



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CARLOS EDUARDO DELFINO VIEIRA

**UMA ABORDAGEM INTEGRADA PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE
CONTAMINANTES AGRÍCOLAS EM PEIXES: TESTES *IN SITU* E EM
LABORATÓRIO, BIOACUMULAÇÃO E RESPOSTAS DE MÚLTIPLOS
BIOMARCADORES**

Londrina
2018



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARLOS EDUARDO DELFINO VIEIRA

**UMA ABORDAGEM INTEGRADA PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE
CONTAMINANTES AGRÍCOLAS EM PEIXES: TESTES *IN SITU* E EM
LABORATÓRIO, BIOACUMULAÇÃO E RESPOSTAS DE MÚLTIPLOS
BIOMARCADORES**

Londrina
2018

CARLOS EDUARDO DELFINO VIEIRA

**UMA ABORDAGEM INTEGRADA PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE
CONTAMINANTES AGRÍCOLAS EM PEIXES: TESTES *IN SITU* E EM
LABORATÓRIO, BIOACUMULAÇÃO E RESPOSTAS DE MÚLTIPLOS
BIOMARCADORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados).

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Vieira, Carlos Eduardo Delfino.

Uma abordagem integrada para avaliação dos efeitos de contaminantes agrícolas em epífitas: testes *in situ* e em laboratório, bioacumulação e respostas de múltiplos biomarcadores / Carlos Eduardo Delfino Vieira. - Londrina, 2018.
253 f. : il.

Orientador: Claudia Bueno dos Reis Martinez.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Biomarcadores - Tese. 2. Agrotóxicos - Tese. 3. Metais - Tese. 4. *Prochilodus lineatus* - Tese. I. Martinez, Claudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CARLOS EDUARDO DELFINO VIEIRA

**UMA ABORDAGEM INTEGRADA PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE
CONTAMINANTES AGRÍCOLAS EM PEIXES: TESTES *IN SITU* E EM
LABORATÓRIO, BIOACUMULAÇÃO E RESPOSTAS DE MÚLTIPLOS
BIOMARCADORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados).

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Marta Margarete Cestari
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
Universidade Regional de Blumenau – FURB

Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Paulo César Meletti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 16 de março de 2018.

Aos meus *pais* e minha avó *Margarida* que sempre torceu por mim e esteve presente em todos os meus ciclos de estudos, mas não no maior deles. Sei que lá de cima compartilha a felicidade desta conquista, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo agradeço a **Deus**, pelo dom da vida, da capacidade e perseverança. Por guiar meus passos, manter minha fé e me ajudar a superar todos os obstáculos!

Agradeço ao **Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGCB)** e à **Universidade Estadual de Londrina (UEL)**.

Aos órgãos financiadores e a **CAPES** pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

Ao **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Toxicologia Aquática (INCT-TA)** pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

Agradeço à Prof. Dra. **Cláudia Bueno dos Reis Martinez** pela excelente orientação, por todo apoio, preocupação, dedicação, compreensão e amizade. Pela prazerosa convivência no laboratório e por ser o exemplo profissional e de ser humano que eu deseje seguir. Faltam palavras para expressar toda a minha admiração e gratidão por todas as oportunidades a mim concedidas e por tudo que fizeste por mim, sempre me incentivando e me fazendo acreditar que tudo daria certo, quando em alguns momentos eu mesmo descreditava. Obrigado por sempre estar do meu lado nas decisões importantes que tive de tomar durante esse trajeto e pelos conselhos que levarei para a vida. Você me ajudou a crescer pessoal e profissionalmente e enxergar além das minhas perspectivas. Paraphrasing Isaac Newton *“se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”*. Foi um grande prazer ter sido seu aluno durante esses 6 anos!

Aos membros da banca examinadora, profa. Dra. **Marta Margarete Cestari**, prof. Dr. **Eduardo Alves de Almeida**, prof. Dr. **Halley Caixeta de Oliveira** e prof. Dr. **Paulo César Meletti**, pela disponibilidade em colaborar com o nosso trabalho.

À **Estação de Piscicultura da UEL** pelo fornecimento dos animais e ao **“Seu Jurandir”** por todo auxílio durante os experimentos.

À administração da **Fazenda Santa Guilhermina**, Arapongas (PR) pela autorização da realização dos experimentos *in situ* e ao funcionário Juvenal por todo apoio logístico durante a realização dos experimentos.

À Dra. **Patrícia Gomes Costa**, prof. Dr. **Adalto Bianchini** (ICB-FURG), Dra. **Sergiane Souza Caldas**; prof. Dr. **Edinei Gilberto Primel** (EQA-FURG), prof. Dra. **Cassiana Raimundo Montagner** e equipe (IQ – UNICAMP) pela colaboração indispensável nas análises químicas de agrotóxicos.

Ao técnico de laboratório Dr. **Wagner Ezequiel Risso** por todo apoio na realização das análises químicas de metais.

À Prof. Dra. **Juliana Delatim Simonato Rocha** por mais uma vez aceitar compor a banca avaliadora do meu exame de qualificação e pela prazerosa convivência no laboratório, pelos conselhos e ensinamentos e pela sempre prontidão em ajudar quando precisei de alguma coisa.

Ao Prof. Dr. **Paulo Meletti**, pelas sugestões, ensinamentos e por toda ajuda na padronização e realização dos testes comportamentais e auxílio com as análises histológicas.

Ao **Thiego** e ao **Matheus** pela ajuda indispensável em campo durante a fase inicial desse projeto. E as alunas de Iniciação Científica e IC-Júnior, **Duda, Hellen e Camila**, minhas “pupilas” no laboratório, que me deram uma ajuda imprescindível com a realização de algumas análises, com muita competência e responsabilidade.

À Dra. **Maria Rita Pérez** que é co-autora de parte dos resultados desta tese, por toda ajuda nos experimentos e análises de laboratório.

A todos os colegas e amigos do **Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA)**, em suas várias gerações: Angélica, Angélica Tronco, Bruna, Carol, Cássia, Débora, Déia, Jéssica, Khatya, Laís, Laura F., Laurinha, Lu, Mari, Millena, Nadjha, Natara, Thais e Tiago. Obrigado pela ótima convivência durante todos esses anos, pelas risadas, companhias nos congressos, companheirismo e principalmente pela ajuda fundamental em todos os experimentos, sem a qual este projeto não seria possível. Obrigado por manterem esse espírito cooperativo e harmonioso, que torna o LEFA um ambiente extremamente prazeroso e agradável para se trabalhar.

Aos colegas do Colegiado de Ciências Biológicas da UENP-CCP, em especial à **Lindi**, a **Manu** e a **Vivi**, pela amizade, apoio e incentivo.

