

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS CERRO LARGO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS**  
**SUSTENTÁVEIS**

**MANOEL FRANCISCO MENDES LASSEN**

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS, GENOTÓXICAS E ESTRESSE**  
**OXIDATIVO EM PEIXES SUBMETIDOS A ÁGUAS SUPERFICIAIS**  
**ANTROPIZADAS**

**CERRO LARGO**

**2020**

**MANOEL FRANCISCO MENDES LASSEN**

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS, GENOTÓXICAS E ESTRESSE  
OXIDATIVO EM PEIXES SUBMETIDOS A ÁGUAS SUPERFICIAIS  
ANTROPIZADAS**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Linha de Pesquisa: Qualidade Ambiental

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suzymeire Baroni  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Roberta Daniele Klein

**CERRO LARGO**

**2019**

## **Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Lassen, Manoel Francisco Mendes

Alterações histopatológicas, genotóxicas e estresse oxidativo em peixes submetidos a águas superficiais antropizadas / Manoel Francisco Mendes Lassen. -- 2020. 97 f.:il.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Suzumeire Baroni

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Roberta Daniele Klein

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, Cerro Largo, RS, 2020.

1. Astyanax. 2. Danio rerio. 3. Micronúcleo e Anormalidades nucleares.. 4. Estresse oxidativo. 5. Histopatologia de brânquias. I. Baroni, Suzumeire, orient. II. Klein, Roberta Daniele, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

**MANOEL FRANCISCO MENDES LASSEN**

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS, GENOTÓXICAS E ESTRESSE  
OXIDATIVO EM PEIXES SUBMETIDOS A ÁGUAS SUPERFICIAIS  
ANTROPORIZADAS**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis

Área de Concentração: Ciências Ambientais

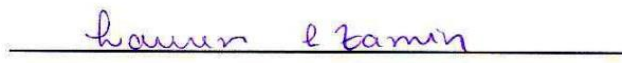
Linha de Pesquisa: Qualidade Ambiental

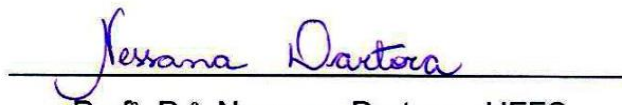
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suzymeire Baroni  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Roberta Daniele Klein

Esta Dissertação foi defendida e aprovada pela banca em 29/05/2020

BANCA EXAMINADORA

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Suzymeire Baroni - UFFS

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Lauren Lucia Zamin - UFFS

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Nessana Dartora - UFFS

## **DEDICATÓRIA**

Este trabalho de pesquisa é inteiramente dedicado a minha mãe. Sem o incentivo e apoio dela não alcançaria as realizações dos meus sonhos. Muito obrigado!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS por disponibilizar condições necessárias para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os amigos, colegas de estudo e do laboratório de genética da UFFS, familiares e pessoas que de alguma forma contribuíram no passado ou no presente para que eu ingressasse e concluísse essa etapa em minha vida.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Suzymeire Baroni pelo auxílio em todas as etapas deste trabalho.

À minha co-orientadora Dr.<sup>a</sup> Roberta Daniele Klein também pelo auxílio em todas as etapas deste trabalho. Estendo meus agradecimentos a todos os técnicos de laboratório da universidade em especial ao McS. Rodrigo Patera Barcelos pela grande contribuição.

A meus tios, Pedro e Salet, pelo apoio, pela confiança e carinho.

A minha namorada, parceira de vida, Alana.

A minha mãe, Josina, pelo apoio incondicional e pela confiança demonstrada ao longo de minha formação pessoal e profissional e a minha irmã Dulce pelo apoio e carinho.

À Deus, pela compaixão, vida e proteção.

## RESUMO

Os efluentes domésticos, industriais e agrícolas despejados diariamente direta ou indiretamente nos ambientes aquáticos carregam substâncias tóxicas, genotóxicas e mutagênicas que podem desencadear processos nocivos aos ecossistemas em especial a indivíduos expostos. Diversas são as pesquisas de biomonitoramento com organismos bioindicadores, assim testes citogenéticos, histológicos e de estresse oxidativo vem sendo utilizados com o intuito de detectar corpos d'água contaminados por substâncias xenóbicas. O objetivo dessa dissertação foi investigar as alterações celulares, genotóxicas e clastogênicas, assim como os danos oxidativos apresentados por peixes dos gêneros *Astyanax* spp. e peixes *Danio rerio* submetidos a água do Rio Ijuí- RS., através da exposição de duas espécies de peixes, em três esforços amostrais para peixes do gênero *Astyanax* e uma para os *zebrafish*, as condições de quatro pontos do rio Ijuí localizado no noroeste do estado do Rio Grande do Sul – Brasil, sendo esse um grande afluente do rio Uruguai. Foram realizados teste de micronúcleo e anormalidades nucleares em eritrócitos de indivíduos do gênero *Astyanax* spp.(lambaris) expostos *in loco* por 96 horas na água dos quatro pontos. Os resultados demonstram significância quanto as anormalidades nucleares, entretanto, não sendo significativo para o teste de micronúcleo. Os resultados histológicos das brânquias demonstram danos moderados e severos para todos os pontos em relação ao grupo controle. Os testes de estresse oxidativo realizado com o tecido hepático não apresentaram diferenças significativas para a maioria dos pontos. Os testes micronúcleos e anormalidades nucleares realizados com peixes *Danio rerio* (*zebrafish*) expostos as águas do rio em aquários por 96 horas apresentam significância para a análise de anormalidades nucleares para todos os pontos monitorados, tendo valores alarmantes no segundo ponto, que tem como característica ser o mais impactado por resíduos agropecuários, por outro lado, esses pontos não apresentam significância para o teste de micronúcleos, assim com para os testes com lambaris. Consideramos que os resultados sinalizam riscos de contaminação desse corpo d'água o qual tem importância sócio-econômica no uso de recurso hídrico para abastecimento de cidades e uso agropecuário.

Palavras-chave: *Astyanax*, *Danio rerio*, micronúcleo, histopatologia de brânquias, estresse oxidativo, anormalidades nucleares.

## ABSTRACT

Domestic, industrial and agricultural effluents that are directly or indirectly discharged into water bodies carry toxic, genotoxic and mutagenic substances that can trigger harmful processes to ecosystems, especially to the exposed individuals. There are several researches in biomonitoring with bioindicator organisms, thus cytogenetic, histological and oxidative stress tests have been applied in order to detect water bodies contaminated by xenobiotic substances. The aim of this dissertation aimed was to investigate genotoxic and clastogenic cellular alterations, as well as the oxidative damaged presented by fish of the genus *Astyanax spp.* (lambaris) and *Danio rerio* (zebrafish), exposed to water of the Ijuí River, through the exposure of two fish species, in three sampling efforts, to the conditions of four points of the Ijuí River, located in the northwest region of Rio Grande do Sul – Brazil, being a major tributary of Uruguay River. Micronucleus and nuclear abnormalities tests were carried out on erythrocytes from individuals of the genus *Astyanax spp.* (lambaris) exposed *in loco* for 96 hours to the water of the four points. The results demonstrate significance for the nuclear abnormalities, however, for the micronucleus test, they were not significant. The histological results of the gills show severe and moderate damage for all sampling points compared to the control group. The oxidative stress tests, performed with liver tissue, did not present significant differences for most points. The micronucleus and abnormalities tests carried out with *Danio rerio* (zebrafish) exposed to waters of the river in aquariums, for 96 hours, presented significance in the nuclear abnormalities analysis for all the monitored sampling points, having alarming values in the second point, which has the characteristic of being the most impacted by agricultural residues, on the other hand, these points did not present significance for micronucleus tests, in the same way as the tests with lambaris. We consider that the results indicate risks of contamination of this water body, that has a socio-economic importance in the consumption of water resources to supply cities and agricultural use.

Keywords: *Astyanax*, *Danio rerio*, micronucleus, gill histopathology, oxidative stress, nuclear abnormalities.



## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Tabela 1** – Exemplos de estudos realizados com peixes do gênero *Astyanax* e o peixe *Danio rerio* para avaliar toxicidade de agroquímico.....**20**

**Tabela 2** - Estudos realizados no território brasileiro utilizando a histologia como ferramenta de avaliação da contaminação e contaminantes ambientais.....**31**

### DESENVOLVIMENTO

#### CAPITULO 1 - GENOTOXICIDADE E HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS EM *Astyanax* spp. SUBMETIDOS A ÁGUAS SUPERFÍCIAIS ANTROPIZADAS

**Tabela 1** - Classificação das alterações histopatológicas das brânquias quanto e a severidade das lesões de acordo com Poleksic e Mitrovic-tutundzic (1994) adaptado pelo autor.....**45**

**Tabela 2** - Parâmetros físico-químicos da água do rio depois do teste de 96 horas com *Astyanax*.....**47**

**Tabela 3** - Somatório total dos valores dos MN e AN do número total de peixes do controle e dos testes submetidos ao teste de Kruskal Wallis ao nível de 5% de significância.....**48**

**Tabela 4** - Variação das chuvas e a ocorrência de AN e MN.....**50**

**Tabela 5** - Tabela dos valores de p gerado pelo teste T entre os pontos de coleta referente ao IAH das brânquias.....**53**

#### CAPITULO 2 - ESTRESSE OXIDATIVO COMO RESPOSTA DA POLUIÇÃO DE ÁGUAS SUPERFÍCIAIS ANTROPIZADAS NO FÍGADO DE *Astyanax* spp.

**Tabela 1** - Parâmetros físico-químicos da água do rio no momento da eutanásia dos lambaris.....**62**

#### CAPÍTULO 3. DANOS CELULARES EM ERITRÓCITOS DE DANIO RERIO SUBMETIDOS À ÁGUA ANTROPIZADA (Cell damage in *Danio rerio* erythrocytes subjected to anthropized water.)

**Table 1.** Physicochemical parameters of the aquarium water at the time of *zebrafish* euthanasia.....**69**

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Lambari (*Astyanax lacustris*). .....24
- Figura 2** – Zebrafish (*Danio rerio*).....25
- Figura 3** – Esquema geral da formação de MN.....27
- Figura 4** – Eritrócito normal em A e eritrócitos micronucleadas B, C, D, E.....27
- Figura 5** – Anormalidades nucleares: A- blebbed; B – lobbed; C – notched; D – vacuolated; E - Binúcleo; F – cariorréxis.....28
- Figura 6** – Esquema da coleta de sangue e as etapas da confecção dos esfregaços.....30
- Figura 7** – Esquema representativo das células branquiais e as possíveis alterações mais encontradas em estudos histopatológicos. Brânquia normal (A), lâmina basal (lb), célula mucosa (mu), célula cloreto (cc), célula pilar (pi), célula epitelial (ce), seio venoso lamelar (svl), canal sanguíneo marginal (csm); B, C, D e F, alterações mais encontradas.....34
- Figura 8** – Vias de formação de espécies pró-oxidantes e vias de destoxificação pelo sistema antioxidante.....37

### DESENVOLVIMENTO

#### CAPITULO 1 - GENOTOXICIDADE E HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS EM *Astyanax* spp. SUBMETIDOS A ÁGUAS SUPERFÍCIAIS ANTROPIZADAS

- Figura 1** – Mapa do Rio Ijuí com marcação dos pontos e barramentos.....43
- Figura 2** – Figura 1 - Alterações morfológicas nucleares.....48
- Figura 3** – IAH (Índice de Alteração Histológica) observado nos indivíduos nas 3 coletas (10 peixes por coleta). Parâmetros IAH: 0-10 = funcionamento normal; 11-20 = alterações leves; 21-50 = alterações moderadas; >51 = lesões severas (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).....52
- Figura 4** – Alterações histológicas observadas em brânquias dos peixes do Rio Ijuí. A- Visão geral de uma brânquia; B - Aneurisma lamelar; C - Elevação do epitélio lamelar; D - Desarranjo lamelar; E - Fusão completa de algumas lamelas; F - Destruição do epitélio lamelar e Fusão incompleta das lamelas.....53

#### CAPITULO 2 – ESTRESSE OXIDATIVO COMO RESPOSTA DA POLUIÇÃO DE ÁGUAS SUPERFÍCIAIS ANTROPIZADAS NO FÍGADO DE *Astyanax* spp.

- Figura 1** – Mapa do Rio Ijuí com marcação dos pontos e barramentos.....58
- Figura 2** – Peroxidação lipídica em fígado de *Astyanax* spp. Expostos a águas superficiais antropizadas. Dados são expressos com média  $\pm$  erro padrão (n= 130). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $p < 0,05$ ) .....63

**Figura 3** – Proteínas carboniladas em fígado de *Astyanax* spp. Expostos a águas superficiais antropizadas. Dados são expressos como média ± erro padrão (n=130) .....64

**CAPÍTULO 3. DANOS CELULARES EM ERITRÓCITOS DE *DANIO RERIO* SUBMETIDOS À ÁGUA ANTROPIZADA (Cell damage in *Danio rerio* erythrocytes subjected to anthropized water.)**

**Figure 1** – Location of the sampling points.....68

**Figure 2** – Absolute frequencies of micronuclei observed in 30,000 *zebrafish* erythrocytes (per aquarium), kept in control and anthropized fresh water.....70

**Figure 3** – Images of the abnormalities found in blood erythrocytes of *Danio rerio* subjected to water collected at the four points of the Ijuí River.....71

**APÊNDICES**

**Figura 1** – Ponto 1 localizado no município de Santo Ângelo.....88

**Figura 2** – Ponto 2 localizado no município de Cerro Largo.....89

**Figura 3** – Ponto 3 localizado no município de Cerro Largo .....90

**Figura 4** – Ponto 4 localizado no município de Roque Gonzales.....91

**Figura 5** – Ficha de coletas de dados a campo.....92

## LISTA DE SIGLAS, SIMBOLOS E ABREVIATURAS

ABS – Absorção  
AL – Absorbância Líquida  
AN - Anormalidades Nucleares  
ANOVA - Análise de variância  
BHT – hidroxitolueno butilado  
BSA - Albumina sérica bovina  
CAT - catalase  
CC - Células de Cloreto  
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil  
CO - Grupos carbonílicos  
COD - Condutividade  
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente  
DDT – Diclorodifeniltricloroetan  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
DNPH – 2,4-dinitrofenil-hidrazina  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio  
GPx – Glutathione peroxidase  
GSH – Glutathione  
GST – Glutathione S-transferase  
H<sub>2</sub>O – Água  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio  
HCl – Ácido clorídrico  
HE – Hematoxilina e Eosina  
IAH – Índice de Alterações Histopatológicas  
KCl – Cloreto de potássio  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato monopotássico  
LOO\* – Radical Peroxil  
LPO – Peroxidação lipídica/lipoperoxidação  
M – Molar  
MDA – Malondialdeído/Aldeídos

mg – Miligrama

ml – Mililitro

mM – Milimolar

MN – Micronúcleos

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Fosfato dissódico

NaCl – Cloreto de sódio

nm – Nanomolar

nmol – Nanomol / nanomolar

°C – Temperatura em graus Celsius

OD - Oxigênio dissolvido

P1 – Ponto 1

P2 – Ponto 2

P3 – Ponto 3

P4 – Ponto 4

pH – potencial Hidrogeniônico

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SEMA – Secretaria Estadual de Meio Ambiente

SNK – Student-Newman-Keuls

SOD – Superóxido dismutase

SUS – Sistema Único de Saúde

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TBARS – Teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

TMP – Tetrametoxipropano

UFFS – Universidade Federal da Fronteira Sul

Zn – Zinco

µL – Microlitros

µM – Micromolar

4-HNE - 4-hidroxi-nonenal

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
LISTA DE TABELAS .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
LISTA DE SIGLAS, SIMBOLOS E ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS SUPERFICIAIS.....	18
2.1.1. Contaminação das águas superficiais por resíduos urbanos e industriais ...	19
2.1.2. Contaminação das águas superficiais por resíduos agrícolas .....	20
2.2. PEIXES COMO BIOINDICADORES DA QUALIDADE DAS ÁGUAS.....	22
2.2.1. Lambaris ( <i>Astyanax spp</i> ) como bioindicadores.....	23
2.2.2. Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) como organismo modelo .....	24
2.3. BIOMONITORAMENTO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS.....	25
2.3.1. Teste do Micronúcleo (MN) e Anormalidades Nucleares em Peixes (AN) ...	26
2.3.2. Análise histopatológica em Peixes .....	31
2.3.3. Avaliação do estresse oxidativo em Peixes .....	35
3. DESENVOLVIMENTO .....	39
3.1. CAPITULO 1 - GENOTOXICIDADE E HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS EM <i>Astyanax spp.</i> SUBMETIDOS A ÁGUAS SUPERFÍCIAS ANTROPIZADAS ....	40
3.1.1. INTRODUÇÃO .....	40
3.1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1.2.1. ÁREA DE ESTUDO E PROTOCOLO DE COLETA .....	41
3.1.2.1.1. Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí.....	41
3.1.2.1.2. Caracterização dos pontos e análise dos parâmetros físico-químicos ....	42
3.1.2.2. ANÁLISE DE GENOTOXICAS E HISTOPATOLOGIA.....	43
3.1.2.2.1. Teste <i>in loco</i> - <i>Astyanax spp.</i> .....	43
3.1.2.3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	46
3.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
3.1.3.1. CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE.....	46
3.1.3.2. TESTE DE MICRONÚCLEO E ANORMALIDADES NUCLEARES DE <i>Astyanax spp.</i> EXPOSTOS A ÁGUAS DE AMBIENTES ANTROPIZADOS.....	47
3.1.3.3. HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS DE <i>Astyanax spp.</i> EXPOSTOS A ÁGUAS DE AMBIENTES ANTROPIZADOS .....	50

3.2. CAPÍTULO 2 - ESTRESSE OXIDATIVO COMO RESPOSTA DA POLUIÇÃO DE ÁGUAS SUPERFÍCIAIS ANTROPIZADAS NO FÍGADO DE <i>Astyanax spp.</i> .....	56
3.2.1. INTRODUÇÃO .....	56
3.2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.2.2.1. ÁREA DE ESTUDO E PROTOCOLO DE COLETA .....	57
3.2.2.1.1. Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí.....	57
3.2.2.1.2. Caracterização dos pontos e análise dos parâmetros físico-químicos .....	57
3.2.2.2. MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO .....	59
3.2.2.2.1. Quantificação de Proteínas Carboniladas.....	59
3.2.2.2.2. Análise de Peroxidação Lipídica – TBARS .....	61
3.2.2.3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	61
3.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
3.2.3.1. CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE.....	62
3.2.3.2. ESTRESSE OXIDATIVO COMO RESPOSTA DA POLUIÇÃO NO FÍGADO DE <i>Astyanax spp.</i> .....	62
3.3. CAPÍTULO 3. DANOS CELULARES EM ERITRÓCITOS DE <i>DANIO RERIO</i> SUBMETIDOS À ÁGUA ANTROPIZADA.....	66
4. CONCLUSÃO .....	74
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
6. APÊNDICES .....	88

## 1. INTRODUÇÃO

Considerando a amplitude da interferência humana na natureza, a poluição e a contaminação ambiental são inevitáveis. O impacto causado na natureza vêm avançando devido ao aumento de substâncias potencialmente poluidoras lançadas no ar, na água e nos solos. Dentre os três, o ecossistema aquático é considerado o mais suscetível à poluição e contaminação (SILVA, 2004). A poluição da água é associada com o descumprimento de normas e leis ambientais, ferindo principalmente as regras de descarte de efluentes domésticos e industriais. Sobretudo no Brasil a aplicação de insumos agrícolas e manejo inadequado do solo, trazem forte contribuição para a degradação ambiental dos cursos de água (ALMEIDA, 2015).

A utilização de agrotóxicos é uma prática habitualmente feita de forma indiscriminada, sem que haja requerimento efetivo do solo e/ou das plantas. Esse uso descontrolado tem implicação direta na qualidade dos ecossistemas aquáticos. Dessa forma, é necessário o equilíbrio entre os benefícios da utilização dos agroquímicos com a devida proteção do meio ambiente e da qualidade de vida (FARIA, 2009).

No rio Ijuí, localizado no noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, além do impacto das cidades e de áreas agrícolas, acrescenta-se a isso a devastação da mata ciliar, a qual é evidente ao longo de toda a extensão do rio. Quando presente a mata ciliar funciona como um filtro natural para o rio, barrando contaminantes carregados pela água e pelo solo através de processos como, erosão e assoreamento, e ainda, é o habitat de inúmeras espécies de aves, répteis e mamíferos que utilizam o rio em busca de recursos alimentares.

Pesquisadores estão buscando conhecimento sobre a natureza tóxica dos elementos químicos presentes na água, principalmente através dos testes de toxicidade, pois são instrumentos úteis na avaliação dos danos causados pelos contaminantes ambientais (MELETTI, 2003a). Diversos estudos ecotoxicológicos nos ambientes impactados pela poluição são subsídios para o manejo de ambientes menos degradados, e correção de danos nos já impactados, bem como, apresentam importância fundamental para identificar espécies vulneráveis e espécies indicadoras da qualidade ambiental (MELETTI, 2003b).

O monitoramento da qualidade das águas dos rios é, portanto, necessário para detectar a presença e quantificar as substâncias presentes na água dos corpos



hídricos e para isso estudos de biomonitoramento ambiental com diferentes organismos bioindicadores têm sido necessários, avaliando antão o impacto sobre a qualidade de vida dos organismos presentes no ecossistema e possíveis impactos à saúde humana (DALZUCHIO et al., 2017).

Se considerarmos que os mais diversos contaminantes ambientais sofrem misturas e interações químicas durante a exposição, os organismos como peixes, podem apresentar consequências consideráveis sobre seu metabolismo e seu material genético. Neste contexto, o monitoramento através de biomarcadores é uma ferramenta eficiente no diagnóstico dos impactos ambientais . A literatura refere-se à biomarcadores como uma medida quantitativa das alterações ou componentes celulares, processos, estruturas e funções relacionadas com a exposição dos organismos aos contaminantes ambientais (AMEUR et al., 2015; ARSLAN et al., 2015; DALZUCHIO et al., 2017).

Um conjunto de biomarcadores é geralmente usado para avaliar os efeitos biológicos de poluentes. Tais biomarcadores são utilizados especialmente como um aviso antecipado de um ponto de extremidade biológica prejudicial a esses indivíduos (FAHEEM; LONE, 2017).

O objetivo dessa dissertação foi investigar as alterações celulares, genotóxicas e clastogênicas, assim como os danos oxidativos apresentados por peixes dos gêneros *Astyanax spp.* e peixes *Danio rerio* submetidos a água do Rio Ijuí- RS.

A verificação da contaminação ambiental através de organismos bioindicadores, como os peixes, pode ser fonte de dados para corroborar a hipótese de que o excesso de agroquímicos eleva ou potencializa patologias humanas. O uso de peixes como um bioindicador é comprovadamente eficiente, pois os animais apresentam alta sensibilidade a mudanças em seu ambiente. Este trabalho se justifica mediante o fato da região ser tipicamente agrícola com uso constante de defensivo agrícola e alto índice de doenças relacionadas a possível influência ambiental.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS SUPERFICIAIS**

As consequências da antropização em relação as condições ambientais são notadas diariamente nos ecossistemas, os quais estão em um processo avançado de degradação. É importante destacar que nem sempre a presença de xenobióticos provoca danos imediatos e aparentes, podendo ocorrer inúmeros processos onde a biota poderá transformar, eliminar ou acumular tais contaminantes com o objetivo de manter o equilíbrio do ambiente (KASPER, 2019; SILVA; NEPOMUCENO, 2010). Muitas das substâncias que estão sendo incorporados ao ambiente por ações antrópicas em larga escala vem saturando as condições de reciclagem dos ecossistemas e os afetam diretamente, promovendo perturbação nos processos vitais que garantem a sobrevivência (KASPER, 2019).

A inconsequência humana é representada pelo grande número de substâncias tóxicas, genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas que têm sido encontradas em diversos rios que sofrem impacto do descarte de efluentes domésticos, industriais e agrícolas. O descarte dessas substâncias leva a um sério e grave problema que, apesar da legislação vigente, continua ocorrendo irresponsavelmente (VILCHES, 2009).

A água de escoamento superficial é um dos fatores que mais contribuem para a mudança da qualidade do rios. Neste contexto as alterações ambientais causadas, pela utilização excessiva e indiscriminada de recursos naturais, as interferências em ecossistemas e a globalização cada vez mais intensa contribuem para menor qualidade da água. Somado às atividades de abastecimento público, irrigação, uso industrial, navegação, recreação e aquicultura, implicam em péssimas condições futuras. Embora essas atividades variem de acordo com a ocupação da bacia hidrográfica e com a organização econômica e social de cada região, todas elas geram impactos negativos sobre a área de drenagem (BRITO, 2009; GALVAN, 2011).

Substâncias genotóxicas não causam contaminação apenas nos organismos aquáticos, mas no ecossistema inteiro podendo afetar diretamente os humanos através da ingestão desses organismos. Um dos grandes problemas está presente na interação química desse agentes genotóxicos com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa, ou mesmo quebras da molécula de DNA. Normalmente

essas lesões são reparadas pelo próprio sistema da célula. Em caso de fixação da lesão, provoca mutações, que podem perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação (MATSUMOTO et al., 2006).

O monitoramento ambiental é hoje uma ferramenta fundamental para a administração dos recursos naturais. Pois oferece conhecimento e informações básicas para avaliar a contaminação presente, entender como os sistemas ambientais estão dando suporte às políticas ambientais. O monitoramento consiste em observações repetidas de uma substância química ou mudança biológica, com um propósito definido de acordo com um planejamento prévio ao longo do tempo e espaço, utilizando métodos comparáveis e padronizados (BRITO, 2009).

