliensis* E *Coptodon rendalli* COLETADOS NO PONTO REFERÊNCIA PARQUE ECOLÓGICO COSTA E NO RESERVATÓRIO DO IRAÍ.



Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre Parque Costa e reservatório (A, B). Letras gregas indicam diferenças estatísticas entre *G. brasiliensis* e *C. rendalli* (α, β). Teste de Mann-Whitney.

Em *C. rendalli*, foi observado maior dano no DNA no cérebro e rim dos peixes do reservatório ($p < 0.05$). Além disso, foi observado maior dano no DNA no sangue dos peixes do Parque Costa ($p < 0.05$). Com relação ao fígado e brânquias, não foram observadas diferenças significativas entre os peixes coletados nos dois pontos ($p > 0.05$) (FIGURA 6).

Comparando as duas espécies, foi observado maior dano ao DNA de *G. brasiliensis*, tanto nos eritrócitos dos exemplares coletados nos dois pontos, quanto no fígado dos exemplares coletados no Parque Costa. Foi também observado maior dano ao DNA no rim dos peixes da espécie *C. rendalli* coletados no Parque Costa ($p < 0.05$). Em relação aos outros órgãos, não foram observadas diferenças significativas entre as duas espécies ($p > 0.05$) (FIGURA 6).

5 DISCUSSÃO

Diversos trabalhos relacionaram o aumento de formação de AENs em peixes com a exposição desses organismos a diferentes substâncias potencialmente genotóxicas e citotóxicas. Alguns desses estudos inclusive, utilizaram as mesmas espécies do presente trabalho. (CARRASCO et al., 1990; SANTOS, 2017; TASNEEM, 2017). Nota-se que a maior frequência dessas alterações observadas em *G. brasiliensis* do Reservatório do Iraí pode estar ligado a maior exposição deles a substâncias tóxicas capazes de aumentar tais alterações.

A diferença observada em *G. brasiliensis* e *C. rendalli* em relação a formação da AEN mais frequente pode ser explicada por fatores espécie-específicos. Os mecanismos de formação dessas AENs ainda não estão totalmente esclarecidos (SERIANI et al., 2011). Mesmo assim, diversos trabalhos utilizando o teste do MNP em *G. brasiliensis* chegaram aos mesmos padrões de formação de AENs observados (JESUS, 2016; SANTOS, 2017; OLIVEIRA et al., 2019; GONÇALVES, 2015). Não foram encontrados trabalhos utilizando o MNP em *C. rendalli*, porém muitos trabalhos utilizando *Oreochromis niloticus*, que também é uma espécie exótica de tilápia, da mesma região de *C. rendalli* e muito próxima filogeneticamente, chegaram aos mesmos padrões de formação de AENs observados no presente trabalho (JESUS, 2016; SANTOS, 2017; GONÇALVES, 2015).

Em relação aos micronúcleos, foi observada uma frequência muito baixa ou nula nas duas espécies. Para a formação dos micronúcleos, é necessário que haja a divisão celular no tecido hematopoiético exposto ao agente citotóxico/genotóxico (FENECH, 2000). Além de poucos estudos sobre o tempo de formação de eritrócitos nas espécies analisadas, o micronúcleo se trata de quebras cromossômicas bruscas não passíveis de reparo e, portanto, sua frequência basal em peixes tende a ser baixa, como observado nas duas espécies deste trabalho (UDROIU, 2006).

Os dados do ensaio cometa revelaram maior dano genético no sangue e fígado dos peixes coletados no ponto referência em relação ao reservatório do Iraí. Tais resultados comprometem a confiabilidade do Parque Ecológico Costa como um bom ponto referência. Além disso, esses resultados destoaram do trabalho de Ramsdorf (2007). Nesse trabalho, os danos observados no DNA de espécies do gênero *Astyanax* coletadas no Parque Costa foram significativamente inferiores a um outro ambiente da região de Curitiba, sabidamente impactado. As análises foram

realizadas no sangue, fígado e rim dos peixes. Entretanto, nesse trabalho, com o decorrer das coletas realizadas no Parque Costa nos anos de 2005 e 2006, notou-se um aumento de contaminação local. Esse fato foi relacionado pela deposição e carreamento de contaminantes aéreos na região. Além disso, não foi realizado outros estudos de biomonitoramento no Parque Ecológico Costa. Dessa forma, a qualidade aquática local pode ter sido modificada ao longo dos últimos anos.