Ao **Dhiego** (Digo), **Renata (Re)**, **Wilson** (Virso) e **Raul**, meus amigos-irmãos que fiz durante a vida acadêmica e que sempre estiveram do meu lado!

À **minha família**, o alicerce da minha vida. Obrigado por me apoiarem nas minhas decisões, pelo altruísmo, pelos valores transmitidos, pela liberdade de me deixarem voar e acima de tudo pelo amor incondicional. Obrigado por compreenderem minha ausência nestes últimos anos. Amo vocês!

A todos que de alguma forma, estiveram presente ao meu lado e contribuíram para a realização deste trabalho. Novamente, meu muito obrigado!

VIEIRA, Carlos Eduardo Delfino. **Uma abordagem integrada para avaliação dos efeitos de contaminantes agrícolas em peixes: testes *in situ* e em laboratório, bioacumulação e respostas de múltiplos biomarcadores.** 2018. 253p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

O intenso crescimento demográfico aliado à expansão mundial do mercado de produção agrícola, tem sido alvo de debates atuais acerca dos potenciais efeitos da contaminação agrícola, complexa e difusa, sobre o meio ambiente, em particular para os ecossistemas aquáticos. As abordagens atuais em Ecotoxicologia nem sempre representam a realidade ecológica, pois não incorporam as variáveis naturais de campo e a complexidade das misturas de contaminantes em concentrações flutuantes que podem interagir entre si e com outros fatores abióticos, resultando em efeitos tóxicos imprevisíveis. Neste contexto, nesta Tese buscou-se verificar como estes fatores em situações reais de exposição afetam as respostas bioquímicas, fisiológicas, genéticas, histológicas e comportamentais em juvenis do teleósteo dulcícola *Prochilodus lineatus*, que representa uma espécie de grande importância ecológica, econômica e comercial. Os peixes foram confinados *in situ* por um período de 120 dias em dois locais caracterizados por diferentes níveis de impacto antrópico em áreas agrícolas do Sul do Brasil. Os dois ambientes foram caracterizados quanto à presença de alguns agrotóxicos de uso atual (CUPs), organoclorados (OCPs) e metais, e adicionalmente, a bioacumulação destes compostos em diferentes órgãos dos peixes também foi verificada. O confinamento *in situ* ao longo de 120 dias à mistura de contaminantes em maior concentração no local experimental (EXP), manifestou nestes peixes, de maneira geral, prejuízos em sua homeostasia, como a ocorrência de danos oxidativos em proteínas (PCC) e lipídeos (LPO), quebras no DNA e a ocorrência de danos mutagênicos (micronúcleos), danos histológicos pontuais no fígado, brânquia e rim, alterações metabólicas relacionadas à resposta de estresse, desajustes osmoiônicos e diminuição do crescimento e da capacidade de resistência natatória ao longo do tempo de exposição, quando comparado aos animais confinados no local com menores concentrações de contaminantes (REF). Adicionalmente, os peixes confinados em EXP bioacumularam mais OCPs no fígado, com destaque para o endossulfan, e grande parte das respostas biológicas observadas podem estar relacionadas com o maior acúmulo destas substâncias reconhecidamente tóxicas no organismo. Os resultados de campo foram integrados em índices de biomarcadores e análises multivariadas e, em conjunto, demonstraram que os *endpoints* biológicos avaliados foram sensíveis e se correlacionaram bem com o nível de contaminação dos locais. Assim sendo, foi demonstrado de forma mais realista que misturas de contaminantes agrícolas podem afetar a qualidade dos ecossistemas aquáticos e diminuir o *fitness* de peixes expostos a estes xenobióticos, e por conseguinte, alterações em *endpoints* ecologicamente

relevantes, tais como o crescimento e capacidade natatória, podem afetar as populações naturais e o ecossistema. Na outra perspectiva desta Tese, foram realizados experimentos de laboratório para verificar a toxicidade isolada de inseticidas de crescente uso mundial, potenciais substitutos aos inseticidas organofosforados e carbamatos, em concentrações ambientalmente relevantes. Após 120 h de exposição ao neonicotinóide imidacloprid (IMI), *P. lineatus* apresentaram respostas adaptativas, como alterações em enzimas de biotransformação e defesa antioxidante, que foram responsáveis pela proteção de alguns órgãos, em concentrações mais elevadas, embora em outros, como a brânquia, rim e fígado o sistema de defesa celular não foi suficiente para prevenir a ocorrência de danos oxidativos (LPO e PCC). O potencial genotóxico do IMI foi evidenciado pela ocorrência de danos no DNA e de alterações eritrocíticas nucleares. Por último, a toxicidade do piretróide lambda-cialotrina (CL) para a mesma espécie também foi verificada, e diversos efeitos deletérios foram observados em diferentes órgãos do peixe, indicando que CL em 96 h de exposição foi capaz de desencadear respostas de estresse, danos oxidativos em brânquia e rim, neurotoxicidade, desajustes osmorregulatórios (alterações das ATPases branquiais com consequente hiponatremia e hipocalcemia) e danos no DNA. Através da utilização de abordagens variadas e de múltiplos biomarcadores, foi possível contribuir para o conhecimento das respostas biológicas desencadeadas por agrotóxicos em peixes, na presença destes contaminantes agrícolas. Em última análise, esta Tese mostrou que ambas as abordagens experimentais (campo e laboratório) demonstraram que os agrotóxicos são prejudiciais para peixes neotropicais e os biomarcadores mais sensíveis foram os biomarcadores de efeito (danos oxidativos e genéticos), constituindo promissoras ferramentas para monitoramento da qualidade ambiental em áreas agrícolas. O peixe *P. lineatus* pode ser considerado um excelente modelo biológico para futuros programas de biomonitoramento nestas regiões.

Palavras-chave: agrotóxicos, metais, biomonitoramento ativo, bioensaios, estresse oxidativo, danos no DNA, respostas de estresse, osmorregulação, histopatologia.