### **2.1.1. Contaminação das águas superficiais por resíduos urbanos e industriais**

As causas da contaminação das águas no Brasil estão ligadas ao processo de expansão urbanas, principalmente no final do século XX. Com nenhum planejamento, e por uma visão onde os leitos d'água foram considerados apenas receptores e meios de escoamento de resíduos domésticos e industriais (MOTA et al., 2009).

Predominava a ideia de que a "diluição é a solução", quanto maior um corpo d'água, maior seria o volume de contaminação que se poderia jogar nele. Segundo Gouveia (2012), o manejo e tratamento adequado dos resíduos e esgoto é uma importante estratégia de preservação do meio ambiente, assim como de promoção e proteção da saúde.

No Brasil, apenas 45% da população tem o seu esgoto tratado, sugerindo que 55% das residências não recebem tratamento, ou seja, aproximadamente 100 milhões de pessoas não possuem o serviço básico de saneamento (BRASIL; SNIS, 2016).

Outro agravante é a deposição de lixo em áreas inadequadas, uma vez que, conseqüentemente ele é carregado pelas águas da chuva até os corpos hídricos, podendo liberar substâncias que são solubilizadas pelas águas afetando inúmeros organismos (GOUVEIA, 2012).

Os rejeitos urbanos oriundos das residências compreendem uma vasta diversidade de substâncias, as quais abrangem químicos orgânicos e inorgânicos, microrganismos patogênicos e moléculas sintéticas de grande complexidade que foram incorporados no cotidiano da sociedade (GOUVEIA, 2012).

### 2.1.2. Contaminação das águas superficiais por resíduos agrícolas

A poluição causada por resíduos agrícolas pode ocorrer de forma pontual ou difusa. A pontual é causada de forma local, por criação de animais em sistemas de confinamento onde grandes quantidades de dejetos são despejados ao ambiente. Já a poluição difusa é aquela causada principalmente pelo deflúvio superficial, a lixiviação e o fluxo de macro poros (KASPER, 2019).

Dentre os contaminantes aquáticos os agrotóxicos representam os agentes mais tóxicos para a biota. Estes agroquímicos empregados de forma exacerbada afetam os organismos alvo, mas também os não-alvos o que acarreta um risco para todos os organismos expostos (MERTEN; MINELLA, 2002).

O agronegócio brasileiro é uma das principais atividades econômicas nacionais. Em 2018, a soma de bens e serviços gerados no agronegócio chegou a R\$ 1,44 trilhão ou 21,1% do PIB brasileiro. O valor bruto da produção do agronegócio alcançou R\$ 614,01 bilhões em 2018, dos quais R\$ 395,23 bilhões na produção agrícola e R\$ 218,78 no segmento pecuário. Anualmente responde por cerca de um terço das exportações nacionais (CNA, 2019). O potencial de contaminação ambiental e humana pelos agrotóxicos, bem como seus impactos sobre a biota é estudado de maneira ampla e mostra que são diversas as formas e os graus de poluição (MOREIRA et al., 2012).

Segundo dados da Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o estado do Rio Grande do Sul tem registrado taxa média de consumo de agrotóxicos de 10,49 kg/ha entre 2010 e 2012. Em 2014 foram comercializados 1.552.998.056 kg de agroquímicos (BRASIL, 2018).

Inúmeras pesquisas vêm demonstrando que os agrotóxicos representam uma das fontes de contaminação dos corpos hídricos. A ação de diferentes agrotóxicos sobre os organismos aquáticos tem sido tema recorrente de estudos em diversas partes do mundo (tabela 1).

**Tabela 1** – Exemplos de estudos realizados com peixes do gênero *Astyanax* e o peixe *Danio rerio* para avaliar toxicidade de agroquímicos.

<b>Autor</b>	<b>Avaliação</b>	<b>Organismo Modelo</b>	<b>Agroquímicos Avaliados</b>	<b>Resultados</b>
--------------	------------------	-------------------------	-------------------------------	-------------------

<b>Nakagome et al. (2007)</b>	Avaliaram a dose letal (CL50)	<i>Danio rerio</i>	2,4-D, Metsulfurometílico, Carfentazonaetílica, Bentazona, Quincloraque, Clomazona, Oxadiazona, Oxifluorfem, Bispiribaque-sódico, Pirazossulfurometílico, betaciflutrina, Carbofurano, Fipronil, Lambdacialotrina	Letalidade dos agroquímicos
<b>Disner et al. (2011) Silva (2014)</b>	Efeitos sobre DNA	<i>Astyanax altiparanae</i>	Glifosato	Danos prejudiciais aos indivíduos
<b>Goldoni (2012)</b>	Efeitos sobre DNA	<i>Astyanax jaculiensis</i>	Mancozeb	Danos prejudiciais aos indivíduos
<b>Matozo et al. (2015)</b>	Efeitos sobre DNA	<i>Astyanax altiparanae</i>	Ridomil	Danos prejudiciais aos indivíduos

Fonte: Elaborado pelo autor 2020.

Como é possível observar na tabela 1, lambaris e *zebrafish* já foram utilizados em estudos para verificar danos causados por agroquímicos, tais estudos apresentaram resultados semelhante e mostram impacto desses produtos sobre principalmente o DNA dos indivíduos testados.

A contaminação de ambientes aquáticos vem crescendo e um dos principais responsáveis pela degradação destes ecossistemas é o alto consumo de agroquímicos. As estratégias para redução da poluição devido às atividades agrícolas devem ter como meta a redução do deflúvio superficial, a redução do uso de agroquímicos e o manejo adequado dos efluentes produzido (MERTEN; MINELLA, 2002).

Os principais impactos causados nos rios podem ser na biota aquática, bem como na intoxicação e morte de peixes com severas alterações estruturais e funcionais de suas células. Peixes destinados para consumo humano apresentam

biocumulação de agrotóxicos, como o diclorodifeniltricloroetano (DDT) e pesquisas mostram mudanças graves em ciclos, atividades e reprodução de peixes e anfíbios. Em outras pesquisas já evidenciou-se danos e perda de abundância e diversidade em macroartropodes e artropodes. Além de estudos que provaram a toxicidade crônica em anelídeos (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018).

## **2.2. PEIXES COMO BIOINDICADORES DA QUALIDADE DAS ÁGUAS**

O uso de parâmetros biológicos para mensurar a qualidade da água baseia-se nas respostas dos organismos em relação ao meio onde vivem, assim inúmeros bioindicadores são utilizados para realizar testes de monitoramento ambiental. Esta técnica é capaz de fornecer dados sobre os níveis de interferência dos contaminantes nos organismos biológicos, sendo eles, vegetal ou animal (BUSS, 2003).

Em ambiente aquático, as plantas aquáticas, algas, crustáceos, moluscos, peixes, mamíferos e aves, podem ser utilizados como bioindicadores (ALVES, 2017; LINS et al., 2010).

Um bioindicador ideal deve sobreviver em ambientes saudáveis, mas também apresentar resistência relativa ao contaminante que está exposto. De acordo com Alves (2017) metodologias empregadas em pesquisas de biomonitoramento ambiental além de evidenciarem mudanças ocorridas no estado original do ambiente também destacam os riscos aos quais os organismos estão expostos.

Nessa perspectiva, para analisar a presença de contaminantes nos corpos hídricos, os peixes são excelentes bioindicadores, ademais, de acordo com Alves (2017); e Lins e colaboradores (2010), eles vêm sendo amplamente utilizados, uma vez que nos fornecem parâmetros confiáveis da situação real do ambiente em que se encontram, estando presentes em praticamente todos os rios e lagos, além de serem de fácil coleta e manuseio.

Os peixes são organismos ameaçados por serem sensíveis às mudanças no seu habitat. Esse risco vem assinalado por alterações genéticas e fisiológicas provocadas por xenobióticos, isto é, compostos tóxicos aos organismos biológicos de origem natural ou antropogênica os quais causam danos em nível celular e molecular. Os peixes costumam responder aos compostos tóxicos em vias similares aos grandes vertebrados, sendo assim, podem ser utilizados em ensaios para testar substâncias químicas que possuem potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico para o

homem. A utilização dos peixes como um sistema bioindicador tem apresentado resultados satisfatórios na avaliação dos efeitos de químicos contaminantes no meio aquático, incluindo rios, lagos e barragens. Por serem sensíveis às mudanças no seu habitat, com isso, alterações no ambiente devido a contaminantes podem resultar em diversas mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar à formação de lesões que, muitas vezes, são irreversíveis (FONTAÍNHAS-FERNANDES, 2005).

Em peixes os xenobióticos podem manifestar seus efeitos através de alterações estruturais em órgãos e tecidos comprometendo a sua fisiologia, como também, podem provocar modificações que afetam o crescimento, reprodução, bioacumular e biomagnificar ocasionando um potencial desequilíbrio na população, comunidade ou ecossistema. Desse modo, o uso da biota aquática é uma importante ferramenta na avaliação da qualidade das águas superficiais (BUSS, 2003)

Considerando que a biota de água doce da América do Sul e Central é a maior entre as regiões neotropicais, representando um quarto de todas as espécies de peixes do mundo (DALA-CORTE; AZEVEDO, 2010; MONTOYA-BURGOS, 2003) torna-se passível usar diferentes espécies de peixes como sentinelas.

### **2.2.1. Lambaris (*Astyanax spp*) como bioindicadores**

A América do Sul apresenta uma ictiofauna rica, com estimativa de mais de 9.100 espécies válidas que ocorrem em ambientes marinhos e de água doce das áreas costeiras (cerca de 25% de todas as espécies de peixes do mundo). Somente para água doce, existem cerca de 5.100 espécies descritas; cerca de um terço de todas as espécies de peixes de água doce do mundo (DE BRITO et al., 2019; REIS et al., 2016), entre elas na ordem Characiformes inclui-se peixes que possuem uma grande variedade de formas e comportamentos, assim, esses estão adaptados a habitarem os mais variados ambientes.

Dentro desta ordem, a família Characidae é a maior e mais diversificada existente, tendo mais de 1.350 espécies descritas (CUNHA, 2014; DALA-CORTE; AZEVEDO, 2010). Os peixes conhecidos como caracídeos, principalmente do gênero *Astyanax*, identificados popularmente como lambaris (figura 1), compõem um grupo com aproximadamente 155 espécies (TEIXEIRA et al., 2018), ocorrendo desde do estado norte-americano do Texas até a Argentina. Este é um grupo pouco estudado

quanto a aspectos taxonômicos e filogenéticos, constituindo, supostamente, um gênero não monofilético (DALA-CORTE; AZEVEDO, 2010).

Os lambaris habitam rios, riachos, lagoas e represas mesmo onde há ocupação humana. São peixes onívoros e detritívoros, alimentando-se de frutos, sementes e insetos terrestres, vegetais aquáticos, escamas e outros peixes. Eles se alimentam de detritos que estão presentes na parte media e superior da coluna d'água e por isso é considerado um grupo de peixe com excelente potencial como organismo bioindicador de qualidade ambiental (MATSUMOTO; CÓLUS, 2000; PIANCINI, 2008)

O lambari não sobe os rios para desovar, a fecundação é externa e não há cuidado parental (CUNHA, 2014). O Lambari é um peixe de escamas, com coloração normalmente prateada, e nadadeiras variando entre amarela, vermelha e o preta. Seu corpo é alongado e em alguns casos comprimido. Seu tamanho varia entre 10 e 15 centímetros de comprimento para a maioria das espécies (CUNHA, 2014).

Lambaris são sensíveis a impactos ambientais resultantes de diversos fatores, seja a introdução de espécies exóticas, de detritos industriais ou residuais, agroquímicos, e outros agentes, que podem afetar diretamente a ecologia e a sobrevivência das espécies (PEREIRA, 2014).



**Figura 1** - Lambari (*Astyanax lacustris*). Fonte: autor

### **2.2.2. Zebrafish (*Danio rerio*) como organismo modelo**

O peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822) peixe-zebra ou zebrafish (figura 2), como é popularmente conhecido, surgiu como um dos mais importantes organismos modelo vertebrados em genética, biologia do desenvolvimento, neurofisiologia e biomedicina (LAWRENCE, 2007; RIBAS; PIFERRER, 2014)



Trata-se de um teleósteo de 3 a 4 cm, da família Cyprinidae, tropical de água doce, que domesticados vivem em média três anos e meio, com indivíduos mais velhos sobrevivendo até cinco anos e meio. São provenientes da Ásia, principalmente da região do Himalaia, onde pode ser encontrado em córregos e rios de águas calmas bem como nas plantações alagadas de arroz (RIBAS; PIFERRER, 2014).



**Figura 2-** *Zebrafish* (*Danio rerio*). Fonte: <http://www.fishbase.org/summary/Danio-rerio.html>

Sua importância se deve ao fato de ser um peixe de pequeno porte, fácil manutenção, custo baixo, com alta taxa reprodutiva, genoma sequenciado e ter 70% de homologia com mamíferos, dessa forma constituindo-se assim, em modelo importante para estudos comportamentais, genéticos e toxicológicos. Dada a importância considerável do peixe-zebra como modelo experimental, juntamente com os custos significativos quando comparada com outras espécies de peixe habitualmente cultivadas, (LAWRENCE, 2007) ele se torna um bom bioindicador.

O peixe-zebra é um animal bem estudado. Muito antes de sua emergência como um modelo de desenvolvimento, os peixe-zebra foram usadas para estudar uma variedade de aspectos da biologia dos peixes (LAALÉ, 1977; RIBAS; PIFERRER, 2014). Ao longo dos anos, os pesquisadores tem estudado a sua reprodução, toxicologia aquática, osmoregulação e ainda, publicou-se estudos sobre nutrição do zebrafish (LAWRENCE, 2007).

As vantagens deste modelo, combinadas com as ferramentas para sua manipulação e análise tornaram o *zebrafish* adequado para estudar diversificadas rotas na regulação gênica de eucariotos de maneira mais conveniente e barata que qualquer outro modelo de peixe cultivado (LAWRENCE, 2007; RIBAS; PIFERRER, 2014), sendo assim, um modelo excelente para identificar o potencial genotóxico de águas antropizadas.

### **2.3. BIOMONITORAMENTO DE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS**

Como normalmente a poluição aquática ocorre de forma crônica, com

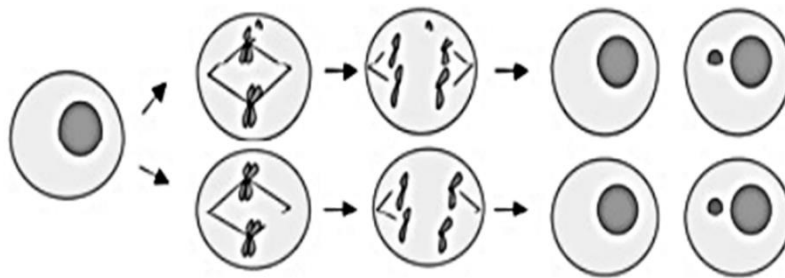
concentrações subletais de poluentes, identificam-se mais comumente alterações estruturais e funcionais nos peixes do que mortalidade em massa dos organismos. Essas alterações morfo-funcionais têm sido muito utilizadas como biomarcadores para indicar tanto a exposição quanto os efeitos de poluentes ambientais (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

Os testes de biomonitoramento podem ser definidos como procedimentos nos quais as respostas de organismos-teste são utilizadas para detectar ou avaliar os efeitos adversos ou não de uma ou mais substâncias sobre os sistemas biológicos. Estes testes são basicamente a exposição de organismos a diferentes condições, visando assim a detectar seus efeitos. (GALVAN, 2011 *apud* METCALF e EDDY, 2003).

### **2.3.1. Teste do Micronúcleo (MN) e Anormalidades Nucleares em Peixes (AN)**

Matter e Schmid (1971) e Schmid (1975) foram os criadores e primeiros pesquisadores a usar o teste do Micronúcleo (MN). Através deste teste verificou-se, em eritrócito jovens de roedores, a correlação entre aberrações cromossômicas e o aparecimento de anomalias nucleares (micronúcleos) submetidos a doses de tremeton. Com o avanço dos anos o teste foi utilizado e adaptado com sucesso por Heddle (1973), Heddle e colaboradores (1983, 1991) e Hooftman e de Raat, (1982), esses últimos empregando o sangue periférico de peixes.

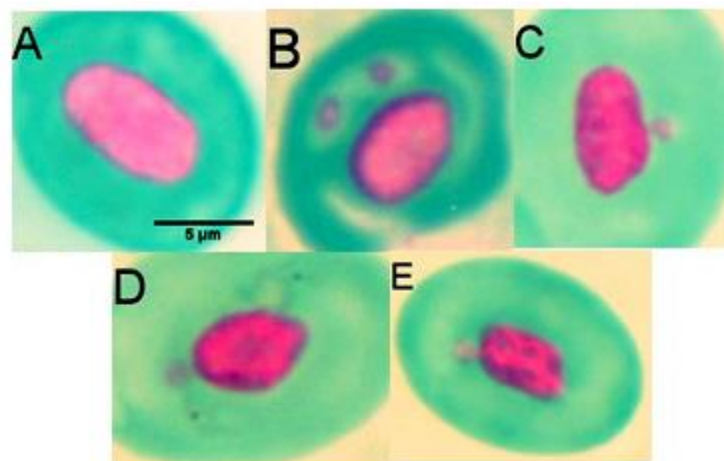
O teste do MN (figura 3) nas células sanguíneas de peixe caracteriza-se por ser uma análise de genotoxicidade capaz de avaliar efeitos tóxicos de substâncias no DNA, tanto para testes *in situ* ou *ex situ*, como acontece nos testes que buscam verificar a presença de contaminantes em águas superficiais. Comparado com outros testes citogenéticos o do MN apresenta algumas vantagens, incluindo baixo custo e rapidez de análise para triagem de grande número de substâncias (FENECH, 2000; FLORES; YAMAGUCHI, 2008).



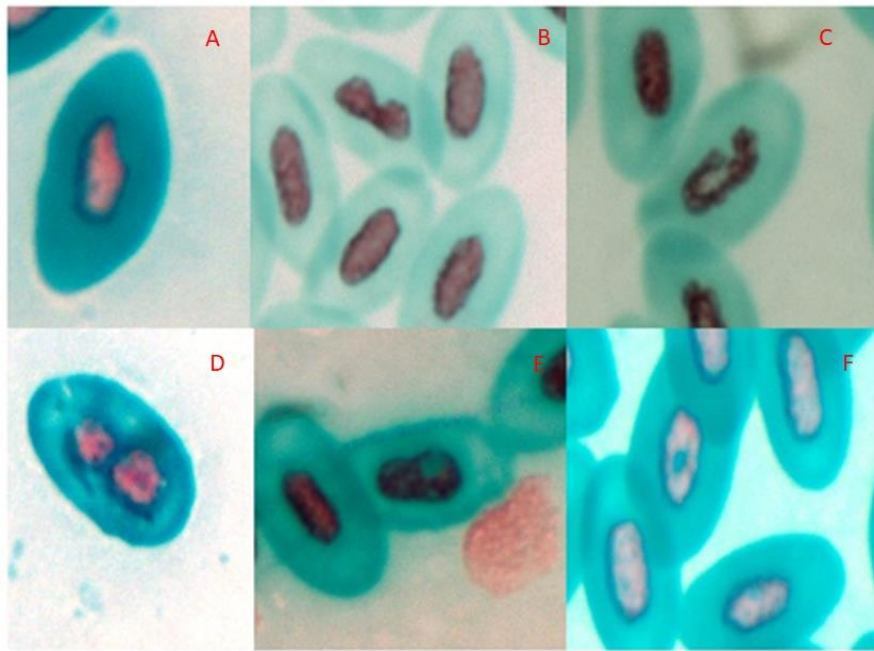
**Figura 3-** Esquema geral da formação de MN. Fonte: LEÓN et al., (2007) adaptado.

As elevadas taxas mitóticas apresentadas pelos tecidos dos peixes proporcionam uma rápida resposta à exposição genotóxica, essa rápida sinalização à contaminação do meio revela-se como lesões nucleares em sangue periférico, sendo o dano ao DNA um dos acontecimentos mais críticos (ARSLAN et al., 2015; DALZOCHIO et al., 2017; DAR et al., 2015)

Estudos têm demonstrado que os testes do MN e AN (figura 4 e 5) são dois métodos sensíveis, rápidos e amplamente utilizados na detecção de mutagenicidade e genotoxicidade de agentes contaminantes tanto para experimentos sob condições de campo e ou mesmo em testes laboratoriais (DALZOCHIO et al., 2017; MORAIS et al., 2016).



**Figura 4** - - Eritrócito normal em A e eritrócitos micronucleadas B, C, D, E. Fonte: Kasper, 2019



**Figura 5** – Anormalidades nucleares: A- blebbed; B – lobbed; C – notched; D – vacuolated; E - Binúcleo; F - cariorrêxis

O MN (figura 3) pode ter origem durante a meiose em gametas, como consequência de anormalidades cromossômicas. Além disso, deve ser considerado o efeito do quiasma durante o qual ocorre uma inversão paracêntrica que pode gerar um fragmento acêntrico que, por sua vez, poderá formar um micronúcleo (FURNUS et al., 2014; HEDDLE et al., 1991).

O teste do MN (figura 3) pode ser descrito como a observação de células que sofrem alterações na distribuição de suas cromátides (efeito sobre o fuso mitótico). Durante a anáfase, momento em que há a segregação dos cromossomos, os fragmentos provenientes das quebras e de cromossomos inteiros e que não estão ligados pelo fuso, não acompanham a migração para os pólos da célula. Após a telófase, tais fragmentos cromatídeos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células (FENECH, 2000; SILVA; NEPOMUCENO, 2010)

A ação de qualquer agente químico que induza anormalidades nucleares pode resultar, em teoria, em um aumento na incidência de micronúcleos. Entretanto nem sempre se observou uma correspondência entre a frequência de anormalidades nucleares e micronúcleos, de modo que muitos pesquisadores preocuparam-se estabelecer padronizações. A relação quantitativa entre a frequência de AN e fragmentos acêntricos não era bem conhecida, com exceção de que nem todos os

fragmentos acêntricos transformam-se em MN na primeira divisão celular, podendo sobreviver, replicar e se transformar em MN em divisões subseqüentes (HEDDLE et al., 1991).

Desde que se iniciou uma crescente preocupação quanto à presença de substâncias genotóxicas nos ambientes aquáticos, por ação antrópica, se destacou a importância de desenvolver ou padronizar métodos existentes para a detecção de lesões genéticas em nível cromossômico em organismos aquáticos ocasionadas por xenobióticos presentes nos corpos de água (ARSLAN et al., 2015).

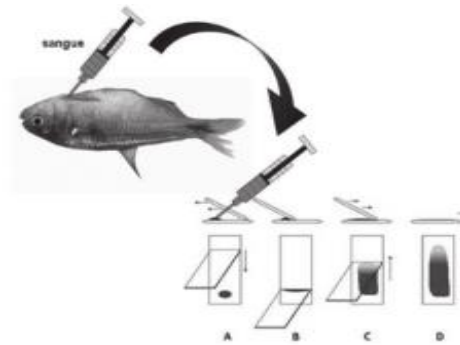
O teste de MN é reconhecido internacionalmente, sendo um dos métodos preferenciais para avaliar o dano genético em organismos, pois permite detectar danos provenientes tanto de agentes clastogênicos responsáveis por quebras cromossômicas, como de agentes aneugênicos que induzem aneuploidias ou segregação cromossômica anormal (ANSARI et al., 2011; DISNER; MIRANDA, 2011; KASPER, 2019)

Quando a análise de MN em eritrócito de peixes é realizada *in vitro* o objetivo principal é avaliar o potencial genotóxico de substâncias em diferentes concentrações, como observado nos trabalhos de Matozo et al. (2015), Silva (2014), Galvan (2011) e Radoll, (2013), que verificaram a genotoxicidade utilizando *Astyanax sp.* expostos a agroquímicos e a efluentes líquidos. Já a análise de peixes *in loco*, quando capturados nos rios ou lagos, visa identificar a presença ou não de agentes com capacidade de interferir na integridade fisiológica desses animais, como observado por Silva e Nepomuceno (2010), Cantanhêde et al. (2016) por exemplo.

Como é notável, o teste do MN em peixes vem sendo utilizado nos mais diversos estudos, desde os que envolvem o reconhecimento da toxicidade de substâncias até aqueles que realizam monitoramento de ambientes aquáticos. Esse procedimento ocorre em virtude de os peixes serem organismos bioacumuladores de muitos contaminantes que mesmo em baixas concentrações podem afetar sua fisiologia e capacidade de sobrevivência.

Os micronúcleos são encontrados nas mais diversas células, nos peixes normalmente é utilizado o sangue periférico retirado na veia caudal. Diferentemente dos mamíferos onde é coletado diferentemente o material da medula óssea principalmente. A coleta do sangue é realizada logo após o sacrifício do animal com

preparo de esfregaços (Figura 4), fixação do material e coloração para posterior análise em microscopia óptica (CORT; GHISI, 2014; SOUTO et al., 2008)



**Figura 6** - Esquema da coleta de sangue e as etapas da confecção dos esfregaços. Fonte: Cort e Ghisi (2014)

Normalmente o padrão encontrado na literatura é o de que a frequência de micronúcleos que é analisada através da observação de 1000 a 3000 eritrócitos por lâmina em microscopia. De acordo com Oliveira (2013), as identificações dos micronúcleos seguem os seguintes critérios: (1) o micronúcleo deve ser um terço menor que o núcleo principal; (2) o micronúcleo não deve tocar o núcleo principal; (3) deve ter o mesmo plano de foco do núcleo; (4) padrão de coloração idêntico ao núcleo.