Contudo, analisando os danos no cérebro e rim, o oposto foi observado, com maior dano ao material genético dos peixes coletados no Reservatório do Iraí. Lembrando que a contaminação que ocorre nos ecossistemas aquáticos pode se dar por diferentes vias, como aéreas ou terrestres (PEREIRA, 2004), é possível que diferentes fontes de poluição estão afetando tanto o reservatório do Iraí quanto o Parque Costa. Dessa forma, diferentes xenobióticos podem estar sendo despejados nesses dois ambientes. Como muitas dessas substâncias são tecido-específicas (SUIÇMEZ et al., 2006), sugere-se que elas estão causando danos em diferentes tecidos entre os peixes do reservatório do Iraí e do Parque Costa.

Como já mencionado, o reservatório do Iraí está sob grande pressão urbana, e tem contato com outros rios que abastecem o local (Curralinho, Timbú e Canguiri) (IAP, 2017). Dessa forma, poluentes provenientes de efluentes industriais e domésticos podem estar relacionados diretamente com os danos observados ao DNA das células do cérebro e do rim. O grande aporte de metais já identificado no reservatório do Iraí, podem causar magnificação trófica, e causar danos à saúde dos organismos aquáticos, como alterações nos sistemas nervoso, cardiovascular e renal (MOERI apud BARBARA., 2019).

Como o Parque Ecológico Costa não está em contato superficialmente com rios, é possível que a contaminação local esteja ocorrendo por outras fontes, como aérea ou subterrânea, já que o parque também se encontra perto de uma região urbana. Esses contaminantes podem ter causado danos nos eritrócitos e no tecido hepático, como observado.

Em relação ao Teste do Micronúcleo Písceo, o ensaio cometa se demonstrou mais sensível na identificação de danos no DNA. Isso pode ser explicado pela detecção por meio do ensaio cometa de quebras menores no DNA, como bases apurínicas ou apirimídicas (LANGIE et al., 2015), que são ainda passíveis de reparos celulares (AZQUETA et al., 2019).

6 CONCLUSÃO

As substâncias químicas presentes no Reservatório do Iraí se demonstraram genotóxicas aos peixes das espécies *Geophagus brasiliensis* e *Coptodon rendalli*. Isso se deve ao aumento de AENs observadas em *G. brasiliensis*, além do aumento do dano no DNA do cérebro e rim das duas espécies. Além disso, há indícios de que no Parque Ecológico Costa também existam substâncias químicas com potencial genotóxico, devido ao maior dano ao DNA eritrócitos e do tecido hepático dos peixes coletados nesse ponto. Isso pode estar relacionado com o aumento de contaminantes nesse local nos últimos anos. Dessa forma, o Parque Ecológico Costa não se demonstrou ser um bom ponto referência.

Além disso, as espécies demonstraram diferenças quanto ao tipo de AEN mais frequentemente observada. Seguindo o padrão de muitos estudos, essas diferenças podem ser definidas por características espécie-específicas. *G. brasiliensis* se demonstrou um bom organismo biomonitor devido a sensibilidade a danos identificados tanto pelo ensaio cometa quanto para o Teste do Micronúcleo Písceo. Embora *C. rendalli* se demonstrou mais resistente a formação de AENs do que *G. brasiliensis*, quanto a danos no DNA detectados pelo ensaio cometa, ela também se demonstrou uma espécie sensível.