VIEIRA, Carlos Eduardo Delfino. **An integrated approach to assessing the effects of agricultural contaminants on fish: *in situ* and laboratory tests, bioaccumulation and responses of multi-biomarkers.** 2018. 253f. Ph.D Thesis (Biological Sciences) Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ABSTRACT

The intense population growth together with the large worldwide expansion of the agricultural production market has been the subject of ongoing discussions about the potential effects of complex and diffuse agricultural contamination on the environment, particularly for aquatic ecosystems. Current approaches in Ecotoxicology do not always represent ecological realism as they do not incorporate the natural field variables and the complexity of floating mixtures of contaminants that may interact with each other and with abiotic factors, resulting in unpredictable toxic effects. In this context, this thesis aimed to identify the influence of these factors on the biochemical, physiological, genetic, histological and behavioral responses in juveniles of the fish *Prochilodus lineatus*, which represents a species of great ecological, economic and commercial importance. The fish were confined *in situ* for a period of 120 days in two sites characterized by different levels of anthropic impact in agricultural areas of southern Brazil. The two environments were characterized for the presence of some current use pesticides (CUPs), organochlorines (OCPs) and metals, and additionally, the bioaccumulation of these compounds in different organs of the fish was evaluated. *In situ* confinement over 120 days to the mixture of contaminants in the highest concentration at the experimental site (EXP), these fish showed, in general, losses in their homeostasis, such as the occurrence of oxidative damage in proteins (PCC) and lipids (LPO), DNA breaks and the occurrence of mutagenic damages (micronuclei), focused histological damage in the liver, gill and kidney, metabolic changes related to stress response, osmotic disturbances and decrease in growth and swimming resistance over the time of exposure, when compared to animals confined in the place with lower concentrations of contaminants (REF). In addition, fish confined to EXP site bioaccumulated more OCPs in the liver, especially endosulfan, and much of the biological responses observed may be related to the increased accumulation of these substances known to be toxic to the organism. Field results were integrated into biomarkers indexes and multivariate analyzes and, together, demonstrated that the biological endpoints evaluated were sensitive and correlated well with the level of contamination of the sites. Thus, it has been shown more realistically that mixtures of agricultural contaminants can affect the quality of aquatic ecosystems and decrease the fitness of fish exposed to these xenobiotics, which therefore changes in ecologically relevant endpoints such as growth and swimming capacity, can affect the natural populations and thus the ecosystem. In the other perspective of this thesis, laboratory

experiments were carried out to verify the isolated toxicity of insecticides of increasing global use, potential substitutes for organophosphorus and carbamate insecticides, in environmentally relevant concentrations. After 120 h of exposure to the neonicotinoid imidacloprid (IMI), *P. lineatus* presented adaptive responses, such as alterations in biotransformation enzymes and antioxidant defense, which were responsible for the protection of some organs, in higher concentrations, although in others, such as gill, kidney and liver the cellular defense system was not sufficient to prevent the occurrence of oxidative damage (LPO and PCC). The genotoxic potential of IMI was evidenced by the occurrence of DNA damage and nuclear erythrocytic alterations. Finally, the toxicity of lambda-cyhalothrin (CL) pyrethroids for the same species was also verified, and several deleterious effects were observed in different fish organs, indicating that CL in 96 h of exposure was able to trigger stress responses, damage oxidative effects on gill and kidney, neurotoxicity, osmoregulatory disorders (changes in gill ATPases with consequent hyponatremia and hypocalcemia) and DNA damage. Despite the use of several approaches and multiple biomarkers, it was possible to contribute to the knowledge of the biological responses triggered by pesticides in fish, in the presence of these agricultural contaminants. Finally, this thesis showed that both experimental approaches (field and laboratory) showed that pesticides are harmful to neotropical fish, and the most sensitive biomarkers were the effect biomarkers (oxidative and genetic damage), constituting promising tools for monitoring environmental quality in agricultural areas. *P. lineatus* can be considered an excellent biological model for future biomonitoring programs in these regions.

Keywords: pesticides, metals, active biomonitoring, bioassays, oxidative stress, DNA damage, stress responses, osmoregulation, histopathology.

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

4-HNE	hidroxinonenal
2,4-D	ácido diclorofenoxiacético
AC	anidrase carbônica
ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
ADP	adenosina difosfato
AEN	alteração eritrocítica nuclear
Al	alumínio
ATP	adenosina trifosfato
BHT	hidroxitolueno butilado
BSA	albumina de soro bovino
BHC	hexaclorobenzeno
Ca²⁺	cálcio
CaATP	cálcio ATPase
CAT	catalase
CbE	carboxilesterase
CC	célula de cloreto
Cd	cádmio
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
Cl⁻	cloreto
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPV	célula pavimentosa
CRM	célula rica em mitocôndrias
Cu	cobre
CUPs	agrotóxicos de uso atual
DDD	diclorodifenildicloroetano
DDE	diclorodifenildicloroetileno
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DNPH	dinitrofenilhidrazina
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	espécie reativa de oxigênio
EROD	7-etoxiresorufina- <i>O</i> -desetilase
FC	fator de condição
GC-ECD	cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons
GCL	glutamato-cisteína ligase
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSSG	glutathione oxidada
GSH	glutathione reduzida
GST	glutathione S-transferase
H⁺	próton
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HA	bomba de prótons ou próton ATPase
Hb	hemoglobina
HCH	hexaclorocicloexano
HCO₃⁻	bicarbonato
HCl	ácido clorídrico
Hct	hematócrito
HE	hematoxilina e eosina
HHI	eixo hipotálamo-hipófise-interrenal
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HSC	eixo hipotálamo-simpático-cromafins
IAH	índice de alteração histológica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IHS	índice hepatossomático
IRB	Índice de Respostas de Biomarcadores
IRN	Índice de Resistência Natatória
K⁺	potássio
LC-ESI-MS/MS	cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas no modo tandem

LDH	lactato desidrogenase
LPO	lipoperoxidação
MDA	malondialdeído
Mg²⁺	magnésio
MgATP	magnésio ATPase
MN	micronúcleo
MT	metalotioneínas
Na⁺	sódio
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NDA	naftaleno dicarboxílico
Ni	níquel
NKA	bomba sódio-potássio
O₂^{·-}	radical superóxido
OCPs	pesticidas organoclorados
OH[·]	radical hidroxil
Pb	chumbo
PCA	análise de componentes principais
PCBs	bifelinas policloradas
PCC	proteínas carboniladas
PEP	fosfoenolpiruvato
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
Pi	fosfato inorgânico
PK	piruvato quinase
PON	paraoxonases
RBC	número de eritrócitos
SCGE	single cell gel electrophoresis
SOD	superóxido dismutase
SPE	extração em fase sólida
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico

TCA	ácido tricloroacético
TCMX	tetracloro-m-xileno
TNB	ânion tiolato
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidade
XOD	xantina oxidase
Zn	zinco
γ-HCH	gama-hexaclorociclohexano (lindano)
γ-GC	gama-glutamilcisteína