Existe ainda concomitante ao teste do MN a observação de alterações do envelope nuclear, o que indica presença e influência de substâncias químicas sobre o organismo avaliado. São alterações provocadas por agentes que induzem os MNs, porém, os mecanismos moleculares que acarretam as alterações não foram desvendados ainda, mas acredita-se que estão relacionados a erros que ocorrem durante os processos mitóticos (FENECH, 2000; KASPER, 2019).

As alterações morfológicas nucleares (AMN) descritas com maior frequência em estudos foram observadas primeiramente por Carrasco et al. (1990) como: “blebbed” núcleo que apresenta uma pequena invaginação no envoltório nuclear; “lobbed” núcleo com uma invaginação maior do que o blebbed; “notched” núcleo com corte notável no conteúdo do material nuclear; “vacuolated” núcleos que apresentam uma região que lembra vacúolos em seu interior. Outras alterações já foram relatadas por muitos autores, como, “binúcleo” dois núcleos bem definidos; “kidney-shape” núcleo dobrado em formato de um rim (CARRASCO, et al. 1990; KASPER, 2019) “cariorréxis” o núcleo se evidencia na células e sofre necroses, sendo considerado como um dos estágios iniciais da apoptose (MEIRELES et al., 2006; RAMIREZ, 2000).

### 2.3.2. Análise histopatológica em Peixes

A avaliação histopatológica tem se tornado um método muito utilizado para analisar a qualidade da água. Como sabido, biomarcadores são alterações biológicas que podem estar relacionadas à exposição ou aos efeitos tóxicos de compostos químicos do ambiente (AL-SABTI; METCALFE, 1995; PEAKALL, 1994).

A técnica permite análise específica dos órgãos em nível tecidual e celular, assim que eles são afetados, sob condições *in situ*, além disso, em avaliação de campo, a histopatologia é um método eficaz para detectar os diversos efeitos da exposição aguda ou crônica nos vários tecidos e órgãos (SILVA, 2004).

Em peixes, a histologia é direcionada para órgãos chave, que estão em contato com xenobióticos presentes na água, as brânquias, por exemplo. Muitos xenobióticos presentes nos ecossistemas aquáticos acabam absorvidos pelos peixes através da água, pelas brânquias e pele (SILVA, 2004).

As brânquias de peixes passaram a ser utilizadas como modelo para estudos de impacto ambiental por serem uma das primeiras estruturas a ter contato com o meio externo (BRITO, 2009; GARCIA-SANTOS et al., 2007).

As brânquias possuem fácil adaptação as condições ambientais. Essas estruturas são as responsáveis pelas trocas gasosas, interferem na osmorregulação e no equilíbrio ácido-básico e fazem parte da excreção dos compostos nitrogenados. Sendo assim, são adequadas para estudos de bioindicação de toxicologia aquática (BRITO, 2009; GARCIA-SANTOS et al., 2007; SANTOS, 2010)

Para Silva, (2004), as brânquias constituem uma porta de entrada dos xenobióticos que estão presentes na água. Conforme apurado por Kasper (2019) Alguns estudos com o uso da histologia das brânquias, com o objetivo de monitorar a poluição dos ambientes aquáticos ou a toxicidade de substâncias químicas, vêm expandindo-se no território brasileiro como evidenciado na tabela 2.

**Tabela 2** - Estudos realizados no território brasileiro utilizando a histologia como ferramenta de avaliação da contaminação e contaminantes ambientais.

AUTORES	ÓRGÃO/ESPÉCIE	OBJETIVO	RESULTADOS
Meletti et al. (2003)	Fígado e brânquia de <i>Serrapinnus notomelas</i> e <i>Danio rerio</i>	Avaliou a toxicidade do sedimento dos rios da Bacia do Mogi-Iguaçu.	Danos histopatológicos significativos

Silva (2004)	Fígado e brânquia de <i>Astyanax</i> sp.	Avaliou a toxicidade da água de um Ribeirão Urbano.	Danos histopatológicos significativos
Simonato et al. (2006)	Fígado e brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i>	Avaliou a exposição aguda e subcrônica à fração solúvel de óleo diesel.	Danos histopatológicos significativos
Garcia-Santos et al. (2006)	Brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i>	Avaliou a exposição a frações de Cádmio.	Danos histopatológicos significativos
Avilez (2008)	Fígado e brânquias de <i>Bricon amazonicus</i>	Avaliou os efeitos de concentrações de fenol.	Danos histopatológicos significativos
Condessa (2009)	Fígado e brânquias de <i>Astyanax bimaculatos</i>	Analizou a bioacumulação e os efeitos da exposição subcrônica a diferentes concentrações de Zn.	Danos histopatológicos significativos
Faria (2009)	Fígado e brânquias de <i>Poecilia vivipara</i>	Verificou a toxicidade de concentrações do herbicida Roundup®.	Danos histopatológicos significativos
Brito (2010)	Fígado e brânquias de <i>Pimelodus maculatus</i> e <i>Oligosarcus hepsetus</i>	Avaliou a qualidade da água de três reservatório no Rio Paraíba do Sul.	Danos histopatológicos significativos
Rezende (2011)	Fígado e brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i>	Avaliou a qualidade da água de uma represa através das alterações histológicas.	Danos histopatológicos significativos
Shiogiri (2011)	Fígado e brânquias de <i>Piractus mesopotamicus</i>	Avaliou a toxicidade de concentrações do herbicida glifosato na formulação	Danos histopatológicos significativos

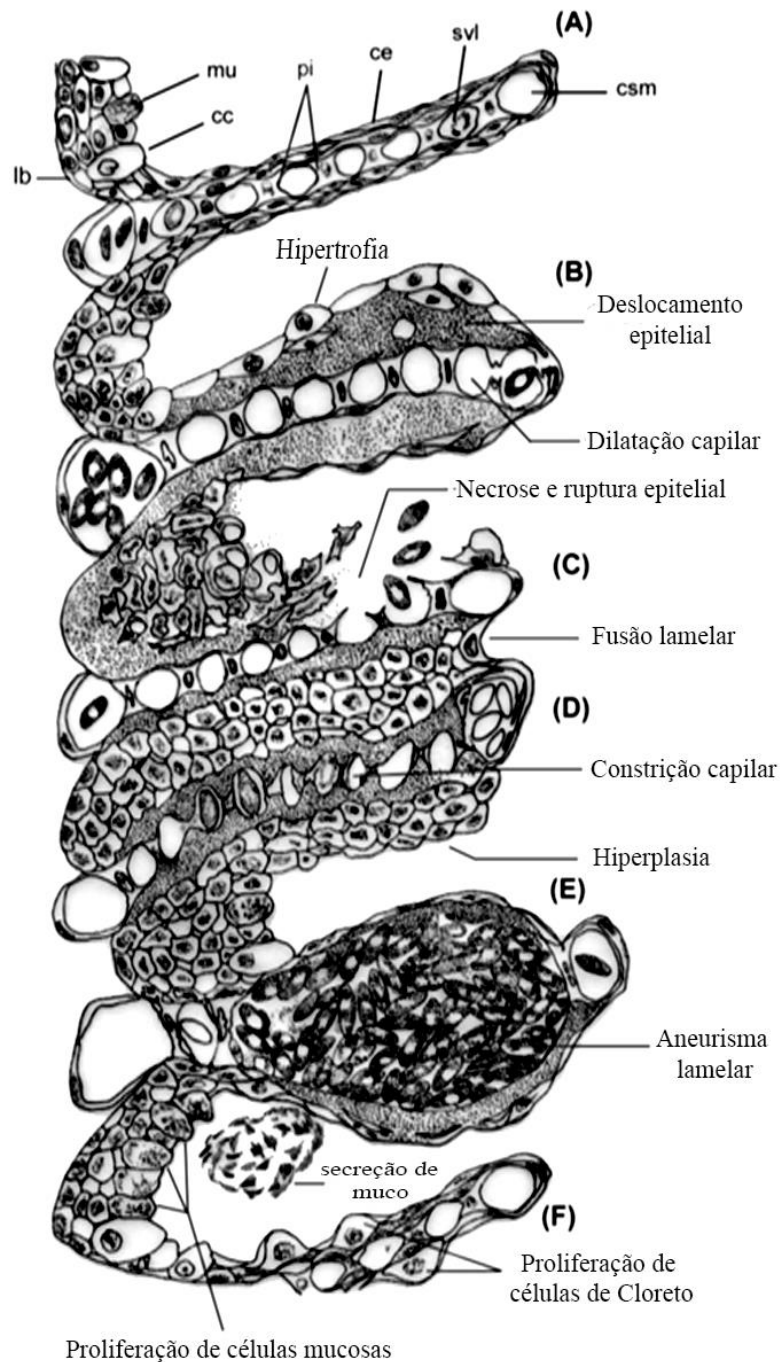


		Roundup® Ready.	
Figueredo (2013)	Fígado e brânquias de <i>Rhamdia quelen</i>	Verificou as alterações histológicas em peixes do Rio da Madre, SC, situado em uma região predominada pela rizicultura.	Danos histopatológicos significativos
Moraes (2013)	Brânquias de <i>Bricon amazonicus</i>	Avaliou os efeitos de concentrações de cipermetrina.	Danos histopatológicos significativos
Filho et al., 2014	Fígado e brânquias de <i>Pygocentrus nattereri</i> e <i>Serrasalmus marginatus</i>	Avaliou a qualidade da água do Rio Paraguai.	Danos histopatológicos significativos
Virgens et al., 2015	brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i>	Avaliou os efeitos após a exposição Acefato, Difenconazol e Sulfluramida	Danos histopatológicos significativos
Pinto, 2016	Fígado e brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i>	Avaliou a toxicidade do cobre e a qualidade da água do reservatório Guarapiranga, SP.	Danos histopatológicos significativos
Neves, 2017	Brânquias e fígado de <i>Ancistrus mullerae</i>	Avaliou a qualidade ambiental de sete rios da bacia do baixo Iguaçu – PR.	Danos histopatológicos significativos

**Fonte:** (Kasper, 2019) adaptado.

Em relação a morfofisiologia das brânquias, a disposição e o tamanho variam conforme a espécie, localizam-se na cavidade opercular e são divididas em arcos de onde surgem os filamentos branquiais com suas fileiras de lamelas secundárias. Essas lamelas (figura 7) são muito vascularizadas e são as principais estruturas responsáveis pelas trocas gasosas, já sua estrutura histológica apresenta-se revestida por epitélio pavimentoso simples e amparada por células pilares, sendo

essas formadoras de lacunas contendo os capilares sanguíneos, nos quais ocorrem as trocas gasosas e também, estão presentes na estrutura as células de cloreto, células mucosas, melanócitos, macrófagos e os linfócitos (MORAES, 2013).



**Figura 7** – Esquema representativo das células branquiais e as possíveis alterações mais encontradas em estudos histopatológicos. Brânquia normal (A), lâmina basal (lb), célula mucosa (mu), célula cloreto (cc), célula pilar (pi), célula epitelial (ce), seio venoso lamelar (svl), canal sanguíneo marginal (csm); B, C, D e F, alterações mais encontradas. **Fonte:** MORAES, 2013.

Muitos contaminantes orgânicos e inorgânicos podem alterar a permeabilidade do epitélio branquial à água e aos íons. Essa alteração ocorre por meio da ação direta do contaminante sobre os mecanismos de transporte e/ou da ação indireta, através da indução de respostas de estresse que envolvem a liberação de catecolaminas e cortisol na corrente sanguínea, desencadeando uma série de reações que afetam a funcionalidade das brânquias.

Um exemplo comum de dano lamelar ocorre quando a catecolamina liberada provoca um aumento da perfusão lamelar e da permeabilidade de íons, já o cortisol, induz a proliferação de Células de Cloreto (CC) com o objetivo de reestabelecer o balanço iônico e em consequência ocorre um aumento da espessura da membrana lamelar prejudicando as trocas gasosas entre a água e o sangue (MORAES, 2013).

A histologia pode ser considerada uma ferramenta sensível capaz de revelar os efeitos subletais de substâncias presentes no meio ambiente com potencial de interferir na biota aquática (KASPER, 2019; MORAES, 2013)

### **2.3.3. Avaliação do estresse oxidativo em Peixes**

Os mais diversos contaminantes quando assimilados pelos tecidos dos peixes podem resultar na formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) causando estresse oxidativo (MODESTO; MARTINEZ, 2010). EROs, tais como o radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila podem reagir com macromoléculas biológicas causando danos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (MENEZES et al., 2013).

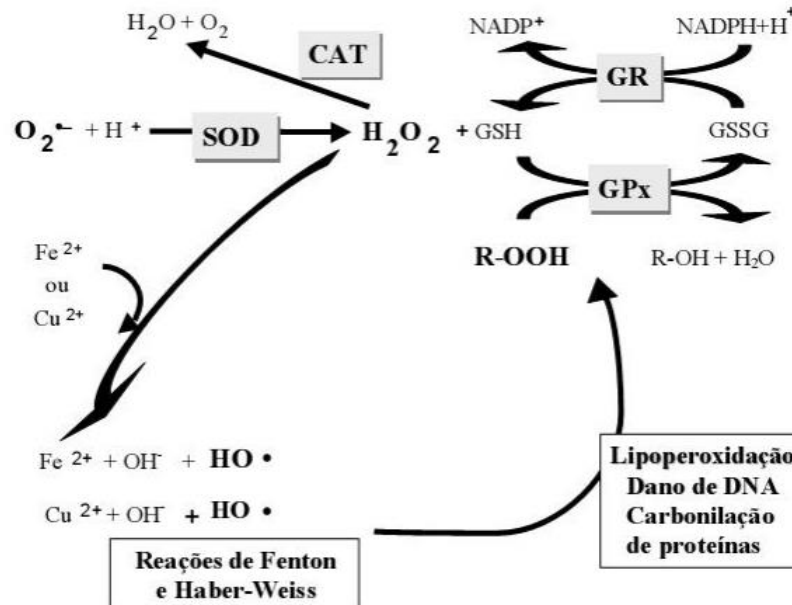
Os compostos reativos de oxigênio e de nitrogênio são produzidos pelas células como parte de seus processos metabólicos. O desequilíbrio entre a formação e a remoção destes compostos metabólicos decorrente da diminuição dos antioxidantes ou ainda do aumento da geração de compostos oxidantes, gera um estado de alta oxidação. Este estado favorece a ocorrência de ataques desses agentes reativos oxidantes à componentes celulares, sendo comum aos lipídeos (ALMROTH et al., 2005; BARBOSA et al., 2010; GARCIA et al., 2015; GROTTTO et al., 2008; MENEZES et al., 2012)

Os elementos responsáveis por esse desequilíbrio são os radicais livres, podendo ser definidos como átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons

em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes ao metabolismo, entretanto algumas substâncias como o peróxido de hidrogênio, o ozônio, o oxigênio singlete e peroxinitrito, também são EROs mas não são moléculas radicalares. As fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (ALVES et al., 2010; CARVALHO-NETA; ABREU-SILVA, 2010)

Para impedir os efeitos das EROs as células possuem mecanismos antioxidantes. As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) são importantes para os mecanismos de proteção celular contra as EROs, assim como a glutathione S-transferase (GST). A SOD é responsável por catalisar a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é degradado em água e oxigênio molecular via CAT e GPx. A GST age em processos de biotransformação e destoxificação de xenobióticos, transformando compostos tóxicos em formas mais fáceis de serem eliminadas.

Algumas enzimas têm sido usadas como indicadores de dano oxidativo em peixes expostos a diferentes contaminantes (MENEZES et al., 2013, 2012; MODESTO; MARTINEZ, 2010). Além do sistema antioxidante enzimático, para combater os efeitos das EROs, os organismos vivos produzem substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos, exercendo seu papel como antioxidante não-enzimáticos (ALVES et al., 2010). Um dos principais antioxidantes sintetizado nas células de vertebrados é a glutathione (GSH), que além de atuar como um potente antioxidante, reagindo com diversas espécies radicalares e não-radicalares, também serve como um co-fator para enzimas antioxidantes, como a GST e GPx (HERMES-LIMA, 2004). Da mesma forma, o sistema de defesa antioxidante não-enzimático atua impedindo reações de auto-oxidação (MENEZES et al., 2014; MODESTO; MARTINEZ, 2010; MONTEIRO et al., 2009; OROPESA et al., 2009)



**Figura 8** - Vias de formação de espécies pró-oxidantes e vias de destoxificação pelo sistema antioxidante. **Fonte:** COLPO, 2007

Em uma situação de estresse oxidativo pode ocorrer a peroxidação lipídica (LPO) e a carbonilação de proteínas. A LPO é o resultado da atuação dos radicais livres sobre membranas biológicas ricas em ácidos graxos poli-insaturados (ALMROTH et al., 2005; MENEZES et al., 2012). Um dos mais conhecidos produtos da LPO é o malondialdeído (MDA), o qual é produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poli-insaturados (MENEZES et al., 2014).

As EROs podem também causar danos às proteínas ocasionando modificações nos resíduos de aminoácidos e conseqüentemente alterando suas estruturas e levando a prejuízos nas suas funções. Além disso, grupos carbonila podem ser introduzidos e um aumento do número pode ser responsável pelos danos nas proteínas causado pelo estresse oxidativo (ALMROTH et al., 2005).

A peroxidação lipídica da membrana plasmática, como exemplo pode provocar alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma, estar envolvida em diversas patologias como mutações genéticas, alterações degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico e dano tecidual (ALVES et al., 2010; GROTTTO et al., 2008; JÚNIOR et al., 2001). A peroxidação é uma reação em cadeia, que tem início, propagação e término, gerando os produtos finais, os aldeídos (MDA) que podem causar danos nas proteínas.

Outro dano causado é a inserção de grupos carbonílicos (CO) nas cadeias de proteínas. Os produtos formados são quimicamente estáveis, podendo ser facilmente estocados e dosados. O  $H_2O_2$  tem a capacidade de provocar a oxidação de alguns resíduos específicos de aminoácidos levando frequentemente à formação dos grupamentos carbonilas nas suas cadeias laterais, como também à quebra da cadeia polipeptídica (DALLE-DONNE et al., 2003).

O termo oxidação de uma substância sempre foi considerado como a incorporação de oxigênio em sua estrutura. Ainda assim, pode ser mais precisamente definido como a perda de um ou mais elétrons para outra substância (ALVES et al., 2010).

A carbonilação de proteínas incide em danos diretamente no metabolismo celular ao alterar a função das proteínas. A dosagem de proteína carbonilada é o marcador mais utilizado para determinação dos níveis de oxidação protéica. Além disso, o acúmulo de proteínas carboniladas tem sido observado em várias doenças, incluindo mal de Alzheimer, diabetes, doença inflamatória intestinal, hepatite C crônica, artrite reumatóide e outras (DALLE-DONNE et al., 2003; SOUZA et al., 2009).

Grotto et al., (2008) explica que biomarcadores vêm sendo utilizados para avaliar o estresse oxidativo, dentre eles malondialdeído (MDA), dienos conjugados, gases etano e pentano, isoprostanos, 4-hidroxi-nonenal (4-HNE), modificações de proteínas e modificações no DNA. Segundo os mesmos autores MDA é um dos biomarcadores mais utilizados por ser um dos produtos secundários da peroxidação lipídica mais conhecidos.

Diante do exposto é possível verificar a utilização de espécies reativas ao oxigênio como excelentes biomarcadores para monitoramentos de ambientes contaminados ou teste de toxicidades de substâncias com potencial para contaminar a natureza.

### 3. DESENVOLVIMENTO

Essa dissertação está constituída de três capítulos independentes, elaborados com base nas avaliações as quais os peixes do gênero *Astyanax* e os peixes *Danio rerio* foram submetidos.

No primeiro capítulo encontramos os resultados dos testes de micronúcleo e análise histopatológica das brânquias em peixes do gênero *Astyanax in-situ*, submetidos à águas superficiais antropizadas.

O segundo capítulo corresponde às análises dos marcadores de estresse oxidativo, no fígado de peixes do gênero *Astyanax*.

E por fim, no último capítulo, se trata da análise de micronúcleos e anormalidades nucleares resultantes da submissão de peixes zebras (*D. rerio*) *ex-situ* às águas antropizadas do Rio Ijuí. Este último capítulo segue as normas da submissão de artigos para o Periódico Ambiente & Água já vertido para o inglês, seguindo as normas da revista.

### **3.1. CAPÍTULO 1 - GENOTOXICIDADE E HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS EM *Astyanax* spp. SUBMETIDOS A ÁGUAS SUPERFÍCIAS ANTROPIZADAS**

#### **3.1.1. INTRODUÇÃO**

Os indivíduos presentes nos ecossistemas aquáticos estão expostos a substâncias potencialmente poluidoras, as quais, originam-se quase que na totalidade das ações humanas. Os principais focos de antropização são os efluentes doméstico, industrial e os agroquímicos e que são caracterizados por apresentarem uma complexa composição, abrangendo químicos orgânicos, inorgânicos, microrganismos patogênicos, bem como, substâncias cujos efeitos sobre o meio ambiente ainda são desconhecidos. O quadro pode ainda ser agravado com a falta de conservação das matas ciliares de rios, lagos e nascentes (BUSS, 2003).

Dessa forma, estudos vem sendo realizados para avaliar os níveis de poluição dos ambientes aquáticos e um deles, é o uso de parâmetros biológicos, que baseiam-se na avaliação das respostas biológicas dos organismos em relação ao meio onde vivem (BUSS, 2003; LINS et al., 2010). Os bioindicadores podem ser considerados com espécies capazes de sobreviver em ambientes saudáveis, mas também apresentar resistência relativa ao contaminante que estão expostos.

Outro aspecto que pode facilitar o desenvolvimento do estudo é a abundância dessa espécie no ambiente e a facilidade em adaptar-se aos ensaios laboratoriais, visto que, em laboratório são realizados estudos para avaliar o potencial tóxico de substâncias (LINS et al., 2010) . Por definição, os biomarcadores são alterações biológicas que podem estar relacionadas à exposição ou aos efeitos tóxicos de compostos químicos do ambiente (PEAKALL, 1994).

Os peixes, especialmente o gênero *Astyanax* são excelentes bioindicadores de ambientes aquáticos, sendo considerados sentinelas ambientais, por estar presente em praticamente todos os rios e lagos, serem de fácil coleta e manuseio (MOREIRA et al., 2010). Em peixes, os xenobióticos podem provocar danos em nível celular, comprometendo o funcionamento de órgãos vitais, podendo ainda, bioacumular e biomagnificar, como também, causar danos em nível molecular, que são provocados principalmente na molécula de DNA, onde, muitos xenobióticos têm a capacidade de interagir promovendo danos clastogênicos, responsáveis por quebras



cromossômicas, assim como, agentes aneugênicos que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (ANSARI et al., 2011; SIMONATO, 2006)

Os contaminantes que causam danos no DNA são conhecidos como genotóxicos e há testes eficientes para avaliar a presença em ambientes aquáticos. O teste do micronúcleo (MN) foi desenvolvido originalmente por Schmid (1975), com eritrócito jovens de roedores; posteriormente, o teste foi adaptado com sucesso por Hooftman e Raat (1982) empregando em sangue periférico de peixes. Basicamente um micronúcleo é a segregação cromossômica anormal, a quebra e separação de material genético do núcleo. Em relação à avaliação de AN, estas são conceituadas como alterações na morfologia do envelope nuclear, o que também fornece indícios da presença de substâncias químicas nos corpos hídricos que interagem com o organismo avaliado.

Em relação aos tecidos a avaliação histopatológica tem sido um valioso instrumento biomarcador para avaliar a presença de xenobióticos em um corpo hídrico. Essa técnica permite uma análise específica dos órgãos a nível tecidual e celular, visto que eles são afetados por estressores ambientais sob condições *in situ*, além disso, a histopatologia é um método eficaz para detectar os diversos efeitos da exposição aguda ou crônica nos vários tecidos e órgãos (BERNET et al., 2001).

O objetivo desse capítulo foi promover a análise de genotoxicidade e histopatologia de brânquias em *Astyanax* spp. submetidos a águas superficiais antropizadas.

### **3.1.2. MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), sob o protocolo nº 589216051.

#### **3.1.2.1. ÁREA DE ESTUDO E PROTOCOLO DE COLETA**

##### **3.1.2.1.1. Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí**

Conforme descrito por Kasper (2019), a Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí está localizado na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. O rio Ijuí é afluente do rio Uruguai em sua porção média (Figura 1). Surge através da união dos rios Palmeira, Caxambu e Fiúza, no município de Panambi – RS. Nessa bacia hidrográfica estão inseridos 36 municípios, abrangendo municípios como Cruz Alta, Ijuí, Santo

Ângelo e Tupanciretã, com a presença de indústrias, e principalmente de extensas áreas agrícolas com intensa produtividade de grãos. Os principais usos da água se destinam a irrigação e ao abastecimento público. A bacia é constituída por mais 12 principais rios que cortam cidades e áreas agrícolas, sendo os principais os rios Caxambu, Potiribu, Conceição, Ijuizinho todos tendo como foz o Rio Ijuí, e esse desaguar no Rio Uruguai.