7 REFERÊNCIAS

ABELHA, M. C. F.; GOULART, E. Oportunismo trófico de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae) no reservatório de Capivari, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 37-45, 2004.

ABILHOA, V.; FONTINO, V. C.; FILHO, D. P. A.; SÁ, P. Z.; ACIOLI, P.; BASTOS, L. P. Composição e Estrutura da Ictiofauna do Reservatório do Iraí, Região Metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. **Research Gate**, 2003. Disponível em <https://www.academia.edu/6064765/COMPOSI%C3%87%C3%83O_E_ESTRUTURA_DA_ICTIOFAUNA_DO_RESERVAT%C3%93RIO_DO_IRA%C3%8D_REGI%C3%83O_METROPOLITANA_DE_CURITIBA_PARAN%C3%81_BRASIL_COMPOSITIO_N_AND_STRUCTURE_OF_THE_FISH_COMMUNITY_OF_THE_IRA%C3%8D_RESERVOIR_CURITIBA_METROPOLITAN_REGION_PARAN%C3%81_STATE_BRAZIL> Acesso em 05 de nov. de 2019.

ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. **Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados**. 1ª Edição. Curitiba: Sanepar, 2005.

ASSOCIAÇÃO Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais - ABRELPE. **Portal Eletrônico**. Disponível em <<http://abrelpe.org.br/brasil-produz-mais-lixo-mas-nao-avanca-em-coleta-seletiva/>> Acesso em 05 de nov. 2019.

AZQUETA, A.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. R. Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1–2, p.41–45, 2011

AZQUETA, A.; MURUZABA, D.; BOUTET-ROBINET, E.; MILIC, M.; DUSINSKA, M.; BRUNBORG, G.; MOLLER, P.; COLLINS, A. R. Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies. **Mutat. Res. Gen. Tox. En**, v. 843, p. 24-32, 2019.

AWAISS, A. et al. *Tilapia rendalli*, Northern Redbreast Tilapia. **The IUCN Red List of Threatened Species**, p. 1-9, 2010

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

BÁRBARA, V. F.; TAVARES, M. G. O.; D'ALESSANDRO, N. C. SILVA, D. M.; FILHO, N. R. A. Avaliação química, ecotoxicológica e genotoxicológica de águas de cavas de mineração a céu aberto. **Eng. Sanit. Ambient**, v. 24, n. 1, p. 131-142, 2019.

BASTOS, W. R.; GOMES, J. P. O.; OLIVEIRA, R. C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E. L.; BERNARDI, J. V. E.; LACERDA, L. D.; SILVEIRA, E. G.; PFEIFFER, W. C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 368, p. 344-351, 2006.

BEATTY, S. J. et al. The tropical south American cichlid, *Geophagus brasiliensis* in Mediterranean climatic south-western Australia. **Aquatic Invasions**, v. 8, n. 1, p. 21–36, 2013.

BORRELY, S. I.; CAMINADA, S. M. L.; PONEZI, A. N.; SANTOS, D. R.; SILVA, V. H. O. Contaminação das Águas por Resíduos de Medicamentos: ênfase ao cloridrato de fluoxetina. **O Mundo da Saúde**, v. 36, n. 4, p. 556-563, 2012

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 465-473, 2003.

CABI - Invasive Species Compendium. Disponível em:
<<http://www.cabi.org/isc/datasheet/121012>>. Acesso em: 5 nov. 2019.

CARRARD, V. C.; LAUXEN, I.; RADOS, P. V.; COSTA, C. H.; FERREIRA, L. A. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. **Research Gate**, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, 2007.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990.

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

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–151, 2004.

ERGENE, S.; CAVAS, T.; CELIK, A.; KOLELI, N.; AYMAK, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, n. 6, p. 421-429, 2007.

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

FERRARO, M. V.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; CESTARI, M. M.; RIBEIRO, C. A. O. Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the Comet Assay, Piscine Micronucleus and Chromosome Aberrations tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FREITAS, C. E. C.; SIQUEIRA-SOUZA, F. K. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da Bacia Amazônica. **Revista Agrogeoambiental**, Ago, p. 39-45, 2009.