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 CRESCIMENTO POPULACIONAL E PRODUÇÃO DE ALIMENTOS	1
1.2 MISTURAS DE AGROTÓXICOS E OS DESAFIOS PARA A ECOTOXICOLOGIA.....	3
1.3 CONTAMINANTES AGRÍCOLAS NO AMBIENTE AQUÁTICO	6
1.4 EFEITOS DE AGROTÓXICOS EM COMUNIDADES E ECOSISTEMAS AQUÁTICOS.....	9
1.5 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA	12
1.5.1 Biomarcadores fisiológicos: respostas de estresse em peixes	14
1.5.2 Biomarcadores bioquímicos	24
1.5.2.1 Enzimas de biotransformação.....	24
1.5.2.2 Estresse oxidativo	27
1.5.3 Biomarcadores de danos no DNA.....	30
1.5.4 Biomarcadores de neurotoxicidade.....	32
1.5.5 Biomarcadores osmoiônicos.....	33
1.5.6 Biomarcadores histológicos.....	35
1.6 <i>Prochilodus lineatus</i> COMO MODELO BIOLÓGICO.....	38
1.7 JUSTIFICATIVA	40
1.8 OBJETIVOS	41
1.8.1 Objetivo geral.....	41
1.8.2 Objetivos específicos	41
1.9 REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO II – MANUSCRITO I.....	61
Uma abordagem integrada em Ecotoxicologia: ocorrência de agrotóxicos, bioacumulação e respostas de múltiplos biomarcadores em peixes submetidos a testes <i>in situ</i> em áreas agrícolas.....	62
2.1 INTRODUÇÃO	62
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	66
2.2.1 Área de estudo.....	66
2.2.2 Desenho experimental.....	67
2.2.3 Análises de OCPS em água superficial, sedimentos e biota	69
2.2.4 Análises de CUPs em amostras de água	70
2.2.5 Biomarcadores bioquímicos	71
2.2.7 Histopatologia de fígado.....	76
2.2.8 Análises estatísticas	77

2.3	RESULTADOS.....	78
2.3.1	Parâmetros físicos e químicos da água.....	78
2.3.2	Concentrações de agrotóxicos na água e sedimentos	79
2.3.3	Ocorrência e perfil de OCPs no fígado de <i>P. lineatus</i>	80
2.3.4	Biomarcadores bioquímicos	83
2.3.5	Biomarcadores genotóxicos.....	86
2.3.6	Histopatologia de fígado.....	88
2.3.7	Análises integradas	91
2.4	DISCUSSÃO	92
2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
2.6	REFERÊNCIAS.....	105

CAPÍTULO III – MANUSCRITO II..... 115

"Efeitos de multi-estressores em peixes expostos em áreas agrícolas: alterações no metabolismo, crescimento e performance natatória" 115

3.1	INTRODUÇÃO	116
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	119
3.2.1	Área de estudo.....	119
3.2.2	Delineamento experimental.....	120
3.2.3	Parâmetros hematológicos.....	121
3.2.4	Parâmetros metabólicos.....	122
3.2.5	Atividade da acetilcolinesterase	122
3.2.6	Índices somáticos e de condição	122
3.2.7	Resistência natatória	123
3.2.8	Análises estatísticas	124
3.3	RESULTADOS.....	125
3.3.1	Parâmetros hematológicos.....	125
3.3.2	Parâmetros metabólicos.....	127
3.3.3	Atividade da AChE.....	128
3.3.4	Índices somáticos e taxa de crescimento	129
3.3.5	Resistência Natatória.....	131
3.3.6	Análise de componentes principais.....	132
3.4	DISCUSSÃO	134
3.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	143
3.5	REFERÊNCIAS.....	143

CAPÍTULO IV – MANUSCRITO III	151
"Efeitos da exposição <i>in situ</i> em áreas agrícolas na osmorregulação e morfologia branquial e renal do teleósteo dulcícola <i>Prochilodus lineatus</i>"	151
4.1 INTRODUÇÃO	152
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	154
4.2.1 Área de estudo.....	154
4.2.2 Desenho experimental.....	155
4.2.3 Análises de metais em água superficial, sedimento e biota.....	156
4.2.5 Atividades enzimáticas.....	158
4.2.6 Análises histológicas	159
4.2.7 Análises estatísticas	160
4.3 RESULTADOS	160
4.3.1 Concentrações de metais na água e sedimentos	160
4.3.2 Caracterização de metais nos tecidos.....	163
4.3.3 Parâmetros osmo-iônicos	164
4.3.4 Enzimas envolvidas na osmorregulação	167
4.3.5 Análises histológicas	167
4.4 DISCUSSÃO	175
4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	188
4.6 REFERÊNCIAS.....	189
CAPÍTULO V – MANUSCRITO IV	200
"Efeitos agudos do piretroide lambda-cialotrina em parâmetros bioquímicos, genéticos e fisiológicos do teleósteo <i>Prochilodus lineatus</i>"	200
5.1 INTRODUÇÃO	201
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	203
5.2.1 Desenho Experimental.....	203
5.2.2 Biomarcadores fisiológicos	204
5.2.3 Biomarcadores bioquímicos	205
5.2.4 ATPases branquiais	208
5.2.5 Biomarcadores de genotoxicidade	209
5.2.6 Análises estatísticas	209
5.3 RESULTADOS	210
5.4 DISCUSSÃO	217
5.5 REFERÊNCIAS.....	225

CAPÍTULO VI - ARTIGO	236
"DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish <i>Prochilodus lineatus</i>"	236
CAPÍTULO VII- CONSIDERAÇÕES FINAIS	238
ANEXOS	243

APRESENTAÇÃO

A tese foi organizada de modo a atender às exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Primeiramente, é apresentada uma Introdução geral (**Capítulo I**) que contempla a contextualização do trabalho desenvolvido, sua justificativa e objetivos. Então, são apresentados os cinco capítulos que correspondem a cada manuscrito gerado na presente tese. Uma visão geral da estrutura da tese pode ser contemplada na Figura I.

Os Capítulos II, III e IV referem-se aos manuscritos referentes aos testes “*in situ*” com o peixe *Prochilodus lineatus* em áreas com diferentes níveis de contaminação ambiental. O **Capítulo II** refere-se ao manuscrito intitulado “**Uma abordagem integrada em Ecotoxicologia: ocorrência de agrotóxicos, bioacumulação e respostas de múltiplos biomarcadores em peixes submetidos a testes *in situ* em áreas agrícolas**” onde são apresentados os resultados de caracterização química dos ambientes, bioacumulação de organoclorados e respostas de múltiplos biomarcadores bioquímicos, genéticos e histológicos. O **Capítulo III** refere-se ao manuscrito intitulado “**Efeitos de multi-estressores em peixes expostos a áreas agrícolas: alterações no metabolismo, crescimento e performance natatória**” e aborda também um estudo de campo realizado com o peixe *P. lineatus*, que visa investigar os efeitos de multi-estressores, como os contaminantes químicos, em respostas adaptativas relacionadas ao estresse, tais como ajustes hematológicos e metabólicos e inter-relacionar estes parâmetros com *endpoints* em nível individual, como o taxa de crescimento e resistência natatória. O Capítulo IV, por sua vez, refere-se ao manuscrito intitulado “**Efeitos da exposição *in situ* em áreas agrícolas na osmorregulação e morfologia branquial e renal do teleósteo dulcícola *Prochilodus lineatus***” que investiga a ocorrência de metais nos ambientes investigados, a bioacumulação e os possíveis efeitos nas funções osmorregulatórias e morfologia de órgão-alvo para entrada (brânquia) e eliminação de xenobióticos (rim).