### **3.1.2.1.2. Caracterização dos pontos e análise dos parâmetros físico-químicos**

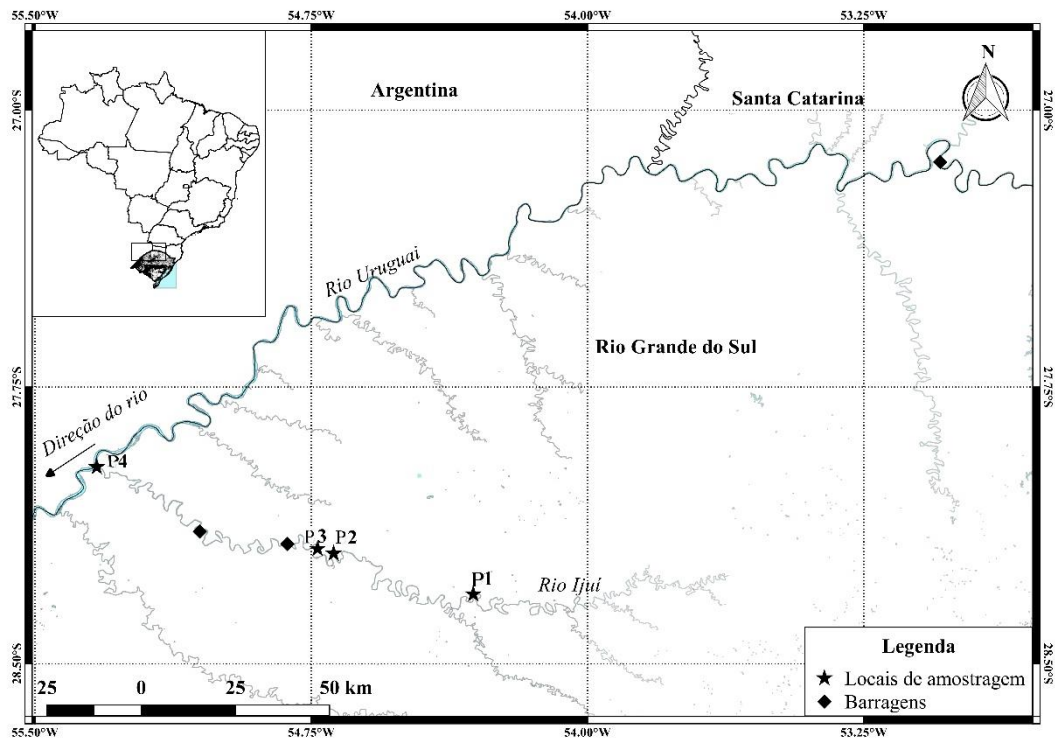
Os quatro pontos de coleta dos peixes estabelecidos para este estudo foram estrategicamente selecionados, visando os mais diversos ambientes e seus potenciais causadores de impacto. Abaixo, apresentamos uma descrição de cada ponto avaliado:

P1 – Localizado sob as coordenadas 28°18'50.74"S e 54°18'38.39"W, este ponto fica situado logo após o perímetro urbano de Santo Ângelo-RS. As principais características do ponto são a inexistência de mata ciliar e por receber descarga de efluente industrial e urbano através dos afluentes que cortam a cidade (Apêndice, figura 1).

P2 – Localizado sob as coordenadas 28°11'53.20"S e 54°41'25.47"W, próximo a cidade de Cerro Largo-RS. O ponto caracteriza-se pela inexistência de mata ciliar e por estar próximo a áreas de criação de suínos e bovinos de corte e leite, além de anteriormente ter percorrido por extensas áreas agrícolas. Esse ponto ainda antecede um barramento devido a presença de uma hidrelétrica (Apêndice, figura 2).

P3 – Localizado sob as coordenadas 28°11'19.26" S e 54°43'58.56" W, no interior da cidade de Cerro Largo - RS. O ponto caracteriza-se pela inexistência de mata ciliar, possuindo área de criação de bovinos de leite, além de ser percorrido por extensas áreas agrícolas. Esse ponto localiza-se no barramento da Usina Hidrelétrica São José - Ijuí Energia S.A, por isso caracteriza-se por ser o único ponto do estudo em ambiente lântico (Apêndice, figura 3).

P4 – Localizado sob as coordenadas 28°03'29,0"S e 55°07',39,0"W, é o ponto próximo do Rio Uruguai, localizado no município de Roque Gonzales/RS. Caracterizando-se pela inexistência de mata ciliar e extensas áreas agrícolas (Apêndice, figura 4).



**Figura 1** - Mapa do Rio Ijuí com marcação dos pontos e barramentos. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2020

O ambiente no local dos pontos foi caracterizado levando em consideração os focos de antropização: ausência de mata ciliar, atividades agrícolas e presença de áreas urbanas.

Os parâmetros físico-químicos da água, como temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (OD) e condutividade (COD) foram avaliados em todos os momentos da coleta através Medidor Multiparâmetros Asko SX836.

### 3.1.2.2. ANÁLISE DE GENOTÓXICAS E HISTOPATOLOGIA.

#### 3.1.2.2.1. Teste *in loco*- *Astyanax spp.*

Indivíduos foram capturados em ambiente não antropizado do Rio Ijuí, e submetidos a um período semanal de aclimação em aquários no laboratório de genética da UFFS, com água fornecida ao abastecimento público pela CORSAN (Companhia Riograndense de Saneamento), sob fotoperíodo natural e alimentação disponível duas vezes ao dia e oxigenação pH e temperatura monitoradas.

Após o período de aclimação os lambaris foram transferidos aos quatro pontos previamente determinados alocando dez indivíduos por ponto em uma gaiola preparada para o experimento. Os animais permaneceram no local por 96 horas a fim

de serem submetidos aos testes. Foram realizados três esforços amostrais, nos meses de abril, junho e setembro de 2019, totalizando trinta peixes por ponto escolhido. Também estabeleceu-se um grupo controle (com dez indivíduos) que permaneceu no laboratório, pelo mesmo número de horas do grupo teste, em água limpa, pH e temperatura monitorados e foram eutanasiados sob as mesmas condições dos grupos testes.

Ao fim das 96 horas de exposição, os indivíduos que estavam nas gaiolas foram retirados, anestesiados em solução de Eugenol 3% e imediatamente sacrificados por decapitação. Em seguida uma incisão foi efetuada na artéria caudal para extração de sangue, para confecção de esfregaços sanguíneos através de capilar de vidro contendo EDTA 3%, para evitar a coagulação.

Foram confeccionadas três lâminas de esfregaço sanguíneo por peixe. Após a confecção dos esfregaços, as lâminas foram secas em temperatura ambiente, fixadas em metanol por 15 minutos e armazenadas em porta lâminas para transporte até o Laboratório de Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Cerro Largo, RS. No laboratório, as lâminas foram submetidas a hidrólise em HCl 5N por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas em água destilada seguida da coloração do núcleo em reativo de Schiff por duas horas em ambiente escuro e em seguida lavadas em água destilada e imergidas em Fast-Green por um minuto para contracoloração.

Em microscopia óptica, foram observadas 1000 células por lâmina, ou seja, 3000 células por peixe, contabilizando as células micronucleadas (MN) e as anomalias nucleares (AN) dos tipos:

- “blebbed”, núcleo que apresenta pequena invaginação no envoltório nuclear;
- “lobbed”, núcleo com invaginação maior do que o blebbed;
- “notched”, núcleo com corte notável no conteúdo do material nuclear
- “vacuolated”, núcleos que apresentam uma região que lembra vacúolos em seu interior;
- “binúcleo”, dois núcleos bem definidos;
- “cariorréxis” núcleo se evidencia tanto nas células que sofrem necroses, sendo considerado como um dos estágios iniciais do apoptose.

Os dados extraídos das contagens total de MN e AN por indivíduos foram posteriormente submetidos a análise estatística.

Para a análise histológica, as brânquias dos lambaris foram extraídos e acondicionados em cacete histológico, emergidos em fixador Alfac (formol 10% + álcool 80% + ácido acético) para fixação por uma semana. Após o período de uma semana no Laboratório de Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Cerro Largo, RS, as brânquias foram descalcificadas em solução de ácido etilodiaminotetracético (EDTA 10%) por também período de uma semana. Posteriormente, as amostras passaram pelas seguintes etapas: desidratação alcoólica em álcool crescente de 70% a 100%, emergido em Xilol, impregnação em parafina. Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo na espessura de 5µm, alocados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram observadas em microscópio óptico trinocular Olympus® CX31.

As alterações histológicas em tecido branquial foram observadas seguindo a classificação proposta por Poleksic e Mitrovic-tutundzic (1994) de acordo com o estágio de severidade, onde, o estágio I corresponde às alterações consideradas leves, aquelas que alteram a função do tecido; o estágio II condiz às alterações moderadas, isto é, aquelas que alteram parcialmente a função do tecido, já o estágio III representa as alterações severas, aquelas que alteram totalmente a função do tecido (Tabela 1).

**Tabela 1** - Classificação das alterações histopatológicas das brânquias quanto e a severidade das lesões de acordo com Poleksic e Mitrovic-tutundzic (1994) adaptado pelo autor.

<b>Estágio</b>	<b>Alterações histológicas</b>
<b>I</b>	Hipertrofia do epitélio lamelar Elevação do epitélio lamelar Hiperplasia do epitélio lamelar Desarranjo lamelar Dilatação do seio sanguíneo Constricção do seio sanguíneo Congestão vascular
<b>II</b>	Fusão incompleta das lamelas Fusão completa de algumas lamelas Fusão completa de várias lamelas Ruptura do epitélio Aneurisma lamelar

<b>III</b>	Destruição do epitélio lamelar Congestão vascular Necrose
------------	---

Fundamentando-se nesta de classificação, os autores citados desenvolveram a seguinte equação para calcular o Índice de Alterações Histopatológicas (**IAH**):  $IAH = 10^0 \cdot \sum SI + 10^1 \cdot \sum SII + 10^2 \cdot \sum SIII$  onde,  $\sum SI$ ,  $\sum SII$  e  $\sum SIII$  = somatório do número de alterações de estádios I, II e III;  $10^0$  = múltiplo da fase I;  $10^1$  = múltiplo da fase II;  $10^2$  = múltiplo da fase III. Os valores do IAH entre 0 e 10, indicam funcionamento normal do tecido, entre 11 e 20, indicam danos leves a moderados ao órgão, entre 21 e 50 indicam danos de moderados e severos e maiores que 100, indicam danos irreversíveis no tecido. Assim foi classificado o grau das lesões apresentadas pelos peixes nas brânquias (NOGUEIRA et al. 2009; POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

### 3.1.2.3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Para a análise estatística das contagens total de MN e AN entre os pontos e os esforços amostrais foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, posterior a Análise de Variância (ANOVA). Não encontrando valores normais optou-se pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e quando significativo os valores foram submetidos ao teste SNK (Student-Newman-Keuls) de comparação múltipla.

Os resultados da análise histopatológica das brânquias obtidos para os animais de cada local estudado, em cada esforço amostral foram convertidos em IAH, foram comparados entre os pontos, através do teste t de comparação das médias de amostras independentes.

Para todos os testes, foi considerado significativo  $p \leq 0,05$ . E foi utilizado o programa BioEstat. 5.3.

## 3.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1.3.1. CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE

Os pontos selecionados para esse estudo apresentam sinais de antropização, caracterizado pelo lançamento de efluente doméstico, industrial e agrícolas que são característicos dessa região.

As análises dos parâmetros físico-químicos da água tanto dos pontos quanto do controle estão expressas na Tabela 2 e não mostraram diferenças em relação ao

controle. Com base na resolução 357/2005 do CONAMA as águas do rio Ijuí enquadram-se em classe II para água doce, que significa que são águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA n° 274, de 2000, à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e a aquicultura e à atividade de pesca.

**Tabela 2** - Parâmetros físico-químicos da água do rio depois do teste de 96 horas com *Astyanax*

CARACTERÍSTICA	CONTROLE	PONTO 1			PONTO 2		
Coleta	*	1	2	3	1	2	3
pH	7.87	7.2	7.8	7.4	7.6	8	7.7
COND. (µs)	271	57	67.8	95.9	60.1	62.3	97
ODi (mg/L)	6.2	6.3	10.5	5.9	5.9	8.4	9.8
Temp. H <sub>2</sub> O (°C)	24.9	21.6	16.4	17.2	21.6	14.9	16.4
Temp. Ambiente (°C)	21	22	19	19	22	16	18
Chuvas (mm)**	*	0	0	21-50	0	0-20	0-20
Disco de Secchi (cm)	*	28	118	16	36	62	54

CARACTERÍSTICA		PONTO 3			PONTO 4		
Coleta		1	2	3	1	2	3
pH		7.5	8.8	7.9	7.2	7.7	7.1
COND. (µs)		57.4	61.4	69.3	63.3	61.9	60.3
ODi (mg/L)		5.9	8.7	11.2	6.6	7.6	8.1
Temp. H <sub>2</sub> O (°C)		19.2	15	16.6	19.3	15.7	19
Temp. Ambiente (°C)		22	16	18	22	16	22
Chuvas (mm)**		0-20	0	0-20	0	0-20	0
Disco de Secchi (cm)		34	56	74	23	83	32

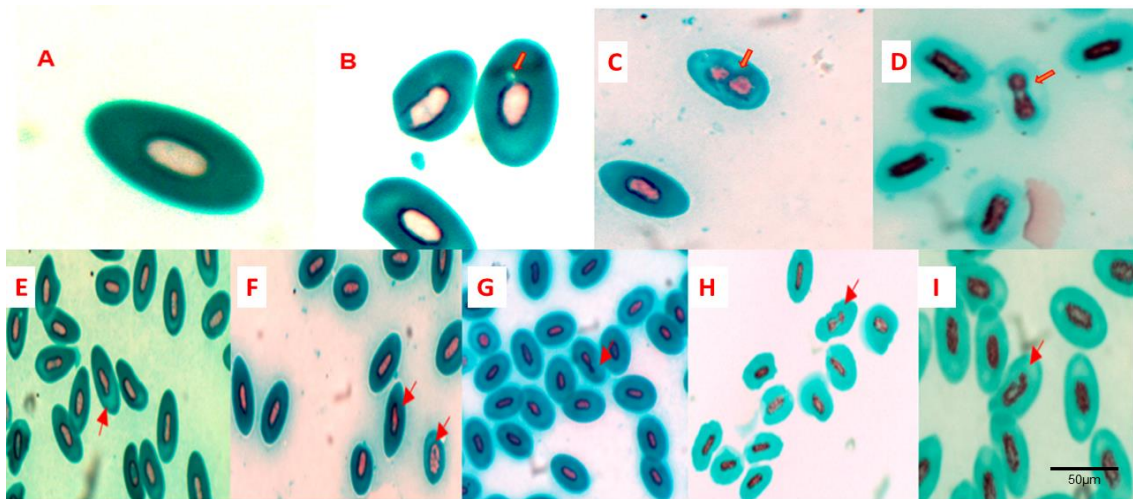
\*ODi=oxigênio dissolvido; COND=condutividade.

\*\*Chuvas foram consideradas os seguintes padrões para às 48 horas anteriores a retiradas dos peixes: 0-20 mm; 21-50 mm; 51-100 mm. +100 mm.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

### 3.1.3.2. TESTE DE MICRONÚCLEO E ANORMALIDADES NUCLEARES DE *Astyanax spp.* EXPOSTOS A ÁGUAS DE AMBIENTES ANTROPORIZADOS

Nesse estudo, usou-se como variáveis a presença de MNs (Figura 2) e ANs do tipo “blebbed”, “lobbed”, “notched”, “vacuolated”, “binúcleo”, “cariorréxis” em sangue periférico (Figura 2).



**Figura 2** - Figura 1 - Alterações morfológicas nucleares: A: Eritrócito Normal; B: Micronúcleo; C e D: Binúcleo; E- blebbed; F- vacuolated G –lobbed; H – Cariorrhexe (apoptose nuclear); I - notched. (CARRASCO et al. 1990).  
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Nos peixes analisados nos quatro pontos do Rio Ijuí, não há presença significativa de MN em relação ao grupo controle (tabela 2), bem como entre os pontos avaliados.

**Tabela 3** - Somatório total dos valores dos MN e AN do número total de peixes do controle e dos testes submetidos ao teste de Kruskal Wallis ao nível de 5% de significância.

GRUPO	TOTAL DE ANORMALIDADE *	TOTAL DE MICRONÚCLEOS *
CONTROLE	933 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>
PONTO 1	7100 <sup>b</sup>	97 <sup>a</sup>
PONTO 2	9022 <sup>b</sup>	61 <sup>a</sup>
PONTO 3	7826 <sup>b</sup>	62 <sup>a</sup>
PONTO 4	6922 <sup>b</sup>	39 <sup>a</sup>

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

\*Letras diferentes apresentam significância estatística.

O número total de MN encontrado nos indivíduos submetidos à água do Ponto 1 é maior quando comparado aos demais pontos e controle, embora não com diferença significativa. Esse pequeno aumento se deve às condições urbanas do local e período não chuvoso, o que promove acúmulo de efluentes e poluentes que potencializa mecanismos de clastogenicidade (OBIAKOR et al. 2014).



Os eventos que culminam com o aparecimento de MN passam por mais de uma divisão celular e quando ele surge não há mais recurso de reparo, isso nos sugere que as células desses peixes, nas 96 horas de exposição, foram capazes de acionar com êxito os mecanismos de reparo e organização nuclear (NEPOMUCENO et al., 2017).

Em contrapartida quando analisados os eventos de ANs percebe-se que a incidência aumenta significativamente quando comparados com o controle. As ANs são nitidamente alterações importantes no núcleo celular, evidenciando que durante as divisões celulares que ocorreram nesse período de 96 horas o núcleo tentou reorganizar seu genoma embora com erros (tabela 3). Substâncias clastogênicas, presentes nesse ecossistema são causadoras de quebra cromossômica ou de disfunções dos fusos mitóticos o que acarreta no aparecimento de MN e/ou AN (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011; THOMÉ et al, 2016).

Nesse sentido, as diferenças encontradas nas frequências de MN e AN provavelmente estão relacionadas às características ecológicas inerentes ao organismo para ingerir, acumular, metabolizar e excretar com eficiência substâncias xenobióticas (FURNUS et al., 2014). Além disso, outros fatores, incluindo a eficiência no reparo do DNA e a cinética de remoção de células que permitem a eliminação dessas células danificadas, podem estar envolvidos na variação das frequências espontâneas de MN e AN (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011; FURNUS et al., 2014).

As variações entre os pontos se explica, conforme já sabido que rios e demais cursos d'água possuem a aptidão de restabelecer suas características naturais na tentativa de alcançar a purificação das águas, (TEIXEIRA; PORTO, 2008; THOMÉ et al. 2016). Como verificado nas tabela 4 variação na ocorrência de MN e AN para um mesmo ponto nas três coletas realizadas.

As chuvas são capazes de diluir ou agregar composto prejudiciais as águas do rio, (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014; SANTOS, 2015) por exemplo a presença de agroquímicos, utilizados em toda extensão do rio Ijuí e seus afluentes, pode obedecer a um modelo sazonal que depende do tempo de aplicação e do mecanismo de transporte, entretanto não é possível observar influência nas ocorrências de alterações afetadas pelas precipitações no período. Nos rios os agroquímicos são transportados por longas e variadas distâncias e o transporte de uma substância genotóxica depende diretamente de fatores, como a estabilidade, o estado físico do

composto e a velocidade do fluxo do rio. De forma geral, em uma fonte pontual de contaminação a concentração do poluente diminui continuamente conforme a distância da origem (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014).

Ao comparar o surgimento de ANs e MN em relação às condições sazonais de chuva/seco vemos que não há diferença significativa conforme a tabela 4, portanto a presença de substâncias potencialmente genotóxica, nesses pontos, não têm relação com a ocorrência de chuvas.

**Tabela 4** - Variação das chuvas e a ocorrência de AN e MN

PONTO	COLETA	CHUVAS**	TOTAL DE AN*	TOTAL DE MN*
PONTO 1	COLETA 1	0	1165	42
	COLETA 2	0	3105	17
	COLETA 3	21-50	2830	38
PONTO 2	COLETA 1	0	852	32
	COLETA 2	0-20	3519	18
	COLETA 3	0-20	4651	11
PONTO 3	COLETA 1	0-20	3263	36
	COLETA 2	0	1822	14
	COLETA 3	0-20	2741	12
PONTO 4	COLETA 1	0	2699	15
	COLETA 2	0-20	1994	12
	COLETA 3	0	2229	12

\*Considerar total para os 10 indivíduos da coleta.

\*\*Chuvas foram consideradas os seguintes padrões para às 48 horas anteriores a retiradas dos peixes: 0-20 mm; 21-50 mm; 51-100 mm. +100 mm.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Em todos os pontos analisados observou-se potencial de indução de eventos clastogênicos em *Astyanax*. Os dados coletados sugere que as células com AN, apresentaram eficiência no mecanismo de reparo nesses organismos durante o curso da exposição.

### 3.1.3.3. HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS DE *Astyanax spp.* EXPOSTOS A ÁGUAS DE AMBIENTES ANTROPIZADOS

As brânquias exercem funções vitais nos peixes. Através da sua atividade ocorrem os processos de trocas gasosas, osmorregulação, equilíbrio ácido básico e excreção de compostos nitrogenados (MACHADO; FANTA, 2003). A qualidade do ambiente aquático afeta diretamente a estrutura branquial, uma vez que está em contato direto com a água, e conseqüentemente em contato direto com poluentes

solubilizados, o que se torna uma das vias de entrada no organismo (GARCIA-SANTOS et al., 2007).

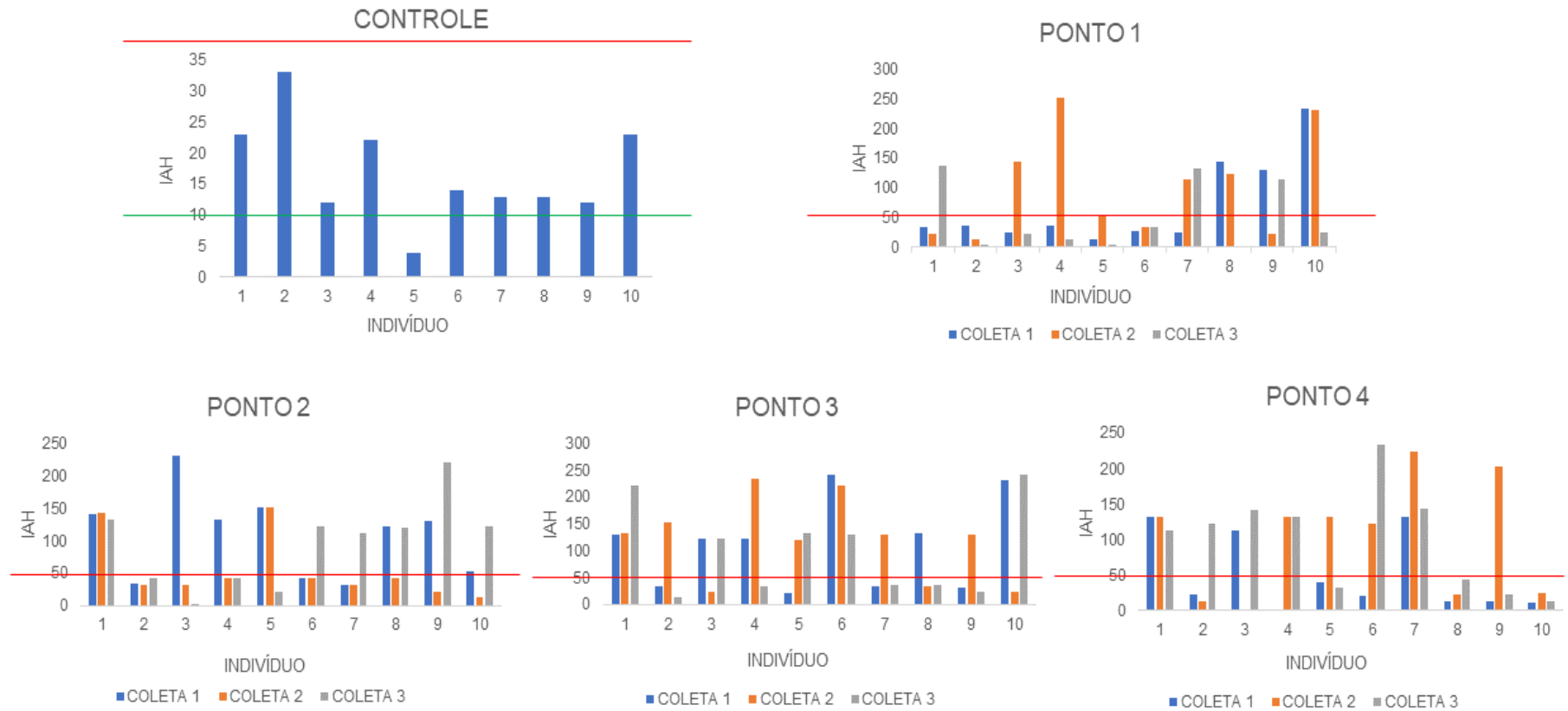
O Índice de Alterações Histopatológicas (IAH) das brânquias obtido nesse trabalho apresenta uma grande variação, indicando que as lesões são de grau leve a severas. As lesões severas podem ser observadas nos peixes submetidos à exposição nos quatro pontos nos três momentos de exposição (Figuras 3 e 4).

No Ponto 1, localizado próximo ao perímetro urbano, podemos verificar um maior número de indivíduos com IAH severo, na segunda exposição, onde mais de 60% dos animais apresentam danos graves em suas brânquias. Em quase todos os indivíduos mantidos no Ponto 1 foram encontramos alterações moderadas em quase totalidade dos animais, observando somente um total de 36% dos 30 peixes com índices IAH para alterações severas (Figuras 3).

No Ponto 2, o ponto com maior impacto agropecuário, os resultados mostram que aproximadamente 45% dos indivíduos analisados apresentam IAH para alterações severas. Nos demais indivíduos encontramos alterações moderadas, que podem evoluir para danos severos (Figuras 3).

Os dois pontos seguintes trazem semelhanças em seus dados com os já descritos, o Ponto 3, localizado em ambiente lântico, 60% dos animais apresentaram IAH severas. Já no Ponto 4, localizado na foz do rio Ijuí, encontramos 50% dos organismos estudados também com IAH severo (Figuras 3).