GESTEL, C. A. M. V.; BRUMMELEN, T. C. V. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*. v. 5, p. 217-225, 1996.

GONÇALVES, E. S.; SILVA, J. M. B.; PAVESI, T.; MOREIRA, J. C. A importância da determinação analítica de intermediários reativos e de seus produtos de reações com biomacromoléculas: uma Mini Revisão. **Quim. Nova**, v. 37, n. 2, p. 317-322, 2014.

GONÇALVES, H. L. S. **Diferença na frequência basal de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Astyanax altiparanae*, *Geophagus brasiliensis*, *Piaractus mesopotamicus*, *Rhamdia quelen*, *Hoplias intermedius* e *Oreochromis niloticus***. 2015. Monografia (Bacharel em biologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 187-190, 1973.

HOOFTMAN, R. N.; RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, p. 147-152, 1982.

KONINGS, A.; AWAÏSS, A.; AZEROUAL, A.; GETAHUN, A.; HANSSENS, M.; LALÈYÈ, P.; MARSHALL, B.; MOELANTS, T.; NATAKIMAZI, G; TWEDDLE, D. *Coptodon rendalli*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018. Disponível em <<https://www.iucnredlist.org/species/60690/47209450>>. Acesso em: 5 nov. 2019.

IAP. **Monitoramento da qualidade de água dos rios da Bacia do Alto Iguaçu, na região metropolitana de Curitiba, no período de 2005 a 2009**. Instituto Ambiental do Paraná; Curitiba, 2009.

JESUS, I. S.; CESTARI, M. M.; BEZERRA, M. A.; AFFONSO, P. R. A. M. Genotoxicity Effects in Freshwater Fish from a Brazilian Impacted River. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 96, p. 490-495, 2016

LANGIE, S. A. S.; AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The comet assay: past, present, and future. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 1-3, 2015.

LEITE, N. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; GRASSI, M. T. Distribution and origin of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from an urban river basin at the Metropolitan Region of Curitiba, Brazil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 6, p. 904–911, 2011.

MARKERT, B.A., A.M. BREURE & H.G. ZECHMEISTER. Definition, strategies, and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. **Trace metals and other contaminants in the environment**, p. 3-39, 2003.

MIR, M. I.; KHAN, S. BHAT, S. A.; RESHI, A. A.; SHAH, F. A.; BALKI, M. H.; MANZOOR, R. Scenario of Genotoxicity in Fishes and Its Impact on Fish Industry. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**. v. 8, n. 6, p. 65-76, 2014.

MOLETTA, I. M. **Área Degradada pela Extração de Areia: um estudo da derivação da paisagem no bairro do Umbará**. 2005. Dissertação (mestrado em geografia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba PR.

MORAES, M. F. P. G.; BARBOLA, I. F.; DUBOC, L. F. Feeding habits and morphometry of digestive tracts of *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes, Cichlidae), in a lagoon of high Tibagi river, Paraná state, Brazil. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, n. 1, p. 37-45, 2004.

NERI, M.; MILAZZO, D.; UGOLINI, D.; MILIC, M.; CAMPOLONGO, A.; PASQUALETTI, P.; Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. **Mutagenesis**, v. 30, p. 155-163, 2015.

NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. D. X. O.; ARBILLA, G. FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK. J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) e seus derivados nitrados (nhpas): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v 23, n 6, p 765-773, 2000.

NUNES, M. V.; ROCHA, O.; VERANI, J. R. Trophic interactions between the fish *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae) and the benthic macroinvertebrate community. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**. v. 49, n. 1, p. 11-17, 2014.

OMS, **O impacto de substâncias químicas sobre a saúde pública: Fatores conhecidos e desconhecidos**. Brasília, DF: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 123, p. 291-298, 1984.

PEREIRA, R. S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**, v. 1, n. 1, p. 20-36, 2004.