Os Capítulos V e VI referem-se aos testes de laboratório realizados com a mesma espécie de peixe para investigar os efeitos isolados de inseticidas de utilização mundial crescente. O **Capítulo V** refere-se ao manuscrito intitulado “**Efeitos agudos do piretroide lambda-cialotrina em parâmetros bioquímicos, genéticos e fisiológicos do teleósteo *Prochilodus lineatus***” e o **Capítulo VI** intitulado “**DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus***” encontra-se publicado no periódico *Chemosphere* (FI = 4,20) e por isso é inserido na sua forma integral como anexo desta tese.

Por fim, a tese é finalizada com as **considerações finais (Capítulo VII)**, nas quais são apresentados os comentários e conclusões gerais, sintetizando de forma integradora todos os resultados do trabalho, e evidências que precisavam ser unificadas para terem maior significado.

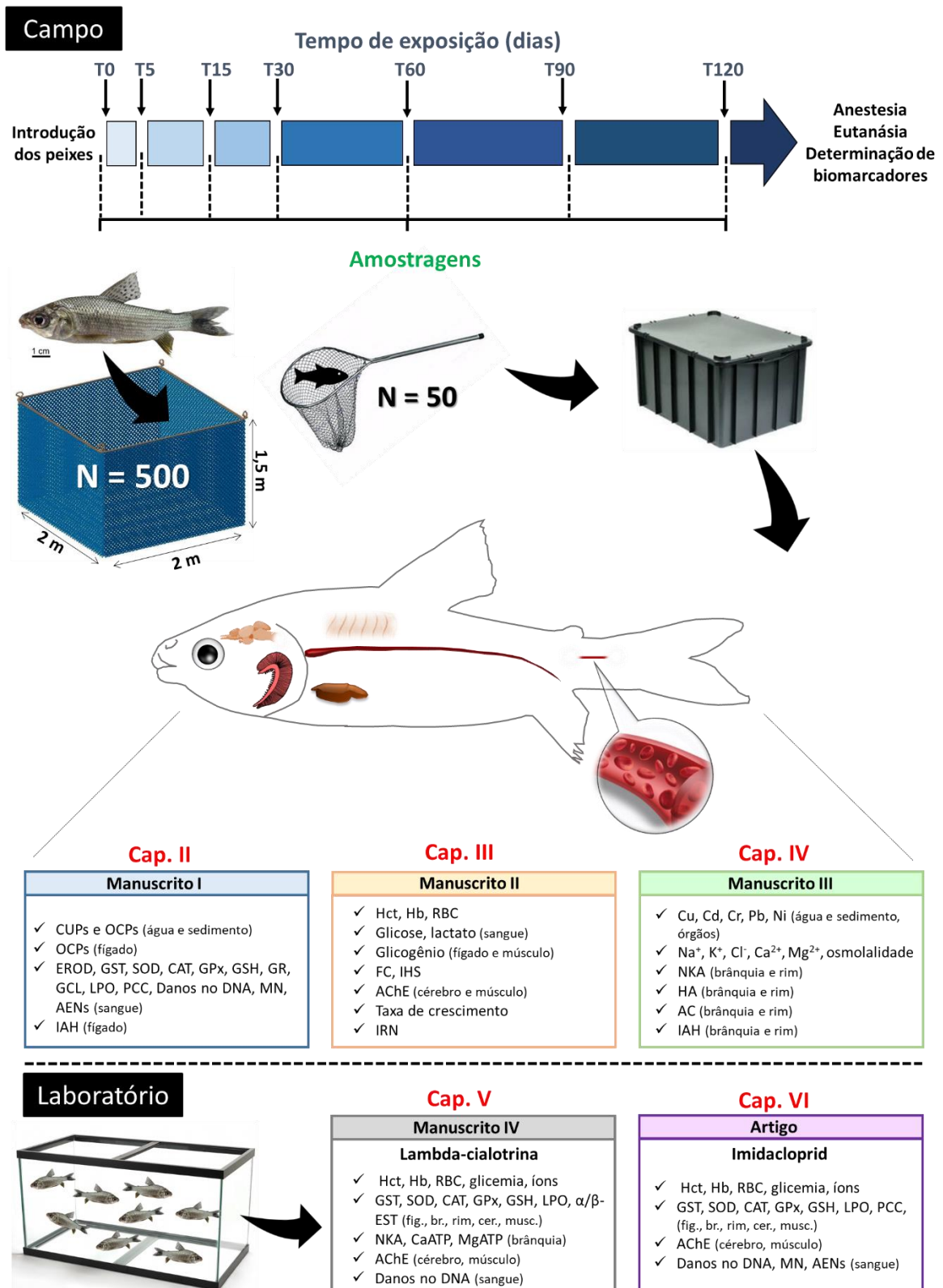
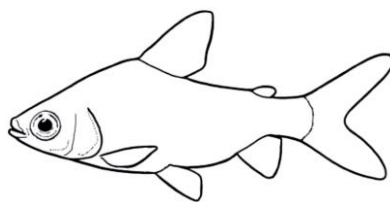


Figura I – Representação esquemática do desenho experimental e da estrutura da tese. Legenda: CUPs = agrotóxicos de uso atual; OCPs = organoclorados; EROD = etoxiresorufina-O-desetilase; GST = glutatona S-transferase; SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GPx = glutatona peroxidase; GSH = glutatona total; GR = glutatona redutase; GCL = glutamato-cisteína ligase; LPO = lipoperoxidação; PCC = conteúdo de proteínas carboniladas; MN = micronúcleo; AENs = alterações eritrocíticas nucleares; IAH = índice de alteração histológica; Hct = hematócrito; Hb = hemoglobina; RBC = número de células vermelhas; FC = fator de condição; IHS = índice hepatossomático; AChE = acetilcolinesterase; IRN = índice de resistência natatória; NKA = Na⁺K⁺ATPase; HA = H⁺ATPase; AC = anidrase carbônica; α/β-EST = alfa e beta esterases; CaATP = Ca²⁺ATPase; MgATP = Mg²⁺ATPase.