O grupo controle apresentou poucas alterações histopatológicas, sendo em sua maioria leves. Comparando o grupo controle, com os indivíduos expostos à água do rio Ijuí encontramos IAH bem menores, onde aproximadamente 60% dos animais do grupo controle apresentam IAH representativo para funcionamento normal e alterações leves, o que é encontrado em menos de 10% dos peixes expostos ao teste (Figuras 3).



**Figura 3** - IAH (Índice de Alteração Histológica) observado nos indivíduos nas 3 coletas (10 peixes por coleta). Parâmetros IAH: 0-10 = funcionamento normal; 11-20 = alterações leves; 21-50 = alterações moderadas; >51 = lesões severas (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994). Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

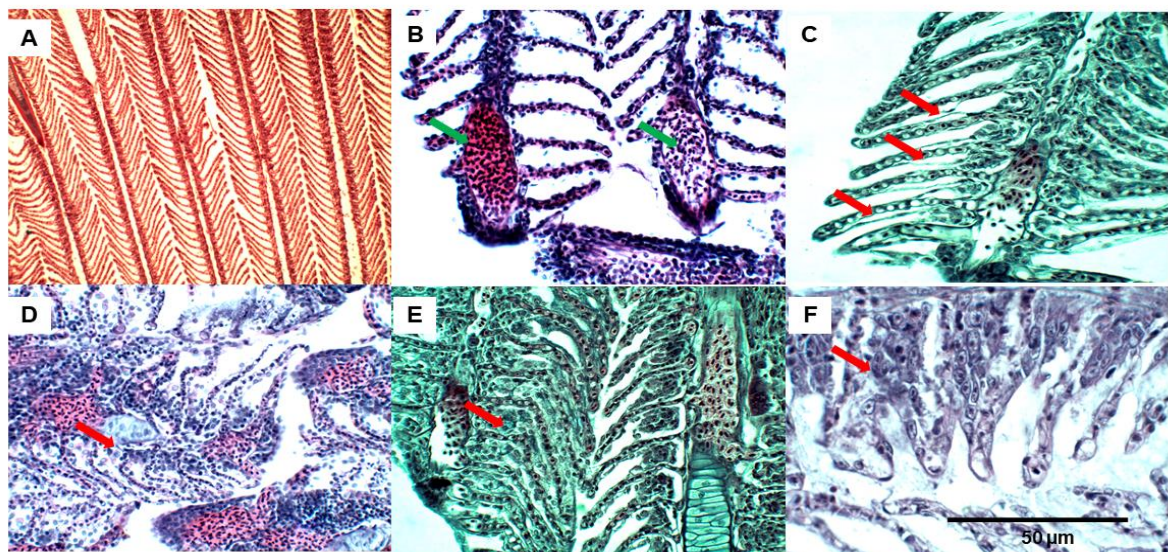
Comparando estatisticamente os grupos com o controle através do teste T encontramos significância para  $P < 0,05$  de todos os grupos em relação ao controle conforme tabela 5.

**Tabela 5** - Tabela dos valores de p gerado pelo teste T entre os pontos de coleta referente ao IAH das brânquias.

Grupos	Valor de P
Controle/Ponto 1	0.0282
Controle/Ponto 2	0.0082
Controle/Ponto 3	< 0.001
Controle/Ponto 4	0.0098

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Os danos observados com maior frequência nas brânquias foram: do estágio I: elevação do epitélio (figura 5), do estágio II: fusão parcial e fusão completa das lamelas, e do estágio III: necroses, congestão vascular e destruição do epitélio lamelar aparecem em proporções semelhantes.



**Figura 4** - Alterações histológicas observadas em brânquias dos peixes do Rio Ijuí. A- Visão geral de uma brânquia; B - Aneurisma lamelar; C - Elevação do epitélio lamelar; D - Desarranjo lamelar; E - Fusão completa de algumas lamelas; F - Destruição do epitélio lamelar e Fusão incompleta das lamelas. Fonte: Autor.

É possível evidenciar, com os dados coletados e analisados, que os danos nas brânquias são significativos e trazem uma leitura das condições do ambiente estudado. O uso de parâmetros biológicos sugere uma resposta mais precisa da qualidade dos ambientes aquáticos, logo, o uso de parâmetros biológicos, baseia-se

nas respostas dos organismos ao meio aonde vivem (BUSS, 2003). Considerando que os parâmetros físico-químico da água encontram-se dentro dos padrões em todos os pontos analisados e as alterações encontradas nas brânquias são de grau moderado a severo sugerem que compostos xenobióticos presentes no ambiente estão induzindo danos a esses órgãos.

Essas lesões identificadas nas brânquias não são específicas de um único contaminante, mas sim, de uma complexa variedade de substâncias estressoras. Estudos demonstraram que em elevadas concentrações os metais cádmio, níquel e cobre (GARCIA-SANTOS et al., 2007; PANE et al. 2004), os agroquímicos (VIRGENS et al, 2015) e o óleo diesel (SIMONATO et al. 2007) provocam as mesmas alterações que as encontradas no presente estudo.

Os efeitos das substâncias presentes no ambiente aquático do rio Ijuí sobre as brânquias dos lambaris são especialmente graves, isto porque as brânquias são fundamentais para a sobrevivência dos peixes sendo o principal órgão de respiração e regulação. O prejuízo do não funcionamento das brânquias durante a exposição aguda a algum poluente presente no ambiente pode levar o peixe à morte (SILVA, 2004).

As alterações identificadas no tecido branquial nada mais são do que uma tentativa de defesa do organismo em resposta a presença de substâncias estranhas, como, a elevação epitelial, hiperplasia, fusão parcial e completa das lamelas, as quais estão identificadas nos peixes de todos os pontos desse estudo. Essas alterações diminuem a área de superfície vulnerável das brânquias, assim, aumentando a barreira de difusão aos poluentes, entretanto, essa barreira dificulta também a realização das trocas gasosas e o balanço hidromineral (ERKMEN; KOLANKAYA, 2000).

O primeiro sinal de dano branquial em peixes inclui a elevação epitelial, que é a alteração mais frequentemente encontrada neste estudo. Esta alteração caracteriza-se pela elevação de uma lâmina contínua do epitélio lamelar para longe do sistema de células, aumentando assim a distância entre o meio externo e o sangue, levando a formação de um espaço que pode ser preenchido por água, induzindo a formação de edema (SILVA, 2004).

As lamelas branquiais dos lambaris expostos as águas do rio Ijuí apresentam alterações vasculares, como congestão vascular e aneurisma. O aneurisma

normalmente resulta do colapso do sistema de células pilares, que prejudica a integridade vascular com a liberação de grande quantidade de sangue que empurra o epitélio lamelar para fora (ALVES et al., 2017; CANTANHÊDE et al., 2014, 2016; GARCIA-SANTOS et al., 2007).

A análise histológica das brânquias, revela uma situação preocupante em relação ao estado de conservação do Rio Ijuí nos pontos escolhidos. Até o momento desse estudo, as ações antrópicas não resultaram mortandade de peixes, contudo, o impacto na fisiologia dos órgãos estudados é evidente, e indica a presença de poluentes tóxicos e genotóxicos nos pontos estudados.

Os resultados obtidos na análise histológica das brânquias, levam a concluir que os peixes expostos às águas em todos os pontos apresentam alterações branquiais de grau moderado a severo em comparação com controle, e isto indica a presença de contaminantes estressores do epitélio branquial.

Sobre à análise histológica das brânquias, conclui-se, que os peixes expostos em todos os pontos apresentam alterações de grau moderado a severo em comparação com controle que sugere a presença de contaminantes estressores do epitélio branquial.

## **3.2. CAPÍTULO 2 - ESTRESSE OXIDATIVO COMO RESPOSTA DA POLUIÇÃO DE ÁGUAS SUPERFÍCIAIS ANTROPIZADAS NO FÍGADO DE *Astyanax spp.***

### **3.2.1. INTRODUÇÃO**

O estresse oxidativo é uma expressão usada para descrever vários processos deletérios resultantes de um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) a níveis que excedem a capacidade antioxidante do organismo. Os biomarcadores de estresse oxidativo constituem importante ferramenta na avaliação da contaminação de ambientes aquáticos. O equilíbrio entre as defesas que evitam a geração de estresse oxidativo é fundamental para a homeostase dos peixes. Quando há um desequilíbrio entre oxidantes e defesas, a situação conhecida como o estresse oxidativo pode ser estabelecida, onde a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio pode levar à danos irreversíveis em macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA levando até mesmo a morte da células (MODESTO; MARTINEZ, 2010).

Diversos compostos xenobióticos pode causar alterações que induzem estresse oxidativo. Estes compostos tem seu nível aumentando de forma alarmante nos ecossistemas aquáticos como resultado das atividades antropogênicas. Neste contexto, a biota aquática especialmente os peixes tornaram-se importantes para a detecção do grau de impacto, uma vez que este meio está constantemente exposto a um grande número de substâncias (COGO et al., 2009).

Uma das consequências do aumento das espécies reativas de oxigênio e estabelecimento do estresse oxidativo são os danos oxidativos em biomoléculas. Um dos processos oxidativos mais estudados é aquele onde ocorre a quebra dos lipídios das membranas celulares e a formação do radical peroxil (LOO\*). Este processo chamado de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é extremamente lesivo e considerado uma das principais causas de injúria e morte celular (Hermes-Lima, 2004), e pode ser induzida por poluentes, tais como agroquímicos (MODESTO; MARTINEZ, 2010). Tais alterações são provocadas por influência direta dos compostos sobre determinadas estruturas celulares, como na membrana, a qual pode ser degradada por ação de diversas substâncias e provocar reações adversas no organismo (COGO et al., 2009).

Além da peroxidação lipídica, outra consequência do estresse oxidativo são os danos oxidativos às proteínas, os quais podem ocorrer pelo ataque direto das EROs ou através de moléculas originadas do processo de LPO, como o malondialdeído



(MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE). Estes danos podem causar modificações em aminoácidos, levando a alterações conformacionais, alteração da função da proteína perda de atividade de enzimas, e até mesmo morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; MODESTO; MARTINEZ, 2010). A carbonilação de proteínas é atualmente um dos biomarcadores mais gerais e mais comumente usados de oxidação de proteínas.

Desta forma, mensurar possível dano oxidativos em organismos que habitam determinados ecossistema pode ser ferramenta útil para avaliar-se sobrevivência e níveis de contaminação aquática, e evidenciar possíveis indícios de danos futuros a função das células e tecidos, assim como danos ao DNA.

### **3.2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), sob o protocolo nº 589216051.

#### **3.2.2.1. ÁREA DE ESTUDO E PROTOCOLO DE COLETA**

##### **3.2.2.1.1. Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí**

Conforme descrito por Kasper (2019), a Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí está localizado na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. O rio Ijuí é afluente do rio Uruguai em sua porção média (Figura 1). Surge através da união dos rios Palmeira, Caxambu e Fiúza, no município de Panambi – RS. Nessa bacia hidrográfica estão inseridos 36 municípios, abrangendo municípios como Cruz Alta, Ijuí, Santo Ângelo e Tupanciretã, com a presença de indústrias, e principalmente de extensas áreas agrícolas com intensa produtividade de grãos. Os principais usos da água se destinam a irrigação e ao abastecimento público. A bacia é constituída por mais 12 principais rios que cortam cidades e áreas agrícolas, sendo os principais os rios Caxambu, Potiribu, Conceição, Ijuzinho todos tendo como foz o Rio Ijuí, e esse desaguar no Rio Uruguai.

##### **3.2.2.1.2. Caracterização dos pontos e análise dos parâmetros físico-químicos**

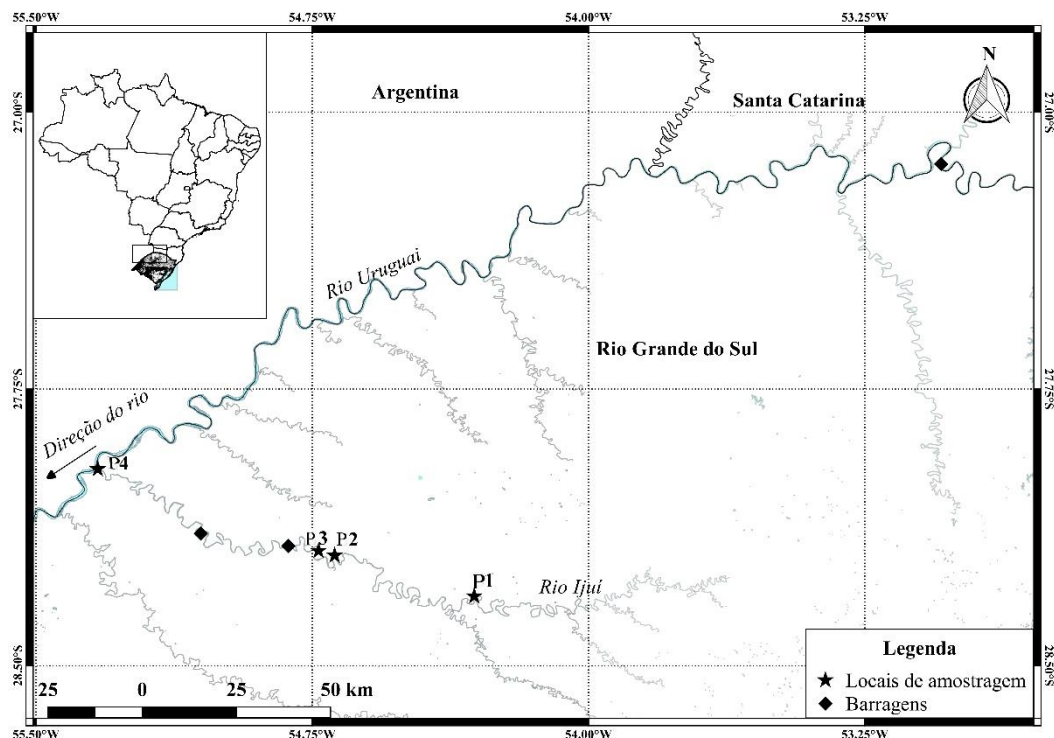
Os quatro pontos de coleta dos peixes estabelecidos para este estudo foram estrategicamente selecionados, visando os mais diversos ambientes e seus potenciais causadores de impacto. Abaixo, apresentamos uma descrição de cada ponto avaliado:

P1 – Localizado sob as coordenadas  $28^{\circ}18'50.74''\text{S}$  e  $54^{\circ}18'38.39''\text{W}$ , este ponto fica situado logo após o perímetro urbano de Santo Ângelo-RS. As principais características do ponto são a inexistência de mata ciliar e por receber descarga de efluente industrial e urbano através dos afluentes que cortam a cidade (Apêndice, figura 1).

P2 – Localizado sob as coordenadas  $28^{\circ}11'53.20''\text{S}$  e  $54^{\circ}41'25.47''\text{W}$ , próximo a cidade de Cerro Largo-RS. O ponto caracteriza-se pela inexistência de mata ciliar e por estar próximo a áreas de criação de suínos e bovinos de corte e leite, além de anteriormente ter percorrido por extensas áreas agrícolas. Esse ponto ainda antecede um barramento devido a presença de uma hidrelétrica (Apêndice, figura 2).

P3 – Localizado sob as coordenadas  $28^{\circ}11'19.26''\text{S}$  e  $54^{\circ}43'58.56''\text{W}$ , no interior da cidade de Cerro Largo - RS. O ponto caracteriza-se pela inexistência de mata ciliar, possuindo área de criação de bovinos de leite, além de ser percorrido por extensas áreas agrícolas. Esse ponto localiza-se no barramento da Usina Hidrelétrica São José - Ijuí Energia S.A, por isso caracteriza-se por ser o único ponto do estudo em ambiente lântico (Apêndice, figura 3).

P4 – Localizado sob as coordenadas  $28^{\circ}03'29,0''\text{S}$  e  $55^{\circ}07',39,0''\text{W}$ , é o ponto próximo do Rio Uruguai, localizado no município de Roque Gonzales/Rs. Caracterizando-se pela inexistência de mata ciliar e extensas áreas agrícolas (Apêndice, figura 4).



**Figura 1** - Mapa do Rio Ijuí com marcação dos pontos e barramentos. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2020

O ambiente no local dos pontos foi caracterizado levando em consideração os focos de antropização: presença de mata ciliar, atividades agrícolas e presença de áreas urbanas.

Os parâmetros físico-químicos temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade (COD) foram avaliados em todos os momentos da coleta através Medidor Multiparâmetros Asko SX836.

### **3.2.2.2. MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

#### **3.2.2.2.1. Quantificação de Proteínas Carboniladas**

Após o período de exposição por 96 horas, como já descrito no capítulo primeiro desse estudo, os peixes do gênero *Astyanax* foram eutanasiados, os fígados de cada indivíduo foram coletados e acondicionados em tubos criogênicos identificados e depositados imediatamente em nitrogênio líquido, sendo levado até o Laboratório de Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul, onde permaneceram assim armazenado até seu processamento final.

Assim, amostras de fígado foram homogeneizadas (1:10, peso/volume) em tampão de homogeneização [NaCl (45,6 mM) + KCl (0,9 mM) + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,7 mM) + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,48 mM) + EDTA (1 mM) + H<sub>2</sub>O ultrapura (ajustar pH em 7.4) ], contendo inibidor de protease (fluoreto de fenilmetilsulfonil, PMSF; 0,05mM). Após a homogeneização, a concentração de proteínas totais em cada amostra foi determinada através do método de Biureto (AUGUSTYNIAK et al., 2015).

O processamento das amostras para quantificação das proteínas carboniladas ocorreu seguindo protocolo estabelecido por Hawkins et al., 2009; Levine et al., 1994, adaptado.

Em três microtubos (para cada amostra), foram pipetados 250 µL da amostra diluída na concentração de 3 mg/mL de proteína. Os tubos foram etiquetados sendo assim divididos: i: um tubo para o “Branco”, onde foram adicionados mais 250 µL da

solução de HCl 2,5 M [HCl + H<sub>2</sub>O ultrapura ou destilada] ii. tubo com solução DNPH 10mM [DNPH + HCl 2,5 M].

Em seguida as amostras foram incubadas no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos, agitando no vortex a cada cinco minutos. Em seguida foi adicionando 150 µL da solução de ácido tricloroacético (TCA) a cada tubo (a concentração final no tubo ficou 10%) e agitado no vortex e então, as amostras foi incubadas -20°C (freezer) por 20 minutos.

Após o tempo de incubação a -20°, as amostras foi centrifugadas a 9000 x g a 4°C por 15 minutos. Foram removidos cuidadosamente o sobrenadante, para não desprender o pellet. O pellet foi lavado três vezes com a solução de etanol/etilacetato [1/1; v/v] para remover o excesso de DNPH. Entre cada lavagem, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 9000 x g a 4°C. Após as três lavagens, o pellet foi redissolvido em 500 µL de guanidina-HCl 6 M, agitando no vortex até o pellet se dissolver por completo quando foi pipetado 220 µL de cada tubo, em duplicata, em placa de 96 poças. A absorvância das amostras foi determinada em espectrofotometro, a 370 nm.

A determinação da concentração de proteína após a análise ocorreu com a calibração de uma curva padrão seriada, preparando uma solução de 1mg/mL de albumina bovina diluída em guanidina-HCl 6M, diluindo a solução em: padrão 0 mg/mL; padrão 0,2 mg/mL; padrão 0,4 mg/mL; padrão 0,6 mg/mL; padrão 0,8 mg/mL e padrão 1 mg/mL. Cada concentração foi preparada em triplicata. Foram determinadas as absorvâncias a 280 nm dos padrões utilizando cubeta de quartzo. Em seguida foram determinadas as absorvância a 280 nm das amostras correspondentes ao branco, que haviam sido tratadas somente com HCl, sem adição de DNPH.

Apos a leitura do branco foi calculada uma reta padrão com as absorvâncias dos padrões de BSA e determinada a concentração de proteína de cada amostra (em mg/mL).

A concentração de proteína carbonilada foi determinada usando o coeficiente de extinção do DNPH em 220 µL a 370 nm ( $0,011 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ), com a concentração de proteína carbonilada em moles/L =  $[(\text{Abs } 370 \text{ nm})/0,011]$ . Multiplicando por  $1 \times 10^6$  para converter a nmol/mL. Calculamos a média de absorvância de cada amostra com

DNPH e de cada amostra com HCl (controle). Subtraindo a média de absorvância do controle das amostras com DNPH. Isto é a absorvância líquida (AL).

A concentração das proteínas carboniladas foi expressa em nmol de proteína carbonilada por mg de proteína, utilizando, os valores médios determinados:  $[\text{prot. carbonil (nmol/mL)}]/[\text{proteína (mg/mL)}] = \text{nmol carbonil/mg de proteína}$ .

#### **3.2.2.2. Análise de Peroxidação Lipídica – TBARS**

As amostras de fígado foram homogeneizadas na proporção 1:10, peso volume, em solução de homogeneização (NaCl (137 mM) + KCl (2,7 mM) + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM) + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 mM) + PBA (10 mM) + Ajuste o pH para 7,4 com HCl ou NaOH (completado com H<sub>2</sub>O ultrapura até volume de 1 litros)). A análise da peroxidação lipídica foi feita seguindo o protocolo estabelecido por Oakes e Van Der Kraak (2003) adaptado. Em tubos de ensaio foram adicionados 10 µL do homogeneizado (em duplicata) a uma solução de reação contendo 20 µL de solução de hidroxitolueno butilado (BHT; a concentração no ensaio é de 67 µM), 150 µL de ácido acético 20%, 150 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA; 0,8%), 50 µL de H<sub>2</sub>O milliQ e 20 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS; 8,1%). Uma curva padrão foi construída com tetrametoxipropano (TMP) e esta passou pelas mesmas etapas de ensaio que as amostras. O passo seguinte foi aquecer os tubos em banho-maria a 95°C por 30 minutos (cobertos com papel alumínio para prevenir evaporação), deixar esfriar por 10 min. As amostras foram levadas a capela e adicionadas 100 µL de H<sub>2</sub>O milliQ. Em microplaca de poços foram pipetados 150 µL da mistura de reação de cada tubo em duplicata. Em seguida foi medido a absorvância das amostras a 532 nm.

#### **3.2.2.3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS**

Os dados da atividade enzimática de estresse oxidativo foram expressos em médias ± erro padrão e submetidos a análise de variância (ANOVA), para avaliar as diferenças médias entre os pontos e os esforços amostrais. Para comparação das médias foi aplicado teste de comparações múltiplas (Tukey).

Para todos os testes, foi considerado significativo  $p \leq 0,05$ . E foi utilizado o programa BioEstat. 5.3.

### 3.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.2.3.1. CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE

O presente estudo mostrou o efeito de espécies reativas no fígado peixes do gênero *Astyanax* expostos as águas do rio Ijuí. Os parâmetros físicos químicos da são apresentados na tabela 1.

**Tabela 1** - Parâmetros físico-químicos da água do rio no momento da eutanásia dos lambaris.

CARACTERÍSTICA	CONTROLE	PONTO 1			PONTO 2		
Coleta	*	1	2	3	1	2	3
pH	7.87	7.2	7.8	7.4	7.6	8	7.7
COND. (µs)	271	57	67.8	95.9	60.1	62.3	97
ODi (mg/L)	6.2	6.3	10.5	5.9	5.9	8.4	9.8
Temp. H <sub>2</sub> O (°C)	24.9	21.6	16.4	17.2	21.6	14.9	16.4
Temp. Ambiente (°C)	21	22	19	19	22	16	18
Chuvas (mm)**	*	0	0	21-50	0	0-20	0-20
Disco de Secchi (cm)	*	28	118	16	36	62	54

CARACTERÍSTICA		PONTO 3			PONTO 4		
Coleta		1	2	3	1	2	3
pH		7.5	8.8	7.9	7.2	7.7	7.1
COND. (µs)		57.4	61.4	69.3	63.3	61.9	60.3
ODi (mg/L)		5.9	8.7	11.2	6.6	7.6	8.1
Temp. H <sub>2</sub> O (°C)		19.2	15	16.6	19.3	15.7	19
Temp. Ambiente (°C)		22	16	18	22	16	22
Chuvas (mm)**		0-20	0	0-20	0	0-20	0
Disco de Secchi (cm)		34	56	74	23	83	32

\*ODi=oxigênio dissolvido; COND=condutividade.

\*\*Chuvas foram consideradas os seguintes padrões para às 48 horas anteriores a retiradas dos peixes: 0-20 mm; 21-50 mm; 51-100 mm. +100 mm.