PINTO, G. M. F.; SILVA, K. R.; PEREIRA, R. F. A. B.; SAMPAIO, S. I. Estudo do descarte residencial de medicamentos vencidos na região de Paulínia (SP), Brasil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.19, n.3, p. 219-224, 2014.

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* sp b e *A. Altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda Cangüiri – UFPR)**. 2007. Dissertação (mestrado em genética). Faculdade de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba PR.

REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. **Águas Doces No Brasil - Capital Ecológico, Uso e Conservação**. 3ª Ed. São Paulo: Escrituras, 2006.

RICHARDSON, S. D.; KIMURA, S. Y. Emerging environmental contaminants: Challenges facing our next generation and potential engineering solutions. **Environmental Technology & Innovation**, v. 8, p. 40–56, 2017.

RIVERO, C. R. G. **Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes do Lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil.** 2007. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

ROCHA, A. S.; LINS, J. P.; SILVA, D. X.; SANTOS, P. L. R.; JÚNIOR, W. A. S.; OLIVEIRA, M. S.; PEREIRA, D. B. Ensaio Ecotoxicológicos com Uso de líquens como Bioindicadores do Ar no Eixo Monumental de Brasília, 2015. Disponível em <<http://copec.eu/shewc2015/proc/works/93.pdf>> Acesso em 05 de nov. 2019.

SANTOS, G. S. **Avaliação dos efeitos do cobre em duas espécies de ciclídeos (*Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus*) utilizando multibiomarcadores.** 2017. Tese (doutorado em Ecologia e Conservação). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified dna by nuclear budding and micronucleation during S-phase. **Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 6, p. 1307-1320, 1998.

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

SILVA, J. M.; SANTOS, J. R. Toxicologia de Agrotóxicos em Ambientes Aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 4, p. 565-573, 2007.

SILVEIRA, M. P. Aplicação do Biomonitoramento para Avaliação da Qualidade da Água em Rios. **Embrapa**, ed 1. 2004.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res**, v. 175, 1988.

SISTEMA Nacional de Informação sobre Saneamento – SNIS. **Portal Eletrônico** Disponível em <<http://www.snis.gov.br>>, acessado em 05 de nov. 2019.

SUIÇMEZ, M.; KAYIM, M.; KÖSEOĞLU, D.; HASDEMİR, E. Toxic effects of lead on the liver and gills of *Oncorhynchus mykiss* WALBAUM 1792. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 77, n. 4, p. 551-558, 2006.

SODRÉ, F. F.; SCHNITZLER, D. C.; SCHEFFER, E. W. O.; GRASSI, M. T. Evaluating Copper Behavior in Urban Surface Waters Under Anthropoc Influence. A Case Study from the Iguaçu River, Brazil. **Aquatic Geochemistry**, v. 18, n. 5, p. 389–405, 2012.

TASNEEM, S.; YASMEEN, R. Induction of Micronuclei and Erythrocytic Nuclear Abnormalities in Peripheral Blood of Fish *Cyprinus carpio* on Exposure to Karanjin. **Iranian Journal of Toxicology**, v. 12, n. 2, p. 37-43, 2017.

TOLBERT, p. e.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, v. 271, p. 69-77, 1992.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*. v.79, p.201-204, 2006

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

WHO, Environmental health criteria for methylmercury. **Environmental Health Criteria**, v. 101, p. 144, Geneva, 1990.

ZAGANINI, R. L. **Caracterização do regime alimentar de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) e *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1897) na represa de Barra Bonita, Médio Rio Tietê, SP.** 2009. Dissertação (mestrado em zoologia) – Faculdade de Ciências Biológicas, universidade estadual paulista, Botucatu SP.

ZHANG, X.; HONGWEN, S.; ZHANG, Z.; NIU, Q.; CHEN, Y.; CRITTENDEN, J.C. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. **Chemosphere**, v. 67, p. 160–6, 2007.