Capítulo I

Introdução geral



1 INTRODUÇÃO GERAL

2

3 1.1 CRESCIMENTO POPULACIONAL E PRODUÇÃO DE ALIMENTOS

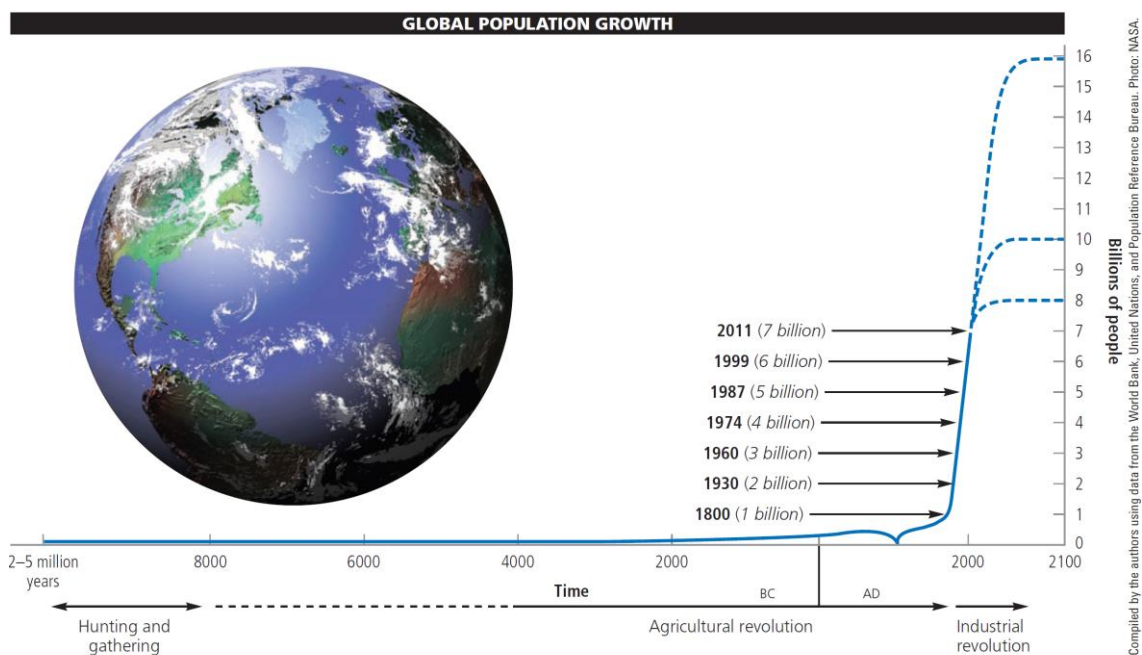
4

5

6

7 A população humana cresceu de forma exponencial a partir da revolução industrial
 8 (Figura 1.1) e, atualmente existem cerca de 7,6 bilhões de pessoas no planeta, com mais de 85
 9 milhões de pessoas nascendo a cada ano. A estimativa é de chegarmos a 9,7 bilhões de
 10 habitantes até o ano de 2050 (Miller e Spoolman, 2015). Conseqüentemente, nas próximas
 11 décadas o mundo enfrentará desafios significativos na produção de alimentos em quantidade
 12 suficiente para sustentar a população mundial em expansão, ao mesmo tempo em que
 13 necessitará utilizar as paisagens e os recursos de água doce de forma mais sustentável
 14 (Carriquiriborde et al., 2014).

14



15

16 **Figura 1.1- Crescimento exponencial da população global.** A curva em forma de J representa o
 17 crescimento exponencial da população mundial, com projeções para 2100 mostrando uma possível
 18 estabilização da população, uma vez que a curva de crescimento em forma de J muda para uma curva em
 19 forma de S. Fonte: Miller e Spoolman, 2015.

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

Grande parte do crescimento da produção agrícola virá do hemisfério sul, e espera-se
 que a América Latina represente uma importante área para o crescimento da agricultura
 (Carriquiriborde et al., 2014). Uma das alternativas para sustentar esse crescimento é a
 intensificação da produção agrícola através de melhorias nas tecnologias de campo.
 Simplesmente expandir o território agrícola não é uma opção viável, uma vez que há uma
 quantidade limitada de terras adicionais que são adequadas para a agricultura e a transformação

1 de habitats naturais para usos agrícolas é considerado insustentável (Carriquiriborde et al.,
2 2014). Entretanto, a expansão das fronteiras agrícolas com um aumento concomitante no uso
3 de agrotóxicos têm sido evidentes na América Latina desde o final da década de 1990
4 (Brannstrom 2009; Richards et al., 2012; Schreinemachers e Tipraqsa 2012), levantando maiores
5 preocupações relacionadas aos efeitos de agrotóxicos no ambiente.

6 Os agrotóxicos desempenham um papel fundamental no aumento da produção agrícola,
7 protegendo as culturas de danos causados por insetos e doenças patogênicas e reduzindo a
8 competição por plantas daninhas. No entanto, como os agrotóxicos são projetados para serem
9 biologicamente ativos, eles também podem ser perigosos para certos organismos não-alvo, e
10 são tipicamente introduzidos nos agrossistemas em grandes quantidades. Desta forma, é
11 necessário e urgente avaliar se o uso destes produtos pode representar riscos potenciais para
12 os organismos não-alvo, incluindo aqueles que vivem em ambientes fora do alvo direto, como
13 em águas superficiais. Os relatórios de contaminação dos ecossistemas aquáticos por
14 agrotóxicos na América Latina suscitaram preocupações quanto ao seu potencial de promover
15 efeitos ecológicos adversos (Palma et al., 2004; Marino e Ronco, 2005; Carriquiriborde et al.,
16 2007; Dores et al., 2008), embora poucos estudos sobre avaliação de risco de agrotóxicos para
17 os ecossistemas aquáticos da América Latina tenham sido relatados (Waichman et al., 2002;
18 Resgalla et al., 2007; Venturino et al., 2007; Ronco et al., 2008; Di Marzio et al., 2010; Rico et al.,
19 2011; Chelinho et al., 2012; Martini et al., 2012, Schiesari et al., 2013; Vieira et al., 2016). Como
20 os dados locais muitas vezes são incipientes, as avaliações de risco desta classe de
21 contaminantes também são frequentemente baseadas em dados de outras regiões, e que
22 aumentam as incertezas e preocupações quanto a obtenção de avaliações locais adequadas.

23 O crescimento agrícola no Brasil, em particular, embora tenha sido impulsionado
24 principalmente pela produtividade em forte ascensão, está associado a uma expansão das terras
25 agrícolas, que aumentaram em 34 milhões de hectares entre os anos de 1990 e 2012 (FAO-
26 OECD, 2015). Em escala global, esta foi uma das maiores expansões durante esse período. Em
27 contrapartida, as décadas recentes também presenciaram uma redução da área florestal nativa,
28 que caiu de 68% para 61% entre os anos de 1990 e 2001 (FAO-OECD, 2015). Aliado à expansão
29 do território agrícola, o Brasil consome cerca de 20% do total de agrotóxicos comercializados
30 mundialmente (Albuquerque et al., 2016) e, ressalta-se, este consumo tem aumentado de forma
31 muito significativa nos últimos anos. O consumo total de agrotóxicos no Brasil (Fig.1.2), saltou
32 de cerca de 170 mil toneladas no ano de 2000 para 500 mil toneladas em 2014, ou seja, um
33 aumento de 135% em um período de apenas 15 anos.