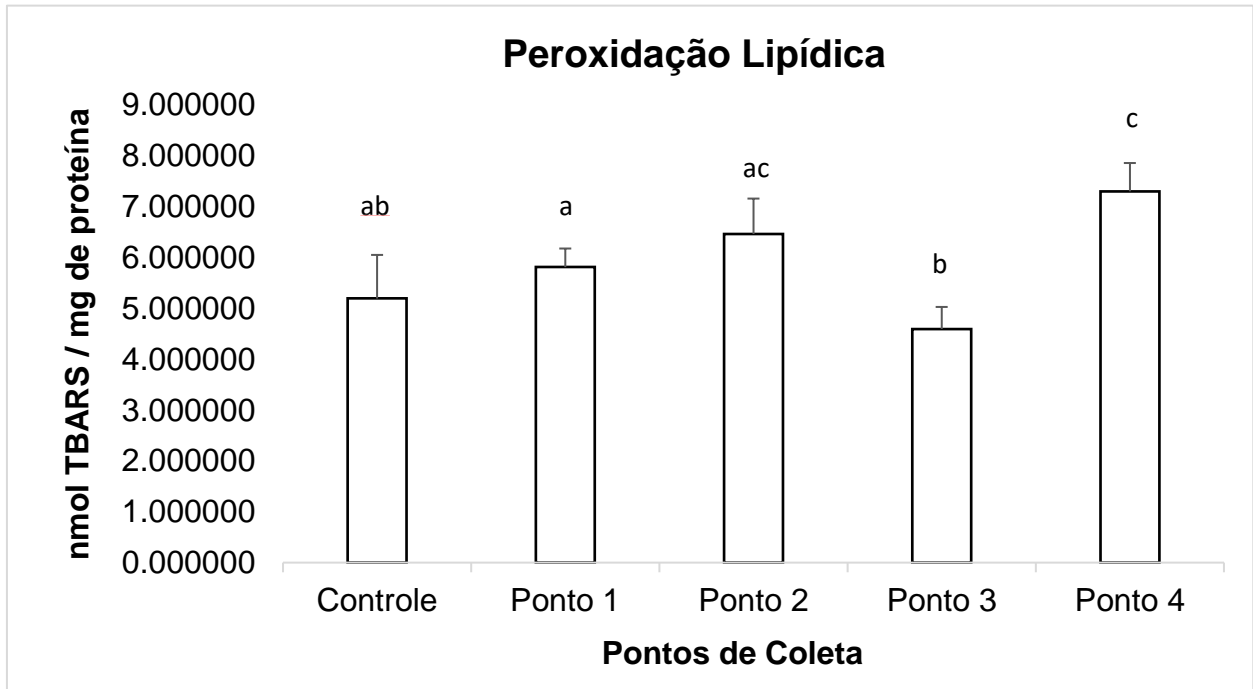
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Os dados referentes aos parâmetros físico-químicos da água não expressaram alterações importantes entre os esforços amostrais para eutanásia dos indivíduos e também entres os pontos analisados.

#### 3.2.3.2. ESTRESSE OXIDATIVO COMO RESPOSTA DA POLUIÇÃO NO FÍGADO DE *Astyanax* spp.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) expressam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na LPO, onde no ponto 4 verificou-se valores estatisticamente maiores se comparado ao grupo controle e aos peixes dos pontos 1 e 3. O ponto 3, contudo não mostrou significância em relação ao controle, mas foi estatisticamente

menor em comparação com os demais pontos. O ponto 2 é significativo apenas em relação as variações ocorridas no ponto 3. O primeiro ponto como já evidenciado foi significativo em suas alterações para os pontos 3 e 4 (figura 2)



**Figura 2** - Peroxidação lipídica em fígado de *Astyanax spp.* Expostos a águas superficiais antropizadas. Dados são expressos com média  $\pm$  erro padrão (n= 130). \*Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $p < 0,05$ ).

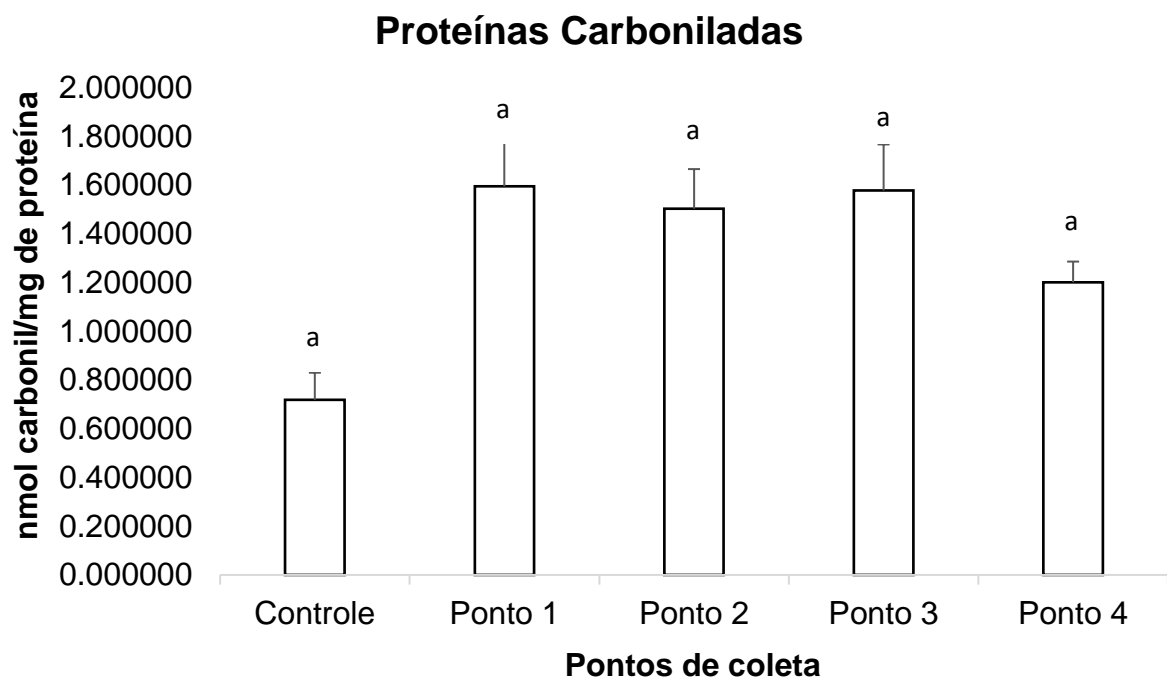
**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2020

Já o resultado do teste de proteínas carboniladas não apresentou dados significativos para  $p < 0,05$  em análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparação múltiplas comparando todos os pontos com o grupo controle, e na comparação entre os grupos ainda assim não foi possível verificar diferenças estatísticas significativas, conforme figura 3

Os parâmetros de estresse oxidativo depois de exposição mostraram resultados que podem estar relacionado com diferenças na resistência dos peixes contra substâncias presentes nas águas do rio devido as concentrações presentes. Considerando-se que a reação das espécies reativas induzido dano envolve a peroxidação da membrana insaturado ácidos graxos e a oxidação de proteínas, os resultados mostraram que expostos as águas contaminadas do rio os peixes podem induzir estresse oxidativo, não tendo significativo aumento para níveis de proteínas carboniladas no fígado.

Como notamos no teste de proteínas carboniladas, o Ponto 1 onde encontramos o maior impacto urbano apresenta índices de estresse maiores, mas não significativos estatisticamente, entretanto divergindo desse dado temos a peroxidação lipídica com os menores valores para esse ponto e os maiores valores no ponto quatro onde por ser a foz e sofrer interferência das águas do rio Uruguai, acreditava-se que poderia diluir os compostos, por outro lado, não conhecemos a realidade das águas do rio Uruguai e a região se caracteriza por ser antropizada e ter variações diárias de nível e turbulência da água.

Os dados expressam um padrão onde os maiores valores LPO e proteínas carboniladas em relação ao grupo controle no ponto quatro. Os Pontos 2 e 3 estão próximos e em ambientes impactados pela produção agropecuária, diferenciando-se pelo o Ponto 3 se caracterizar por ser ambiente lântico o que não foi significativamente capaz de causar interferência nos resultados, onde são significativos para proteínas carboniladas, mas não para LPO.



**Figura 3** – Proteínas carboniladas em fígado de *Astyanax spp.* expostos a águas superficiais antropizadas. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=130). \*Letras diferentes representam diferenças significativas entre os pontos ( $p < 0,05$ ).

**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2020.

Os efeitos tóxicos de contaminantes agrícolas e industriais são mediadas também por alterações metabólicas e enzimáticas. O fígado é um órgão central nos



processos metabólicos que é responsável por várias funções associadas com o metabolismo de contaminantes. Além disso, é também o órgão de desintoxicação e reage principalmente após o estresse causado por substâncias tóxicas. Também tem um papel importante no metabolismo de hidratos de carbono, proteínas e lipídios. As atividades de enzimas metabólicas chaves podem indicar o estado metabólico e sua capacidade de modificar suas atividades contra mudanças nas condições ambientais. Ou seja, algumas enzimas podem modificar funções e alterar funções nas células. Verificações futuras nas alterações de enzimas metabólicas podem apresentar mais explicações para as diferenças estatísticas apresentadas nessa pesquisa.

As situações de estresse que induzem modificações no equilíbrio oxidativo de peixe causando danos oxidativo hepático, pelo aumento no teste para proteínas carboniladas são muitas vezes causadas por xenobióticos, tais como pesticidas, que pode produzir espécies reativas de oxigênio através de vários mecanismos, entre estes, pode-se citar interferências no transporte de elétrons na membrana, associada com a presença de poluentes e o estabelecimento de estresse oxidativo pode ser imputada como um possível mecanismo de toxicidade em organismos aquáticos expostos aos mesmo (MODESTO; MARTINEZ, 2010). Assim como poluentes agrícolas, os provenientes de atividades urbanas trazem consigo uma infinidade de substâncias dissolvidas e recombinadas nas águas dos rios.

A análise do estresse oxidativo como um modelo bioindicador, permite maior controle do ambiente e funciona como sinal de alerta de contaminação. Neste estudo, o período de exposição pode não ter sido suficiente para determinar danos oxidativos no fígado dos lambaris submetidos ao teste.

### 3.3. CAPÍTULO 3. DANOS CELULARES EM ERITRÓCITOS DE *DANIO RERIO* SUBMETIDOS À ÁGUA ANTROPIZADA.

#### Manuscript:

#### Cell damage in *Danio rerio* erythrocytes subjected to anthropized water.

**ABSTRACT.** Several factors can lead to alterations of the water quality in aquatic environments, which has numerous consequences for the organisms that inhabit it. The water bodies located in the northwest region of Rio Grande do Sul periodically receive loads of substances that may contain genotoxic, cytotoxic and mutagenic properties, which affect the genetic integrity of living organisms. This research aimed to analyze the cytological responses of *Danio rerio* by the micronucleus method and nuclear abnormalities when exposed to treatment with anthropized fresh water from the Ijuí River. The collected data from cells with NA indicates that their values are higher than the index of cells with MN, suggesting that the cells have efficiency in the repair mechanism of these organisms faced with genotoxic substances.

**Keywords:** Micronuclei, Nuclear abnormalities, Cytological responses.

#### INTRODUCTION

The demographic census performed by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), indicates that Brazil had had a population increase of approximately 20 times compared to the year 1872, according to 2011 data . In the face of uncontrolled population growth, higher harvest rates are essential to meet the food demand and, therefore, more must be produced.

These high harvest rates are obtained through various methods, being one of them arguably the most debated in the current decade, the abusive use of pesticides. The use of pesticides in agriculture results in an increase in residues in food for human and animal consumption. These pesticides are a mixture of several compounds that consist of an active substance that undergo biodegradation in soil and water (CZAJA et al., 2020). The resulting substances can return to the soil, groundwater and surface water together with rain, where they undergo more transformations. These transformations continue in the farm animal as well as in the processing of food for human consumption.

Due to leaching, creeks and rivers located near large crop areas are one of the destinations of pesticides, especially during rainy periods. According to SPADOTTO et al., (2004), leaching of pesticides tends to contaminate surface water and, in some cases, also groundwater. Thus, the water resources are characterized by being the final destination of some pesticides, leading to contamination of these springs (KASPER *et.al.*, 2018).

Fish are organisms commonly used as biosensors in aquatic ecosystems through the use of micronucleus (MN) analysis and nuclear abnormalities (AN) in peripheral erythrocytes. The MN tests is recognized worldwide by government agencies and institutions, being one of the preferred methods for assessing genetic damage in organisms, allowing to detect alterations caused by both clastogenic agents, responsible for chromosomal breakage, and aneugenic agents, that induce aneuploidy or chromosomal segregation abnormalities (ANSARI et al., 2011).

*Danio rerio* was used as test organism in this research, popularly known as zebrafish or zebra danio, *D. rerio* is a small freshwater teleost (three to four cm), tropical, belonging to Cyprinidae family, which in recent years has attracted attention from the scientific community by presenting some specific characteristics. Several characteristics make the *zebrafish* one of

the most important laboratory models, such as its small size – facilitating its handling and breeding in vivariums – resistance, fast reproduction and genetic characteristics similar to mammals (BARBAZUK, et al., 2000).

This organism has been used as a model to test the action of pesticides in the scope of genotoxicity, being able to extrapolate the results to the human genome (HAWKEY et al., 2019). Thus the objective of this proposal was to analyze genotoxic data of *Danio rerio* submitted to water samples from the referred anthropized points the Ijuí River (RS).

## MATERIAL AND METHODS

### Period and sampling points

Initially, four points of the Ijuí River were chosen for collection of the water to be used in the tests with the bioindicator.

The Ijuí River is located in the northwest region of Rio Grande do Sul State, between the coordinates 28°00' S to 29°05' S and 53°11' W to 55°21' W (SEMA, [s.d.]), beginning with the confluence of the rivers Palmeira, Caxambu and Fiúza, near the municipality of Panambi - RS. It is the main river of the Ijuí Basin, which has an area of 10,703.78 km<sup>2</sup>, composed by 36 municipalities with various economic activities, highlighting the presence of industries as well as extensive agricultural areas, with high grain productivity. The basin consists of 12 more rivers that cut through cities and agricultural areas, until they flow directly into the Ijuí River.

The four sampling points suggest high anthropization with urban and agricultural contamination of waters.

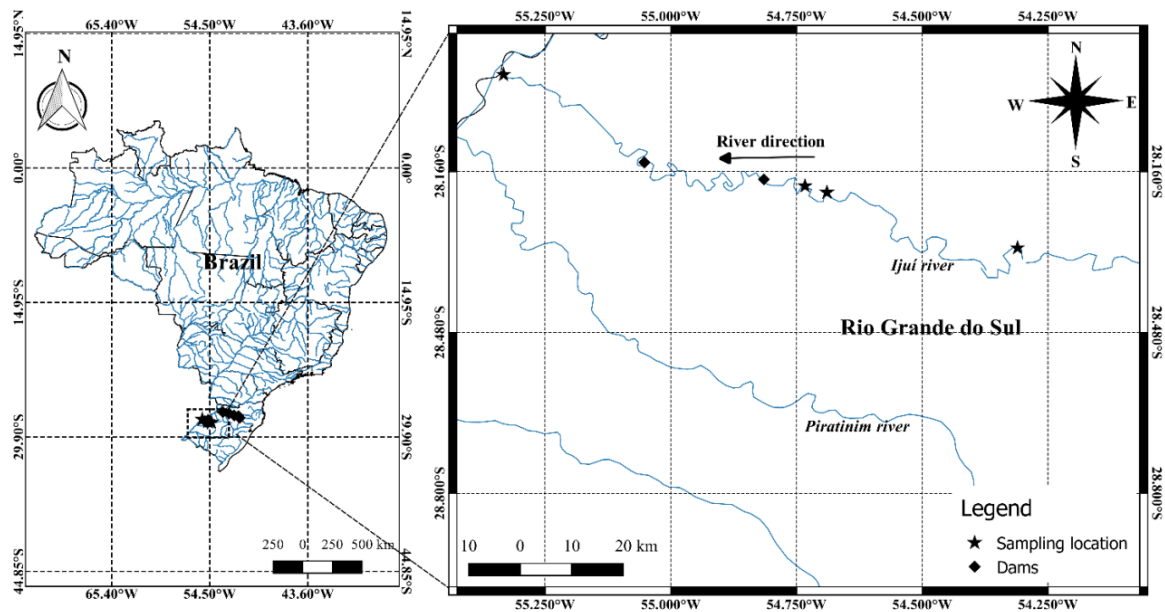
P1 – Located at the coordinates 28°18'50.74" S and 54°18'38.39" W, after the city of Santo Ângelo – RS. The site is characterized by the absence of riparian forest and by receiving discharge of industrial and urban wastewater through tributaries that flow across the city.

P2 – Located at the coordinates 28°11'53.20" S and 54°41'25.47" W, near the city of Cerro Largo – RS. The site is characterized by the absence of riparian forest and by being close to swine and cattle raising areas, besides extensive upstream agricultural areas. This point also precedes a hydroelectric dam, being considered a lotic ecosystem.

P3 – Located at the coordinates 28°11'19.26" S and 54°43'58.56" W, in the rural area of the municipality of Cerro Largo – RS. The site is characterized by the absence of riparian forest, having swine and cattle raising areas, as well as large agricultural areas. This point is located at the São José Hydroelectric Dam - Ijuí Energia S.A, therefore characterized as a lentic ecosystem.

P4 – Located at the coordinates 27°58'0.62" S and 55°19'57.82" W, in the city of Roque Gonzales – RS. The site is characterized by the absence of riparian forest, having high livestock activity nearby. This point is located at the mouth of Ijuí river, that flows into Uruguay river.

**Figure 1:** Location of the sampling points.  
Source: Own construction, 2019.



Sampling was carried out in a dry period. The zebrafish specimen used in this research were obtained in the local commerce of Cerro Largo – RS. Ten fish were used per test, totaling 40 individuals. The fish were acclimatized for one week in aquariums with capacity of 20 liters - 10 specimens per aquarium - in the Laboratory of Genetics and Molecular Biology of UFFS - Cerro Largo - RS. After acclimatization time, the zebrafish specimens were placed for 96 hours in the water collected at the four different points of the Ijuí River. The fish were fed *ad libitum* under controlled temperature and BOD (Biochemical Oxygen Demand) conditions, as recommended by CONCEA Normative Resolution 34.

### Preparation of the blood films

After the test period, the fish were sedated and euthanized according to the method approved by CEUA/nº 589216051. Blood was collected through puncture in the caudal artery using glass capillaries with EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid). After the collection, blood films were prepared in previously cleaned a glass slide. Only one slide per fish was made due to the fact that the species is very small and the blood volume is low. The films were dried at room temperature, submerged in methanol (100%) for 20 minutes for fixation of the biological material, then dried again and properly packaged in slide-specific plastic tubes.

The fish carcasses were frozen and allocated for biological waste disposal by a company contracted by UFFS.

### Staining of the blood films

The methodology of micronuclei (MN) slide confection followed an adapted Feulgen's protocol, with Schiff staining and Fast-Green counterstaining.

Hydrolysis was performed in HCL 5N (5 molar) for five minutes, with subsequent washing in distilled water, staining with Schiff reactive for two hours in the dark, followed by washing, counterstaining with Fast-Green, washing again and drying for subsequent analysis.

### Erythrocytes count and observation analysis

The observation and analysis of the slides was performed using an optical microscope with oil immersion lens (1000x maximum magnification). 3,000 cells per fish were counted and the presence of MN and AN was verified (Figure 3). The AN were classified in five types, according to CARRASCO, TYLBURY & MYERS (1990):

- a) Bebbled: present a small invagination in the membrane and in the chromatin;
- b) Lobed: present a greater invagination in the membrane and in the chromatin compared to bebbled;
- c) Notched: present a deep invagination in the chromatin;
- d) Vacuolated: nuclei that have a region inside which resembles the vacuoles. These “vacuoles” are devoid of any visible material inside;
- e) Karyorrhexis: cellular alteration that involves the fragmentation and degeneration of the nuclei, leading to cell death (RAMIREZ, 2000).

The Kruskal-Wallis test for nonparametric data was chosen for the analysis of the results, with a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

No deaths or abnormal behaviors of the fish were observed during the testing period. The results were obtained through exposure of the zebrafish specimens to anthropized fresh water of the Ijuí River and to clean control water.

The physicochemical parameters analysis of the collected water, as well as of the control water, is shown in Table 1, and as can be verified, the samples did not show differences in relation to the control and according to the CONAMA Resolution 357/2005.

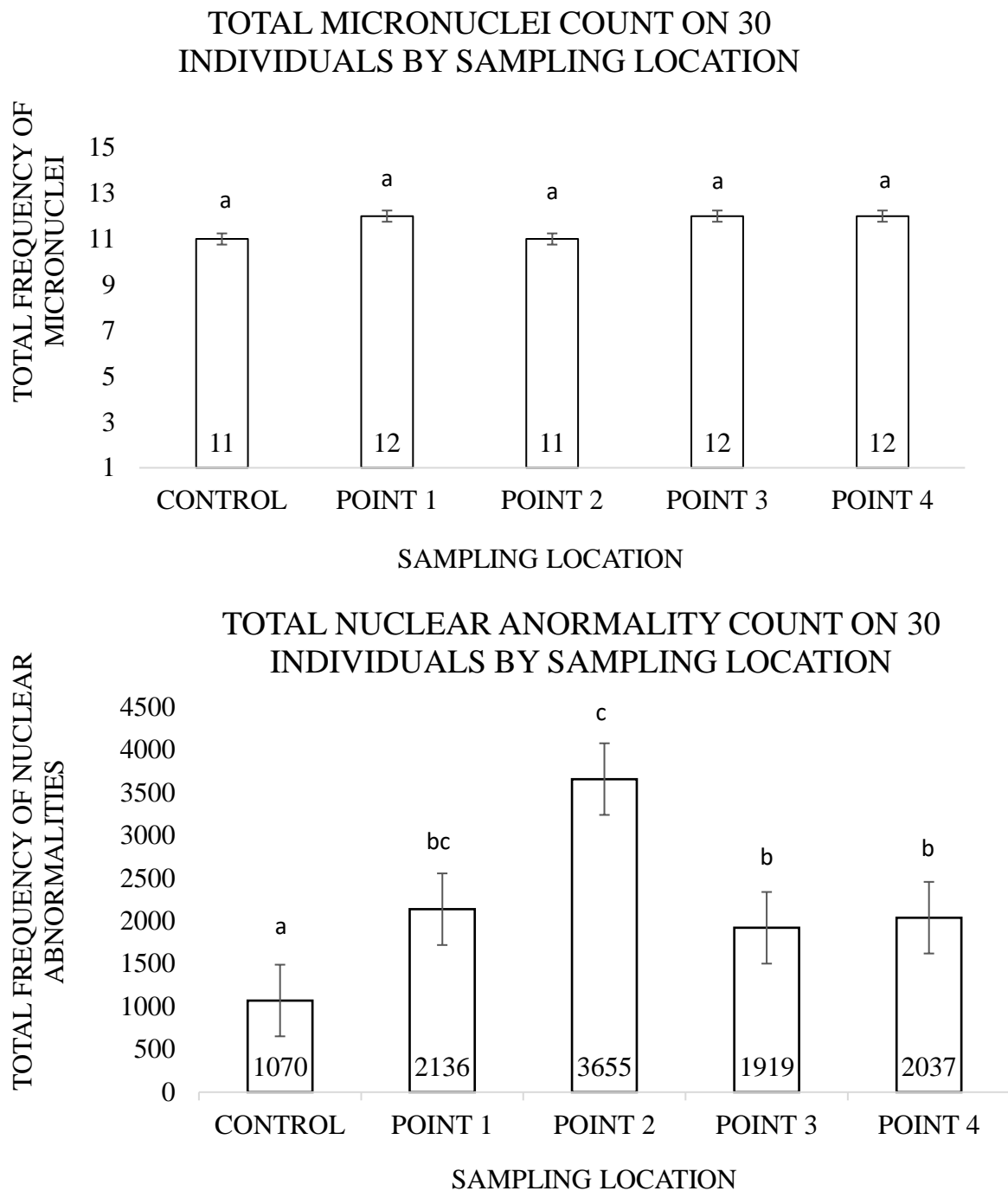
**Table 1.** Physicochemical parameters of the aquarium water at the time of zebrafish euthanasia.

Parameter	Control	Point 1	Point 3	Point 3	Point 4
<b>PH</b>	8.42	8.2	7.74	7.9	7.3
<b>CONDUCTIVITY (<math>\mu</math>S)</b>	282	230	167.2	284	140.2
<b>DISSOLVED O<sub>2</sub> (mg/L)</b>	9.9	9.7	5.1	11.3	12.8
<b>H<sub>2</sub>O TEMPERATURE (°C)</b>	22.5	22.5	27.4	24.1	22
<b>AMBIENT TEMPERATURE (°C)</b>	24	24	28	20	24

Source: Own construction, 2019.

The data of MN and AN verified in 3,000 erythrocytes per fish, kept in control and anthropized water, are presented in Figure 2.

**Figure 2.** Absolute frequencies of micronuclei observed in 30,000 zebrafish erythrocytes (per aquarium), kept in control and anthropized fresh water.



Values of MN and AN analyzed in 10 individuals of each test.

Source: Own construction, 2019.

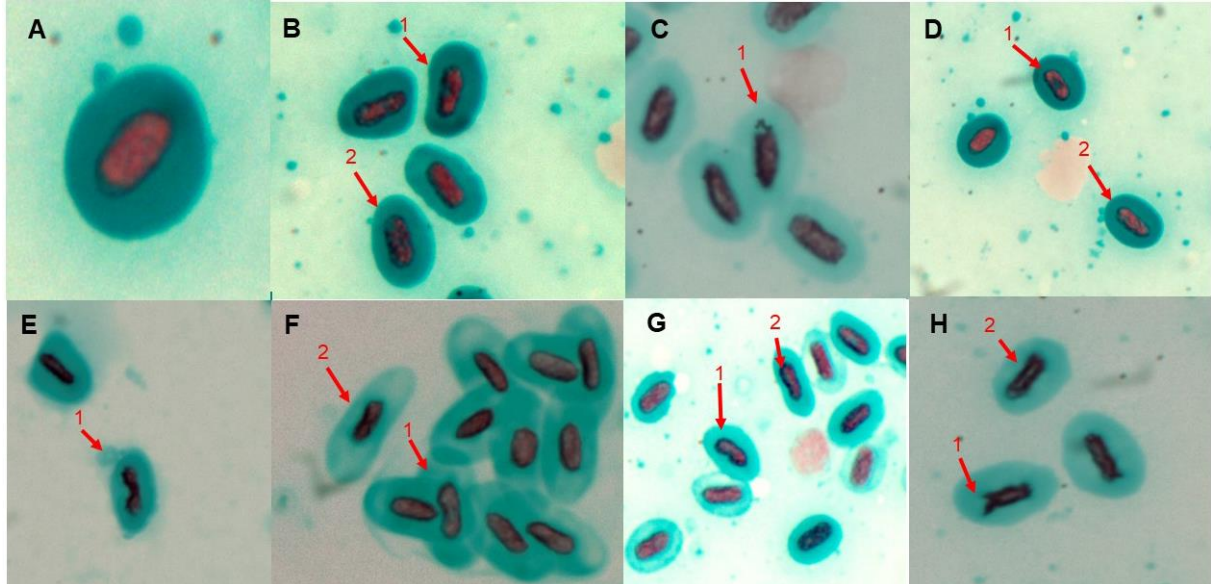
According to figure 2, the fish exposed to treatment with water of the four points of the river presented and increase in the number of nuclear abnormalities in comparison with the fish subjected to the control test. A slight increase in the development of AN is noticeable in the fish group of the point 2, which was statistically significant not only in relation to the control group, but also compared to the points 3 and 4.