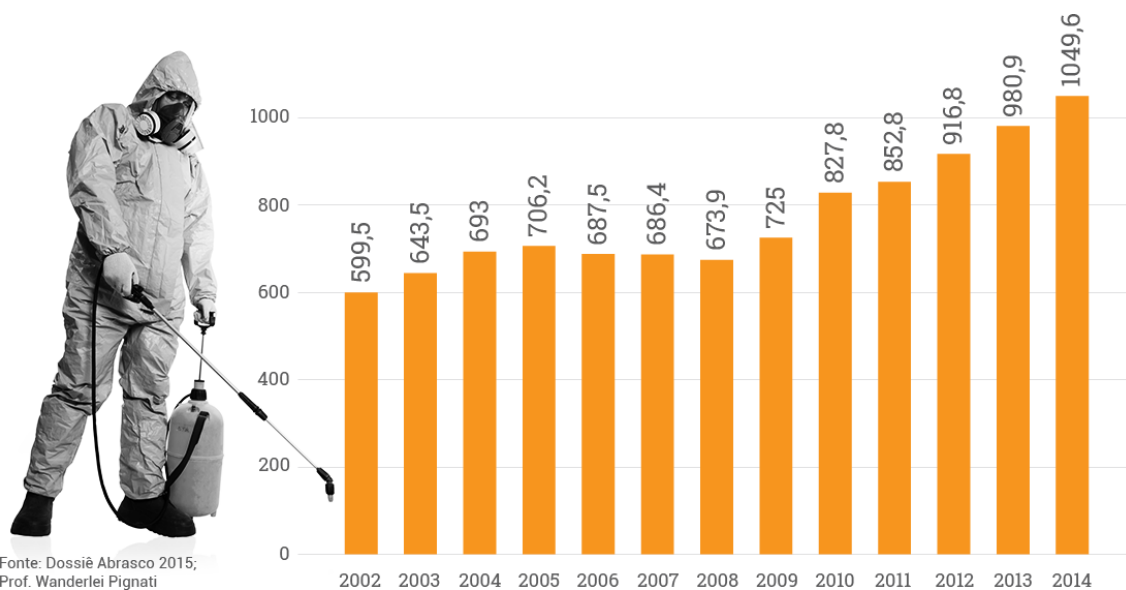


Figura 1.2: Consumo de agrotóxicos nas lavouras do Brasil entre 2002 e 2014 (milhões de litros). Fonte: Dossiê Abrasco, 2015. Retirado de: <http://www.r7.com/r7/media/2016/2016-agrotoxicos/index.html>

Com relação ao consumo de agrotóxicos por UF, o estado do Mato Grosso é o maior consumidor de agrotóxicos, representando 18,9%, seguido de São Paulo (14,5%), Paraná (14,3%), Rio Grande do Sul (10,8%), Goiás (8,8%), Minas Gerais (9,0%), Bahia (6,5%), Mato Grosso do Sul (4,7%) e Santa Catarina (2,1%). Os demais estados consumiram 10,4% do total consumido no Brasil (ABRASCO, 2015).

1.2 MISTURAS DE AGROTÓXICOS E OS DESAFIOS PARA A ECOTOXICOLOGIA

A agricultura em geral e em particular a produção de grãos, representam a espinha dorsal da economia de muitos países da América Latina, e a crescente dependência de culturas transgênicas resultaram em uma rápida expansão do uso de agrotóxicos na região (Tomei e Upham 2009; Carneiro et al., 2012), que representa 52% do consumo mundial destes produtos (FAO - OECD, 2015).

Contaminantes relacionados às atividades agrícolas, urbanas e industriais são introduzidos coletivamente em recursos hídricos. Alguns desses contaminantes (por exemplo, agrotóxicos) são avaliados e classificados quanto aos seus riscos ambientais, mas essas análises são feitas individualmente, enquanto os riscos da contaminação difusa e os efeitos de misturas de múltiplos de contaminantes são raramente entendidos (Brodeur et al., 2014, 2016). Por exemplo, há informações escassas sobre o impacto real da contaminação agroquímica difusa nos ecossistemas agrícolas e nas suas funções. Sabe-se que o uso de agrotóxicos no campo envolve misturas de diferentes compostos para as quais podem ser esperados efeitos adversos

1 desconhecidos (Miglioranza et al. 2013; Ondarza et al., 2014; Lupi et al., 2016; Silva Barni et al.,
2 2016). Neste contexto, Furley et al. (2018) destaca que é necessário desenvolver ferramentas e
3 implementar regulamentações que caracterizem os riscos do uso simultâneo de no mínimo 2 ou
4 mais agrotóxicos.

5 Devido aos riscos associados ao uso de agrotóxicos, os países estabeleceram leis e
6 regulamentos para controlar a produção e uso destes produtos. Esses regulamentos são
7 geralmente baseados em dados de toxicidade gerados a partir de protocolos padronizados que
8 normalmente exigem exposições contínuas de animais, tipicamente do hemisfério norte, a um
9 único agrotóxico. No entanto, observaram-se diferenças entre a toxicidade de alguns
10 agrotóxicos testados em cenários mais representativos das condições de campo nos Pampas
11 argentinos em comparação com métodos laboratoriais de toxicidade padronizados
12 (Carriquiriborde et al., 2007).

13 Adicionalmente, as exposições reais no ambiente normalmente ocorrem sob a forma de
14 picos de concentrações de agrotóxicos em misturas, separadas por períodos de exposição a
15 concentrações muito baixas (Ronco et al., 2008, Dennis et al., 2012; King et al., 2016). Esta
16 dicotomia entre métodos padronizados e exposições no ambiente real põe em questionamento
17 a adequação dos protocolos de teste de toxicidade atuais para prever os efeitos dos agrotóxicos
18 liberados no meio ambiente (Furley et al., 2018). Para avaliar com mais precisão os riscos
19 ecológicos destes contaminantes nos ecossistemas, é essencial desenvolver novos e modernos
20 protocolos de monitoramento e testes de toxicidade que melhor representem a complexidade
21 das exposições em campo, ao mesmo tempo que integrem os resultados de laboratório e
22 estudos de campo de forma mais efetiva e ambientalmente realista.