Another important topic to be observed is the fact that point 3 has a different characteristic from the others, being a lentic ecosystem. However, this factor has not proved to

be determinant in the final result of the AN number when compared to the other points (Points 1 and 4).

The nuclear abnormalities found in the analyzed erythrocytes are presented in Figure 3.

**FIGURE 3.** Images of the abnormalities found in blood erythrocytes of *Danio rerio* subjected to water collected at the four points of the Ijuí River.



Caption: (A) Normal erythrocyte; (B) 1- Notched; 2 - Karyorrhexis; (C) 1 - Chromosome detachment - Micronuclei; (D) 1 - Vacuolated; 2 - Karyorrhexis; (E) 1 - Lobbed; (F) 1 - Lobbed; 2 - Blebbed; (G) 1 - Notched; 2 - Blebbed; (H) 1 - Chromosomal detachment - Micronuclei; 2 - Blebbed.

Source: Own construction, 2019.

Industrial and agricultural effluents usually have clastogenic substances in their composition, which cause chromosomal breakage and dysfunctions of the mitotic spindles, that results in the emergence of MN (THOMÉ, *et al.*, 2016). However, when applied to the Kruskal-Wallis test, the MN values of the four test points were not statistically different from the control group, indicating that the water pollution of the Ijuí river does not cause genetic alterations at the level of MN, which is characterized as a damage no longer repairable.

The average emergence of MN in the tests was one per 2500-2800 cells. According to THOMÉ *et al.*, (2016), values less than or equal to 1 MN per 1000 cells are reported as occurrence of endogenous origin of the organisms. The MN data were not statistically significant, yet, the occurrence of this alteration is an event that cannot be repaired, thus the events that precede the establishment of MN are evidenced in the AN values, as showed in figure 2.

The MN test is simple to apply and enables to detect the genotoxic effects caused by several factors to which organisms may be exposed in their habitats. However, MN can only be detected in extreme cases, when the repair system is unable to function. Lastly, the test detects damage from both clastogenic agents, responsible for chromosomal breaks, and aneugenic agents, that induce aneuploidy or abnormal chromosomal segregation (ANSARI *et al.*, 2011). Thus, the protocol has the potential to analyze events that precede the emergence of MN. However, it should be noted that compounds capable of interacting with DNA are not restricted exclusively to the effects of mutagenic substances, as there are genotoxic substances that, in addition to interacting with genetic material, also have the ability to interact with other cellular components, such as spindle fibers during cell division and cell enzymes, topoisomerase, for example, causing nuclear changes.

It is noteworthy the difference in the number of abnormalities between points 2 and 3, since they are located in the same municipality and have the shortest distance from each other in comparison with the other points. According to THOMÉ, *et al.*, (2016), rivers have a self-purification capacity, which means, when anthropic effluents are discharged, rivers and other watercourses have the ability to restore their natural characteristics in an attempt to promote self-purification.

Several characteristics may interfere in the self-purification of a river, including the average depth, watercourse speed, width and dissolved oxygen concentration. Furthermore, in a watercourse it is possible to have segmentation in the self-purification zones, that is, in the course there is the variation between clean waters, that precede the effluent discharge zone, and after this point, a new stretch of water recovery, where the introduction of dissolved oxygen into the aquatic ecosystem prevails, and soon after, the clean water zone arises again (VON SPERLING, 2005). Thus, it can be suggested that clastogenic substances present in point 2 are not being carried to the stretch of point 3.

Considering that several species of fish have fundamental importance for both human ingestion and food chains, they are widely used as bioindicators. Moreover, the fact that they respond very quickly to contamination exposure and similarly to mammals, even in small concentrations of toxic substances, makes the *zebrafish* an excellent laboratory model for the study of the clastogenic potential of effluents resulting from anthropic activities (THOMÉ, *et al.*, 2017).

## CONCLUSIONS

The anthropized water from the Ijuí River collected at all analyzed points show potential to induce clastogenic events in the zebrafish model. The collected data from cells with AN indicates that their values are higher than the index of cells with MN, suggesting that the cells have efficiency in the repair mechanism of these organisms faced with genotoxic substances.

## ACKNOWLEDGMENT

For CNPQ who provided resources to purchase aquariums.

For UFFS, which provided the structure and equipment to carry out the research.

## REFERENCES

- ALSABTI, K.; MERCALFE, C.D. Fish micronuclei for assensing genotoxicity in water. **Mutation research**, vol.343: 121-135.1995.
- ANSARI, R. A.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S.; RAISUDDIN, S. *In vivo* cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 74, p. 50-156, 2011.
- BARBAZUK, W.B.; KORF, I.; KADAVI, C.; HEYEN, J.; TATE, S.; WUN, E.; BEDELL, J.A.; MCPHERSON, J.D.; JOHNSON, S.L. **The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. Genome research**, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, 2000
- CARRASCO, K.R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S.; Assessment os the piscine micronuclei test in situ biological indicator of chemical contaminats effects. **Canad. Journ. of Fish. and Aquatic Scienc.** 47, p. 2123-2136, 1990.



CZAJA, K.; STRUCINSKI P.; KORCZ, W.; MINORCZYK, M.; HEMIK, A.; WIADROWSKA, B. Alternative toxicological methods for establishing residue definitions applied for dietary risk assessment of pesticides in the European Union. **Food and Chemical Toxicology**, 137, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111120>.

DEARFIELD, L.K.; CIMINO, N.C.; MAUER, I. VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.521, p.121-135, novembro 2002.

HAWKEY, A.B. GLAZER, L. DEAN, C. et al. Adult exposure to insecticides causes persistent behavioral and neurochemical alterations in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology** (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2019.106853>

KASPER, N.; BARCELOS, R.P.; MATTOS, M.; BARONI, S. Impact of anthropic activities on eukaryotic cells in cytotoxic test. **Ambiente & Água**. Vol. 13, nº 3, p. 1-10, 2018.

RAMIREZ, Andrea. **Análise de Células Metanucleadas de Alcoólicos Portadores de Carcinomas Orais**. [s. l.], 2000.

SEMA - Secretária do Meio Ambiente e Infraestrutura. **U090 - Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí**. Disponível em: <<https://www.sema.rs.gov.br/u090-bacia-hidrografica-do-rio-ijui>>. Acesso em: 15 de maio de 2019.

SPADOTTO, C.A. et al. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29p.

THOMÉ, Ralph Gruppi; SILVA, Priscyla Martins; SANTOS, Hélio Batista. Avaliação de genotoxicidade da água de um rio urbano utilizando estudo de células sanguíneas de Danio rerio. **Conexão Ciência (Online)**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 9–16, 2016.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. v. 1. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3º ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, v. 1. p 452, 2005.

#### 4. CONCLUSÃO

Todos os quatro pontos do Rio Ijuí mostram sinais de antropização, sem mata ciliar, presença de agricultura, agropecuária e área urbana.

As águas do Rio Ijuí, em todos os pontos analisados mostra potencial de indução de eventos clastogênicos em *zebrafish* (capítulo 3) e *Astyanax* (capítulo 1).

Os dados coletados de células com AN tanto em *zebrafish* e nos lambaris, concluímos que as células tiveram eficiência no mecanismo de reparo nesses organismos durante o curso da exposição.

Através dos resultados obtidos na análise histológica das brânquias dos lambaris, conclui-se, que os peixes expostos em todos os pontos apresentam alterações de grau moderado a severo em comparação com controle que sugere a presença de contaminantes estressores do epitélio branquial.

Consideramos que o estresse oxidativo é bom bioindicador, permite controle do ambiente e sinaliza presença de substâncias causadoras de desregulação celulares, o teste de estresse oxidativo, sobretudo, funciona como sinal de alerta de contaminação. Entretanto, acreditamos, que em nosso teste o período de exposição pode não ter sido suficiente na expressão de danos oxidativos no fígado dos lambaris submetidos ao teste ou o período de exposição a concentração de poluentes não foi suficiente para causar estresse.

Pode-se concluir que os peixes analisados estão em contato com xenobióticos que potencializam patologias de ordem significativa, com comprometimento da qualidade de vida desses indivíduos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 343, n. 2–3, p. 121–135, 1995.
- ALMEIDA, J. C. De. Avaliação do Índice de Qualidade da Água na Lagoa dos Patos. **Water Research**, v. 11, n. 3, p. 4, 2015.
- ALMROTH, B. C.; STURVE, J.; BERGLUND, Å.; FÖRLIN, L. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 2, p. 171–180, 2005.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ALVES, L. F. de S.; SARAVY, T. M.; BALDO, G. A. A.; GABRIEL, A. M. de A.; CAVICHIOLO, F. Determinação de padrão morfológico de brânquias de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 206–210, 2017.
- ALVES, Raul Santos. **Uso de peixe como bioindicador de poluição aquática do rio Catolé Grande, Bahia**. 68fl. 2017. UESB, Itapetinga, BA. 2017.
- AMEUR, W. B.; EL MEGDICHE, Y.; DE LAPUENTE, J.; BARHOUMI, B.; TRABELSI, S.; ENNACEUR, S.; CAMPS, L.; SERRET, J.; RAMOS-LÓPEZ, D.; GONZALEZ-LINARES, J.; TOUIL, S.; DRISS, M. R.; BORRÀS, M.. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. **Chemosphere**, v. 135, p. 67–74, 2015.
- ANSARI, R. A.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S.; RAISUDDIN, S. In vivo cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, , v. 74, n. 1, p. 150–156, 2011.
- ARSLAN, Ö. Ç.; BOYACIOĞLU, M.; PARLAK, H.; KATALAY, S.; KARAASLAN, M. A. Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliğa Bay Turkey. **Marine Pollution Bulletin**, v. 94, n. 1–2, p. 48–54,

2015.

AUGUSTYNIAK, E. et al. Validation of protein carbonyl measurement: A multi-centre study. **Redox Biology**, v. 4, p. 149–157, 2015.

AVILEZ, I. M. **Metabolismo antioxidativo, biotransformação hepática e alterações histológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, SPIX & AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE) exposto ao fenol**. 2008, p. 155. Tese (doutorado). Toxicologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, Rita de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish : proposal for a protocol to assess aquatic pollution . **J Fish Dis**. n. June 2016, p. 25–34, 2001.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205–213, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE AMBIENTAL E SAÚDE DO TRABALHADOR. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília DF. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio\\_nacional\\_vigilancia\\_populacoes\\_expostas\\_agrotoxicos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf)>. Acesso em 22 de novembro de 2019

BRASIL, MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO REGIONAL. Sistema Nacional de Informações sobre saneamento (SNIS), **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos** - 2016. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos>>. Acesso em 24 set. 2019.

BRITO, I. A. **Avaliação da qualidade da água de três reservatórios do rio paraíba do sul através de biomarcadores em *pimelodus maculatus* (siluriformes, pimelodidae) e *oligosarcus hepsetus* (characiformes, Characidae)**. 2010, p. 131. Dissertação. Ecologia e conservação. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BRITO, Luciana Tendolini. **Análise de brânquias de peixes expostos às águas de ambiente lêntico**. Trabalho de Conclusão de Curso, 2009. UNESP, Rio Claro/SP. p.

41, 2009.

BUSS, D. F. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 465–473, 2003.

CANTANHÊDE, S. M.; MEDEIROS, A. M.; FERREIRA, F. S.; FERREIRA, J. R. C.; ALVES, L. M. C.; CUTRIM, M. V. J.; SANTOS, D. M. S. Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís - MA. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 66, n. 2, p. 593–601, 2014.

CANTANHÊDE, S. M.; DA SILVA, G. C.; PEREIRA, N. J.; CAMPOS, J. S. De P.; DA SILVA, J.; TCHAICKA, L.; NETA, R. N. F. C.; TORRES, J. R. De S.; SANTOS, D. M. S. Evaluation of environmental quality of two estuaries in Ilha do Maranhão, Brazil, using histological and genotoxic biomarkers in *Centropomus undecimalis* (Pisces, Centropomidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 20, p. 21058–21069, 2016.

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.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; ABREU-SILVA, A. L. *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: An in situ study of an estuarine ecosystem (São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. SPEC. ISSUE, p. 11–17, 2010.

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v. 7, n. January, p. 37–42, 2009.

COLPO, E. **Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo em indivíduos suplementados com ferro e ácido ascórbico**. 2007. p. 68. Dissertação de mestrado, Santa Maria, PPGBT - UFSM, , 2007.

CONDESSA, S. S. **Toxicidade subcrônica em lambaris *Astyanax bimaculatus* exposto ao zinco**. 2009, p. 199. Dissertação. Biologia animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). Panorama do Agro. Publicado em Nov/2019. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro>. Acesso em: 10 de dezembro de 2019

CORT, C. C. W. D.; GHISI, N. de C. Uso de alterações morfológicas nucleares em *Astyanax spp.* para avaliação da contaminação aquática. **Mundo da Saude**, v. 38, n. 1, p. 31–39, 2014.

CUNHA, Marina Souza da. **Biogeografia histórica do lambari de ampla distribuição *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei: characidae) no sudeste brasileiro, com base em padrões de variação citogenéticos e moleculares**. 2014. 51f. Dissertação. Viçosa/MG, 2014.

DALA-CORTE, R. B.; AZEVEDO, M. A. Biologia reprodutiva de *Astyanax henseli* (Teleostei, Characidae) do curso superior do Rio dos Sinos, RS, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 100, n. 3, p. 259–266, 2010.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1–2, p. 23–38, 2003.

DALZUCHIO, T.; SIMÕES, L. A. R.; SANTOS DE SOUZA, M.; RODRIGUES, G. Z. P.; PETRY, I. E.; ANDRIGUETTI, N. B.; SILVA, G. J. H.; GEHLEN, G.; DA SILVA, L. B. Water quality parameters, biomarkers and metal bioaccumulation in native fish captured in the Ilha River, southern Brazil. **Chemosphere**, v. 189, p. 609–618, 2017.

DAR, S. A.; YOUSUF, A. R.; BALKHI, M. H.; GANAI, F. A.; BHAT, F. A. Assessment of endosulfan induced genotoxicity and mutagenicity manifested by oxidative stress pathways in freshwater cyprinid fish crucian carp (*Carassius carassius* L.). **Chemosphere**, v. 120, p. 273–283, 2015.

DE BRITO, P. S.; GUIMARÃES, E. C.; FERREIRA, B. R. A.; OTTONI, F. P.; PIORSKI, N. M. Freshwater fishes of the parque nacional dos lençóis maranhenses and adjacent area. **Biota Neotropica**, v. 19, n. 3, 2019.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios Brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1296–1301, 2014.

DISNER, G. R.; MIRANDA, M. V. da R. G. B. De. Avaliação da atividade mutagênica

do Roundup ® em *Astyanax altiparanae* ( Chordata , Actinopterygii ). **Evidência**, v. 11, n. 1, p. 33–42, 2011.

ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, n. 3, p. 418–425, 2000.

FAHEEM, M.; LONE, K. P. Oxidative stress and histopathologic biomarkers of exposure to bisphenol-A in the freshwater fish , *Ctenopharyngodon idella*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 1–9, 2017.

FARIA, Joana Cristina Neves de Menezes. **AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DOS EFEITOS DA TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA ROUNDUP® NAS BRÂNQUIAS E NO FÍGADO DO PEIXE *Poecilia vivipara***. 2009. 56f. Dissertação. Universidade Federal de Goiás. Goiania/GO, 2009.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 2000.

FERRARO, M. V. M. **AVALIAÇÃO DE TRÊS ESPÉCIES DE PEIXES – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, COMO POTENCIAIS BIOINDICADORES EM SISTEMAS HÍDRICOS ATRAVÉS DOS ENSAIOS: COMETA E DOS MICRONÚCLEOS**. 2009. p. 189, Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Genética, UFPR, 2009.

FIGUEREDO, A. B. **Aspectos sanitários do jundiá (*Rhamdia quelen*) na região litoral centro do estado de Santa Catarina, Brasil**. 2013, p.88. Dissertação. Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013

FILHO, M.S.; ANDREWS, E.; MOREIRA, L.; BARRETTO V.; MORAES B.; PRESSINOTTI, L. Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana. **Atas de saúde ambiental**. v. 2. n.1, 2014

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, p. 337–340, 2008.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. The use of biomarkers in aquatic toxicology studies. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v.7, n.1, p. 67-86, 2005.

FURNUS, G. N. A.; CAFFETTI, J. D.; GARCÍA, E. M.; BENÍTEZ, M. F.; PASTORI, M. C; FENOCCHIO, A. S. Baseline micronuclei and nuclear abnormalities frequencies in

native fishes from the Paraná River (Argentina). **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 1, p. 217–221, 2014.

GALVAN, Gabrieli Limberger. **Avaliação Genotóxica de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino e pesquisa utilizando como bioindicador o peixe *Astyanax altiparanae* (CHARACIDAE)**. 2011. 102f. Dissertação.UFPR. Curitiba/PR. 2011

GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S. M.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 376–381, 2007.

GARCIA-SANTOS, S.; FONTAÍNHAS-FERNANDES A.; WILSON J.M. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: Assessment of some ionoregulatory parameters. **Environmental Toxicology** 21:33-46, 2006.

GARCIA, L. De O.; OKAMOTO, M. H.; RIFFEL, A. P. K.; SACCOL, E. M.; PAVANATO, M. A.; SAMPAIO, L. A. N. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold and heat shocks. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, 2015.

GOLDONI, A.; SILVA, L. B. Potencial mutagênico do fungicida mancozebe em *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae). **Biosci. J., Uberlândia**, v. 28, n. 2, p. 297-301, Mar./Apr. 2012.

GOUVEIA, N. Resíduos sólidos urbanos: Impactos socioambientais e perspectiva de manejo sustentável com inclusão social. **Ciencia e Saude Coletiva**. v.17. n.6. 1503–1510. 2012.

GROTTO, D.; VALENTINI, J.; BOEIRA, S.; PANIZ, C.; SANTA MARIA, L.; VICENTINI, J.; MORO, A.; CHARÃO, M.; GARCIA, S. C.; CARDOSO, S. G. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo - Malondialdeído. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 275–279, 2008.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 th. Oxford University Press, London, 2007. p. 896.

HAWKINS, C. L.; MORGAN, P. E.; DAVIES, M. J. Quantification of protein modification by oxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 8, p. 965–988, 2009.



HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis** v. 18, n. 2, p. 187-190 1973.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 123, n. 1, p. 61–118, 1983.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARYS, Ph; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 277–291, 1991.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. IN. STOREY K. **Functional metabolism: Regulation and Adaptation**. 1<sup>o</sup> ed. John Wiley & Sons. 2004. cap. 12 p. 616.

HOOFTMAN, R. N.; DE RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research Letters**, v. 104, n. 1–3, p. 147–152, 1982.

JÚNIOR, L. R.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 112–119, 2001.

KASPER, N. **Respostas histopatológicas e genotóxicas em peixes de água doce expostos a ambientes antropizados**. 2019. 91f. Dissertação. UFFS, Cerro Largo/RS, 2019.

LAALE, H. W. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. **Journal of Fish Biology**, v. 10, n. 2, p. 121–173, 1977.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1–4, p. 1–20, 2007.

LEÓN, G.; PÉREZ, L. E.; LINARES, J. C.; HARTMANN, A.; QUINTAN A, M. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 630, n. 1–2, p. 42–49, 2007.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays

for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, n. C, p. 346–357, 1994.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. Da S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient**, v. 8, n. 4, p. 469–484, 2010.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. De. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.

MACHADO, M. R.; FANTA, E. Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 3, p. 361–372, 2003.

MATOZO, F.; TUREK, J. A.; BUENONOLETO, R. Avaliação dos efeitos genotóxicos do fungicida ridomil em *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Luminária**, v. 17, n. 1, p. 121–131, 2015.

MATSUMOTO, F. E.; CÓLUS, I. M. S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 489–492, 2000.

MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148–158, 2006.

MATTER, B.; SCHMID, W. Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 12, n. 4, p. 417–425, 1971.

MEIRELES, J. R.; LOPES, M. A.; ALVES, N. N.; CERQUEIRA, E. M. M. Apoptose em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 337–343, 2006.

MELETTI, Paulo Cesar. **Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes**. 2003. 231f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia

de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003a.

MELETTI, P. C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C. B. dos R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: ESPÍNDOLA, Evaldo Luis Gaeta; BRIGANTE; Janete. Limnologia fluvial: um estudo no rio mogi-guaçu. 2003b. Cap. 9. p. 149-180.

MENEZES, C. C.; LEITEMPERGER, J.; TONI, C.; SANTI, A.; LÓPES, T.; BARBOSA, N. B. V.; NETO, J. R.; LORO, V. L. Comparative study on effects of dietary with diphenyl diselenide on oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*) and silver catfish (*Rhamdia* sp.) exposed to herbicide clomazone. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 706–714, 2013.

MENEZES, C. C.; RUIZ-JARABO, I.; MARTOS-SITCHA, J. A.; LEITEMPERGER, J.; BALDISSEROTTO, B.; MANCERA, J. M.; ROSEMBERG, D. B.; LORO, V. L. Diet with diphenyl diselenide mitigates quinclorac toxicity in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–16, 2014.

MENEZES, C. C.; LEITEMPERGER, J. SANTI, A.; LÓPES, T.; VEIVERBERG, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.; VARGAS B. N. B.; LORO, V. L. The effects of diphenyl diselenide on oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to herbicide quinclorac (Facet®). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 81, p. 91–97, 2012.

MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. Vigilancia y control de la calidad de agua para consumo humano. **Agroecol. e Desenvol. Rur. Sustent. Porto Alegre**, v. 3, n. 4, p. 1–5, 2002.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 294–299, 2010.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 149, n. 1, p. 40–49, 2009.

MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus*

(Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 7, p. 1855–1867, 2003.

MORAES, Fernanda Dias de. **Respostas bioquímicas, genotóxicas, fisiológicas e histológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, Spix; Agassiz 1829) exposto à cipermetrina (Galgotrin®)**. 2013. 142f. Tese (Doutorado) -- UFSCar. São Carlos/SP, 2013.

MORAIS, C. R.; CARVALHO, S. M.; ARAUJO, G. R.; SOUTO, H. N.; BONETTI, A. M.; MORELLI, S.; CAMPOS JÚNIOR, E. O. Assessment of water quality and genotoxic impact by toxic metals in *Geophagus brasiliensis*. **Chemosphere**, v. 152, p. 328–334, 2016.

MOREIRA, J. C.; PERES, F.; SIMÕES, A. C.; PIGNATI, W. A.; DORES, E. de C.; VIEIRA, S. N.; STRÜSSMANN, C.; MOTT, T. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do mato Grosso. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1557–1568, 2012.

MOREIRA, T. N.; NUNES, A.; LEAL, U. H.; LEMOS, C. T. Influência dos Métodos de Captura de Peixes na Avaliação Genotóxica Utilizando Diferentes Tecidos de *Astyanax fasciatus* (Osteichthyes, Characidae). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2010.

MOTA, C.; ALMEIDA, M. M. de; ALENCAR, V. C. de; CURI, W. F. Características E Impactos Ambientais Causados Pelos Resíduos Sólidos : Uma Visão Conceitual. I **Congresso Internacional de Meio Ambiente Subterrâneo**, n. 83, p. 1–15, 2009.

NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J. A.; RESGALLA, J. J. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. Pesticidas: **Rev. Ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v. 17, p. 117-122, 2007.

NEPOMUCENO, L. L.; FERREIRA, J. L.; CRUZ, V. de S.; GABRIEL, G. H.; ARAÚJO, E. G. de. Mecanismos de reparo aos danos no dna nos pontos de checagem do ciclo celular. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 25, p. 530–543, 2017

NEVES, M. P. **Biomarcadores histológicos em um peixe loricarideo (*ancistrus mullerae*): relação entre uso antrópico do solo no entorno de riachos neotropicais e histopatologias mais severas**. 2016, p. 54. Conservação e manejo de recursos naturais. Dissertação. Universidade estadual do Oeste do Paraná. Cascavel-PR, 2016.

- NOGUEIRA, D. J.; CASTRO, S. C. De; SÁ, O. R. de. Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski,2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas MG. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 11, n. 3, p. 227–232, 2009.
- OAKES, K. D.; VAN DER KRAAK, G. J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 447–463, 2003.
- OBIAKOR, M. O.; OKONKWO, J. C.; EZEONYEJIAKU, C. D. Genotoxicity of freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 775–776, p. 20–30, 2014.
- OLIVEIRA, D. G. S. **Toxicidade em peixes submetidos à fração solúvel de biodiesel de óleo de soja queimado**. 2013. 80 f. Tese de doutorado, Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG, 2013.
- OROPESA, A. L.; GARCÍA-CAMBERO, J. P.; SOLER, F. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 30–38, 2009.
- PANE, Eric F.; HAQUE, Aziz; WOOD, Chris M. Mechanistic analysis of acute, Ni-induced respiratory toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): An exclusively branchial phenomenon. **Aquatic Toxicology**, v. 69, n. 1, p. 11–24, 2004.
- PEAKALL, D. B. The role of biomarkers in environmental assessment. Introduction **Ecotoxicology**, v. 3, n. 3, p. 157–160, 1994.
- PEREIRA, Bruno Fiorelini. **Análise dos efeitos da exposição a ambientes poluídos na morfologia e no envelhecimento precoce , de brânquias e fígado em peixes**. 2014. 117f. Dissertação. UNESP. Rio Claro/SP.2014
- PIANCINI, Laercio Dante Stein. **Biomonitoramento do Rio Iguaçu em dois pontos utilizando como bioindicador peixes do gênero *Astyanax*. (Characiforme, Characidae)**. 2008. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso. UFPR, Curitiba/PR, 2008.
- PINTO, Y, R. **Ecotoxicidade do cobre e possíveis biomarcadores no reservatório guarapiranga**. 2016, p. 102. Tese (doutorado). Biologia celular e tecidual. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and

chronic effects of pollution. **Oxford: Fishing News Books**, v. cap. 30, n. IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish, p. Pp.339-352, 1994.

RADOLL, Geni Portela. **Avaliação da genotoxicidade em efluentes líquidos da indústria frigorífica**. 2013. 108f. Dissertação. UTFPR, Curitiba/PR. 2013.

RAMIREZ, Andréa. **Análise de células metanucleadas de alcoólicos portadores de carcinomas orais**. 2000. 56f. Dissertação. USP. São Paulo/SP, 2000.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12–47, 2016.

REZENDE, K. F. O. **Alterações morfológicas de Tilápia do Nílo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) expostas às águas da Represa Billings**. 2011, p. 62. Dissertação. Ciências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

RIBAS, L.; PIFERRER, F. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, n. 4, p. 209–240, 2014.

SANTOS, Naiara de Oliveira dos. **Depuração acelerada de rios poluídos usando peróxido de hidrogênio**. 2015.163f. Dissertação. PUC-Rio. Rio de Janeiro/RJ.2015

SANTOS, Debora Martins Silva. **Qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de Itapecuru mirim, Maranhão**. 2010, 96f. Tese. UNESP. Jaboticabal/SP. 2010.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 1, p. 9–15, 1975.

SHIOGIRI, N. S.; PAULINO, M. G.; CARRASCHI, S. P.; BARALDI, F. G.; CRUZ, C.; FERNANDES, M. N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 34, p. 388-396, 2012.

SILVA, A. D. C.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e extensão do UNIPAM**, v. 1, p. 167–179, 2010.

- SILVA, Andressa das Graças. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática**. 2004. 80f. Dissertação. UEL, Londrina/PR, 2004.
- SILVA, M. R. L. R. da. Avaliação da toxicidade celular do herbicida glifosato em *Astyanax spp.* **Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 62–69, 2014..
- SIMONATO, Juliana Delatim. **Biomarcadores Funcionais e Histológicos Associados à Exposição do Peixe *Prochilodus lineatus* ao Óleo Diesel**. 2006. 68f. Dissertação. UEL, Londrina/PR, 2006
- SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 1, p. 112–120, 2007.
- SOUTO, R.I.; BORGES, F. R.; CUNHA, D. M. da C.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; CRUZ, A. D. da. O teste de micronúcleo como ferramenta qualitativa de dano genético: aspectos citotécnicos. **Estudos Goiânia**, v. 35, n. 1/2, p. 171–178, 2008.
- SOUZA, A. C. G.; LUCHESE, C.; SANTOS NETO, J. S.; NOGUEIRA, C. W. Antioxidant effect of a novel class of telluroacetilene compounds: Studies in vitro and in vivo. **Life Sciences**, v. 84, n. 11–12, p. 351–357, 2009.
- TEIXEIRA, C. A.; PORTO, R. L. L. Avaliação da qualidade da água e autodepuração dos rios da bacia do rio Piracicaba. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, v. 16, p. 20–31, 2008.
- TEIXEIRA, T. K. S. S. et al. Comparative cytogenetics of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from the upper Paraguay basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. March, p. 1–8, 2018.
- THOMÉ, R. G.; SILVA, P. M.; SANTOS, H. B. Avaliação de genotoxicidade da água de um rio urbano utilizando estudo de células sanguíneas de *Danio rerio*. **Conexão Ciência (Online)**, v. 11, n. 2, p. 9–16, 2016. b.
- VILCHES, M. **Análise genotóxica do rio cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores**. 2009. 71f. Dissertação. Feevale. Novo Hamburgo/RS. 2009.
- VIRGENS, A. C. Das; CASTRO, R. L.; CRUZ, Z. M. A. Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenconazol e Sulfluramida §. **Natureza on line**, v. 13, p. 26–31, 2015.

## 6. APÊNDICES

**FIGURA 1:** Ponto 1 localizado no município de Santo Ângelo.



Fonte: Acervo pessoal.



**FIGURA 2.** Ponto 2 localizado no município de Cerro Largo.



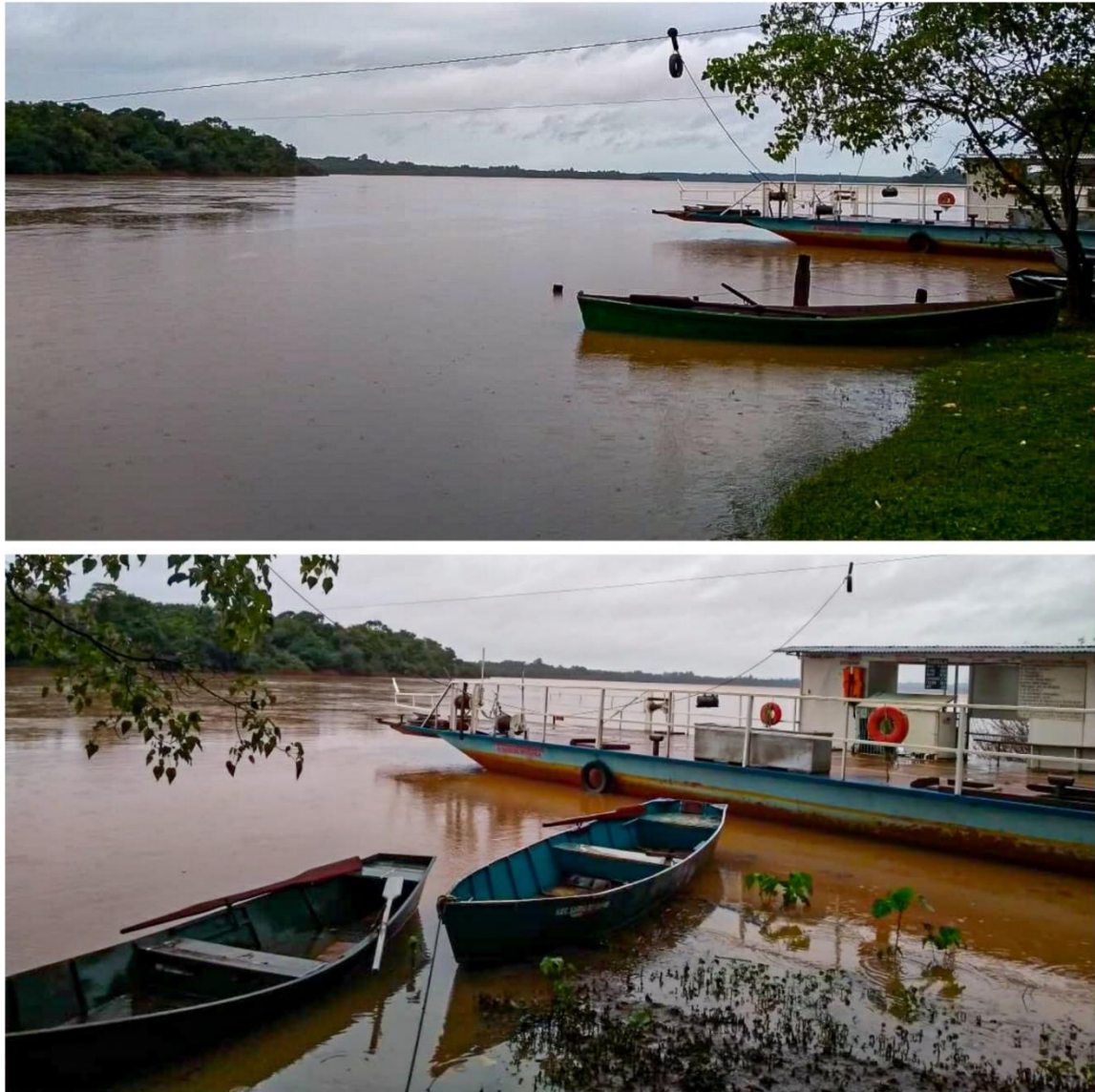
Fonte: Acervo pessoal.

**FIGURA 3.** Ponto 3 localizado no município de Cerro Largo.



Fonte: Acervo pessoal

**FIGURA 4.** Ponto 4 localizado no município de Roque Gonzales.



Fonte: Acervo pessoal.

FIGURA 5 - Ficha de coletas de dados a campo

FICHA DE COLETAS DE DADOS A CAMPO					
DATA / /		PERÍODO <input type="checkbox"/> CHUVOSO <input type="checkbox"/> NÃO CHUVOSO		PONTO	
COORDENADAS GEOGRÁFICAS – Latitude _____ longitude _____				<input type="checkbox"/> 1 – Santo Ângelo <input type="checkbox"/> 2 – Cerro Largo Rio <input type="checkbox"/> 3 – Cerro largo Barragem <input type="checkbox"/> 4 - Foz	
DADOS DO MULTIPARÂMETRO					
pH		CONDUTIVIDADE		OXIGÊNIO DISSOLVIDO (OD - mg/l )	
TEMPERATURA DA ÁGUA		TEMPERATURA AMBIENTE		PROFUNDIDADE NA MARGEM DO RIO:	
FLUXO DA ÁGUA		DISCO DE SECCHI		LARGURA DO RIO	
CONDIÇÕES DE ANTROPIZAÇÃO <input type="checkbox"/> BAIXA <input type="checkbox"/> MÉDIA <input type="checkbox"/> ALTA		PRESENÇA DE CHUVA NOS ÚLTIMOS 2 DIAS? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO – INTENSIDADE <input type="checkbox"/> - 20mm <input type="checkbox"/> de 21 à 50mm <input type="checkbox"/> de 50 à 100 mm <input type="checkbox"/> +100mm			
OBSERVAÇÕES					
PEIXES					
Nº	CÓDIGO PEIXE	MEDIDA (cm)	PESO (g)	ORIGEM	GÊNERO
1				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
2				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
3				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
4				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
5				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
6				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
7				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
8				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
9				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
10				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
11				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
12				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
13				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
14				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO
15				<input type="checkbox"/> CONTROLE <input type="checkbox"/> GAIOLA <input type="checkbox"/> AQUÁRIO	<input type="checkbox"/> ASTYANAX <input type="checkbox"/> DANIO

**APÊNDICE 6 - NORMAS DA REVISTA AMBIAGUA, ONDE SUBMETEMOS O  
CAPÍTULO 3 PARA PUBLICAÇÃO.  
ISSN 1980-993X versão on-line**

**INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

Forma e preparação dos manuscritos

Envio de manuscritos

**Forma e preparação dos manuscritos**

I - Os manuscritos submetidos devem ser originais, destinados exclusivamente à Ambi-Agua (Revista Ambiente e Revista Interdisciplinar de Ciências Aplicadas).

II - A partir de janeiro de 2017, somente serão aceitas inscrições em inglês. Todas as submissões devem ser via sistema, após ler atentamente todas as instruções e registrar-se em: <https://mc04.manuscriptcentral.com/ambiagua-scielo>

III - Os manuscritos direcionados a esta revista serão avaliados pelo Comitê Editorial e Revisores por Pares, de acordo com a sua especialidade, seguindo os seguintes critérios:

- a) Interesse científico internacional;
- b) conteúdo técnico científico;
- c) relevância científica;
- d) Clareza e qualidade do texto;
- e) Qualidade e adequação do conteúdo teórico.

Por favor, esteja ciente de que será considerado não ético retirar uma submissão antes da decisão final do Comitê Editorial.

IV - Em cada edição, o Comitê Editorial selecionará, dentre os manuscritos favoráveis, aqueles que serão publicados com base nos critérios acima. Não há compromisso com a sequência de envio ou o tempo para uma decisão editorial. Isso depende da resposta do revisor e do autor e também das tarefas e limitações de administração.

**Formatação do texto:**

O manuscrito deve ser submetido em formato de texto (MS Office), sem restrição de senha para permitir a edição. A publicação final será em pdf, epub, html e xml. O manuscrito deve ser submetido com as seguintes características:

**Idioma:** Bom Inglês (Americano ou Britânico)

**amanho da página :** equivalente ao tamanho da folha A4 (210 x 297 mm);

**Margens (superior, inferior, esquerda e direita) :** 2,5 cm;

**Tipo de fonte :** Times New Roman, 12, espaço único entre linhas, em uma única coluna, parágrafos alinhados à esquerda e à direita;

**Tamanho do manuscrito:** o mais importante na avaliação é a qualidade e contribuição científica da submissão. Normalmente, espera-se que um manuscrito tenha no máximo 10 páginas, incluindo tabelas e figuras (máximo de cinco no total). Manuscritos mais longos são aceitos, no entanto, páginas adicionais serão cobradas, contadas após o manuscrito ter sido aceito para publicação e layout prontos. Todos os manuscritos também devem ter uma versão em português do título, resumo e palavras-chave.

**Primeira página:** deve conter apenas o título do manuscrito, sem o nome dos autores, afiliação institucional ou e-mail, seguido de resumo e palavras-chave, separados por “dois pontos” e um período no final.

**Tabelas e Figuras:** devem ser numeradas com números arábicos consecutivos, citados no texto imediatamente antes de aparecer no manuscrito (primeira letra em maiúscula). Portanto, eles devem aparecer no texto exatamente como o formato final dos artigos publicados (verifique os artigos publicados anteriormente).

A legenda das figuras deve aparecer na parte inferior com a primeira letra maiúscula, um espaço de um caractere, seguido pelo número do pedido, um ponto (um ponto) e um espaço (por exemplo, **Figura 1.** O solo seco...). Os títulos das tabelas devem aparecer acima e precedidos pela palavra tabela (observe a primeira letra maiúscula), um espaço, ordem numérica, um ponto e espaço de um caractere (por exemplo, **tabela 1.** Concentrações de poluentes ....). Sempre que figuras e tabelas tiverem uma fonte de referência, a palavra "Fonte:" deverá aparecer na parte inferior, seguida pela referência da fonte. Os textos de tabelas, figuras e fontes sempre terminam com ponto (um ponto).

As figuras podem ser coloridas, com boas resoluções (300 dpi), no entanto, os autores devem explorar todas as possibilidades para reduzir o tamanho da memória do manuscrito, mas preservando a qualidade das figuras. Você pode inserir imagens no artigo sem aumentar o tamanho do arquivo, basta seguir as dicas abaixo: Use arquivos de imagem nos formatos JPG, PNG ou GIF. Esses arquivos geralmente têm bons padrões de qualidade e não consomem muito espaço em disco e memória; para inserir as figuras no texto, não use Copiar / Colar (ou Ctrl + C / Ctrl + V); Salve as imagens no seu computador que você deseja inserir no documento;

Em seguida, vá para a opção de menu disponível para inserção da imagem do seu editor de texto (por exemplo, no MSWord, selecione Inserir / Imagem / Do arquivo) e localize a imagem que deseja inserir no documento. Por fim, insira a imagem selecionada no texto.

Essas dicas serão úteis para que o manuscrito seja enviado com sucesso. É essencial que as tabelas sejam em formato de texto, não como uma figura ou imagem. Verifique se eles podem ser editados. Verifique se as colunas foram editadas como colunas e não separadas por espaço ou tabulação. Todas as colunas devem ter um título. Envie uma cópia adicional das tabelas no Excel. As figuras devem ter textos legíveis, usando letras maiúsculas / minúsculas, conforme apropriado e com alta resolução. Não use títulos na parte superior. Certifique-se de que eles permitam edições.

**Estrutura dos manuscritos** : os manuscritos em INGLÊS devem ter a seguinte sequência: TITLE em inglês, seguido de um RESUMO (seguido de três palavras-chave, em ordem alfabética, que não replicam as palavras do título ou aparecem no resumo);

Título do manuscrito em português; Resumo em português (seguido de palavras-chave, em ordem alfabética, em português); 1. INTRODUÇÃO (incluindo revisão de literatura);

2. MATERIAIS E MÉTODOS; 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO; 4. CONCLUSÕES; 5. AGRADECIMENTOS (se for o caso, inclua apenas o reconhecimento às agências financiadoras, incluindo o número da doação); e 6. REFERÊNCIAS (utilize referências de

periódicos de alto impacto, não utilize simpósios, teses e dissertações, a menos que sejam absolutamente essenciais e em número limitado). Veja o "Formulário de Avaliação" ([http://www.ambiagua.net/seer/files/review\\_form.doc](http://www.ambiagua.net/seer/files/review_form.doc)) para verificar o conteúdo esperado de cada seção. Verifique os artigos já publicados para ver quais textos devem estar em negrito.

## UNIDADES

**Medir unidades:** use unidades internacionais com um espaço após o número (por exemplo, 10 km h<sup>-1</sup>, não km / h, verifique a consistência do texto), exceto% (por exemplo, 10%) e grau (por exemplo, °C).

Verifique com cuidado todos os caracteres e figuras gregos. Soletre os números de um a nove, exceto quando usados em unidades.

Deixe um espaço único entre as unidades: g L<sup>-1</sup>, e não gL<sup>-1</sup>, nem gL - 1. Use o sistema de tempo de 24 horas, com quatro dígitos por horas e minutos: 09h00; 18h30.

## Títulos (RESUMO, 1. INTRODUÇÃO, 2. MATERIAIS E MÉTODOS, etc.):

Use letras maiúsculas, 14, negrito, alinhadas à esquerda.

**Legendas** : se necessário, serão escritas com letras maiúsculas iniciais, precedidas de dois números arábicos, separadas e seguidas de um ponto 12, negrito, alinhado à esquerda.

**Resumo** : deve conter objetivos, metodologia, resultados e conclusões, deve ser composto por uma sequência de frases em um único parágrafo com no máximo 250 palavras.

**Citações** : No texto, as citações devem seguir as recomendações da ABNT-NBR 10520 com as seguintes especificidades: Sobrenome do autor mencionado apenas com a primeira letra maiúscula, seguido do ano entre parênteses, quando o autor faz parte do texto. Quando o autor não faz parte do texto, entre parênteses, coloque o sobrenome, seguido pelo ano, separado por vírgula. Quando houver mais de um autor, seus sobrenomes serão separados por "e".

As referências citadas devem ser preferencialmente publicadas recentemente na base SciELO ( [www.scielo.br](http://www.scielo.br) ou [www.scielo.org](http://www.scielo.org) ) ou em periódicos internacionais de alto impacto. De preferência, não cite mais de 15 referências.

**Equações** : Gráficos e figuras originados no MS Excel devem ser inseridos como objetos que podem ser editados. O mesmo para as Equações (use o editor de Equações, de preferência usando o MS Word 2010 ou mais recente ou use o MathType) que deve ser inserido como objeto, não como imagem e numerado (parênteses).

Os autores devem expressar as equações da maneira mais simples possível. Eles devem incluir apenas as equações necessárias, para que um leitor comum possa entender a base técnica do manuscrito. Os manuscritos não devem ter notação matemática excessiva.

**Nota importante para os manuscritos em inglês:** todos os manuscritos escritos devem ser enviados em inglês. Os autores que não têm o inglês como primeira língua devem ter seus manuscritos revisados por um profissional com bom conhecimento de inglês para revisar o texto (vocabulário, gramática e sintaxe). As submissões podem ser rejeitadas com base na inadequação do texto sem exame de seu mérito científico.

**Exemplos de como citar referências no texto:** Jones (2015), Jones e Smith (2009) ou (Jones, 2015; Jones e Smith, 2009), dependendo da construção da frase. Mais de dois autores: Jones et al. (2014) ou (Jones et al., 2014). Comunicações pessoais ou referência não publicada não devem ser incluídas na lista de referências, mas no texto, entre parênteses (Jones, comunicação pessoal, 2015).

**Lista de Referências** : Deve seguir as recomendações da ABNTNBR 6023, aqui exemplificadas:

### Livros

:

FALKNER, E. **Mapeamento Aéreo** : métodos e aplicações. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. 322 p. Observe que a cidade e o editor da publicação são importantes!

### **Capítulos de livros :**

WEBB, H. Criação de modelos digitais de terreno usando fotogrametria analítica e seu uso em engenharia civil. In: **Modelagem de terrenos em topografia e engenharia civil** . Nova York: McGraw-Hill, 1991. p. 73-84.

### **Revistas científicas :**

MEYER, MP Local de fotografia aérea de pequeno formato em pesquisas de recursos. **Journal of Forestry** , Washington, v. 80, n. 1, p. 15-17, 1982.

**Manuscritos apresentados em eventos (Artigo impresso)** – Essas referências devem ser evitadas, mas se essenciais:

DAVIDSON, JM; RIZZO, DM; GARBELOTTO, M .; TJOSVOLD, S .; SLAUGHTER, GW *Phytophthora ramorum* e morte súbita de carvalho na Califórnia: II Transmissão e sobrevivência. Em: SIMPÓSIO EM CARVALHOES DE CARVALHO: CARVALHOS NA PAISAGEM EM MUDANÇA DA CALIFÓRNIA, 5. 23-25 de outubro de 2001, San Diego, **Proceedings** ... Berkeley: USDA Forest Service, 2002. p. 741-749.

**Manuscritos apresentados em eventos (eletronicamente) - devem ser evitados, mas se essenciais:**

COOK, JD; FERDINAND, LD 2001. Fidelidade geométrica das imagens de Ikonos. In: CONVENÇÃO ANUAL DA SOCIEDADE AMERICANA DE FOTOGRAMETRIA E SENSORIO REMOTO, 23-27 de abril, St. Louis. **Proceedings...** St. Louis: ASPRS, 2001. 1 CD-ROM.

**Teses e dissertações - devem ser evitadas - antes citam os artigos obtidos em revistas científicas:**

AFFONSO, AG **Caracterização de fisionomias vegetais na Amazônia oriental através de videografia aerotransportada e imagens LANDSAT 7 ETM +** , 2003, 120f. Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2003.

**Sites na Internet (somente se absolutamente essenciais):**

Essas referências devem ser evitadas, mas essenciais ou se referem a um periódico publicado eletronicamente: WORLD WILD LIFE FUND. **Ecorregiões** . 2004. Disponível em:

<<http://www.worldwildlife.org/science/ecoregions.cfm>>. Acesso em março de 2016.

**Observe que todas as iniciais em nome do autor têm um espaço entre elas.**

### **DIRETRIZES PARA SUBMISSÃO**

O arquivo enviado (enviado) - o arquivo principal - **não deve conter nenhuma identificação dos autores**, portanto, sem o nome, afiliação ou e-mail dos autores.



As propriedades do arquivo que identifica o autor devem ser removidas. Dicas para fazer isso:

#### **Word 2010:**

Em Arquivo (arquivo morto), clique em **Informações, Verificando problemas, Inspeccionar documento** e, nessa janela, clique em **Propriedades do documento e informações pessoais, Fechar e Salvar**.

#### **Word 2003**

Abra a guia **Opções**, clique em **Segurança** e elimine a propriedade do arquivo. **Todo o conteúdo dos artigos é de exclusiva responsabilidade dos autores.** Cada edição publicada pela Ambi-Água apresenta uma imagem representativa de um artigo publicado nessa edição. Os autores são convidados a destacar na carta de apresentação que gostariam de ter uma figura específica a ser considerada como cientificamente interessante e visualmente atraente para a capa da revista. As imagens devem ter alta resolução (300 dpi) e 17 por 17 cm de tamanho. As imagens devem ser originais e os autores concedem à Ambi-Água a licença para publicar. Carregue a imagem como um arquivo suplementar adicional. O autor deve possuir os direitos autorais da imagem enviada.

De qualquer forma, os autores concedem à Revista Ambiente & Água a licença para usar qualquer imagem publicada do manuscrito para ser usada como capa da edição, a menos que expressamente indicado o contrário.

#### **Envio de manuscritos**

Antes de começar a enviar, prepare-se:

- 1) A versão final do manuscrito de acordo com as diretrizes do autor
- 2) O texto da carta de apresentação seguindo o modelo: <http://www.ambi-agua.net/seer/files/cover-letter.doc>.
- 3) A cópia digital do recibo do pagamento da taxa de inscrição descrita em: <http://www.ambi-agua.net/splash-seer/?access=fees>.
- 4) Uma lista de quatro Revisores (nome, email, experiência), de acordo com as instruções da Carta de Apresentação.
- 5) Faça login: <https://mc04.manuscriptcentral.com/ambiagua-scielo>. Inicie um novo envio, seguindo as instruções. Veja que a ajuda está disponível em um link no canto superior direito (Ajuda).

Lembre-se de que você não poderá concluir o envio sem todos os itens acima. Dúvidas? Escreva para [ambi.agua@gmail.com](mailto:ambi.agua@gmail.com) depois de ler cuidadosamente todas as instruções.

Todo o conteúdo da revista, exceto onde indicado de outra forma, está licenciado sob uma

**Instituto de Pesquisas Ambientais em Bacias Hidrográficas (IPABHi)  
Universidade de Taubaté / Agronomia, Estrada Mun. Dr. José Luis Cembranelli,  
5000**

**CEP: 12081-010, Taubaté, São Paulo, Brasil**

**Tel .: (+55 12) 3631-8004**

**Fax .: (+55 12) 3632-8956**

**[ambi.agua@gmail.com](mailto:ambi.agua@gmail.com)**