23 Os campos da Ecotoxicologia e da avaliação de risco ecológico realizaram progressos
24 consideráveis nos últimos 50 anos, reduzindo significativamente os riscos da exposição aguda e
25 do aumento do volume de contaminantes nos ecossistemas. Entretanto, a comunidade
26 científica agora reconhece que os procedimentos de avaliação de risco em que esses campos de
27 pesquisa normalmente se baseiam podem ser carentes de realismo ecológico e podem ser
28 simplesmente inadequados para caracterizar os riscos para os ecossistemas e a saúde humana
29 após exposições crônicas a baixas concentrações de um número crescente de contaminantes
30 (Eggen et al., 2004; Vighi e Villa, 2013). Por exemplo, algumas das importantes limitações do
31 campo da Ecotoxicologia incluem (Furley et al., 2018):

- 32 1) realismo ecológico limitado dos atuais procedimentos de teste de toxicidade;
- 33 2) dificuldade em detectar efeitos de exposição crônica a produtos químicos em baixas
34 concentrações;

1 3) desafios na associação de respostas mecanicistas (por exemplo, moleculares,
2 bioquímicas) com níveis mais elevados de organização biológica;

3 4) dificuldade em avaliar e prever efeitos sobre populações e comunidades;

4 5) problemas associados com a avaliação de efeitos ecológicos indiretos (e.g.
5 competição, predação).

6 A Ecotoxicologia deve continuar a avançar além dos limites atuais para atingir seu
7 objetivo final de determinar, prever e evitar efeitos de contaminantes nos ecossistemas em
8 grandes escalas espaciais (Beketov e Liess, 2012). Embora a transposição de estudos de
9 laboratório para campo tenha ocorrido há décadas (Dickson et al., 1992, La Point and Waller,
10 2000), foram propostos esquemas conceituais adicionais para reduzir a incerteza na
11 extrapolação laboratorial (Vignati et al., 2007) e para ligar mecanicamente as respostas aos
12 produtos químicos em todos os níveis de organização biológica e os efeitos adversos em
13 indivíduos e populações (Ankley et al., 2010). Por exemplo, um estudo integrado de laboratório-
14 campo foi utilizado com sucesso para avaliar os riscos de uso de um piretróide utilizado na soja
15 em peixes da região dos Pampas argentinos (Carriquiriborde et al., 2007). Estes autores
16 demonstraram que embora a cipermetrina tenha sido considerada altamente tóxica para o peixe
17 *Cnesterodon decemmaculatus* em condições de laboratório, no campo este composto
18 representa um baixo risco de toxicidade aguda para esta espécie em córregos ricos em carbono
19 orgânico total (COT), uma vez que no laboratório a LC₅₀ da cipermetrina foi significativamente
20 menor em meios de exposição filtrados e pobres em COT.

21 Em conclusão, avaliar os efeitos de misturas complexas de contaminantes e suas
22 interações com as diversas variáveis no ambiente natural é um dos principais desafios para
23 Ecotoxicologia (Quadro 1.1) (Eggens et al, 2004; Furley et al., 2018).

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1 **Quadro 1-** Principais desafios atuais para a Ecotoxicologia. Adaptado de Eggens et al., 2004.

Exemplos de desafios atuais em Ecotoxicologia	
Desafios em Ecotoxicologia	Exemplos
1 - Baixas concentrações de contaminantes e períodos de exposição prolongados (efeitos crônicos)	<ul style="list-style-type: none"> • Disrupção endócrina • Danos no DNA/mutagenese • Deficiências no sistema imune • Efeitos neurológicos
2 - Múltiplos efeitos de contaminantes isolados	<ul style="list-style-type: none"> • Múltiplos locais-alvo e múltiplos modos de ação tóxica • Efeitos dependentes do tempo e dos tecidos • Efluentes de estações de tratamento de águas residuais
3 - Misturas complexas de contaminantes	<ul style="list-style-type: none"> • Escoamentos agrícolas • Contaminantes e seus produtos de degradação • Complexos de compostos químicos
4 - Múltiplos estressores	<ul style="list-style-type: none"> • UV e contaminantes • Temperatura e contaminantes • Patógenos e contaminantes
5 - Complexidade do ecossistema	<ul style="list-style-type: none"> • Variações nas sensibilidades das espécies • Efeito da propagação de organismos para populações e ecossistemas • Identificação da relação estressor-efeito

2

3

4

5 1.3. CONTAMINANTES AGRÍCOLAS NO AMBIENTE AQUÁTICO

6

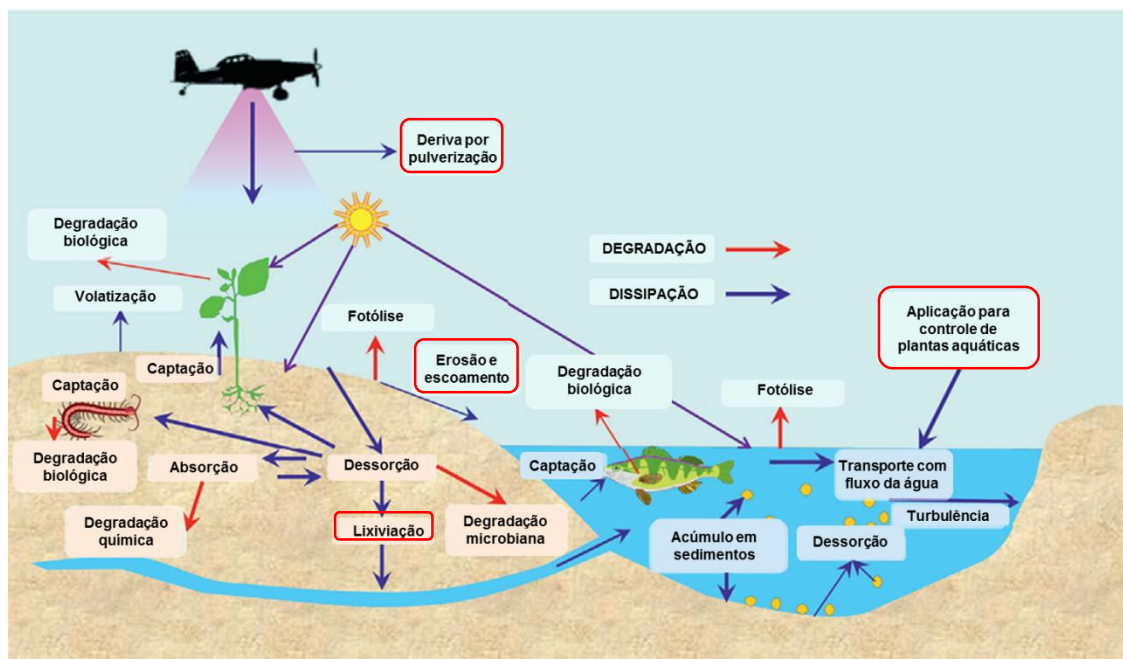
7

8

9 Os principais contaminantes de origem agrícola são os resíduos de fertilizantes e os
 10 agrotóxicos. Estima-se que 99,9% da quantidade de agrotóxicos utilizados nas plantações não
 11 atingem os alvos específicos, deixando grande parte do volume utilizado livre para se deslocar
 12 nos diferentes compartimentos ambientais, como o solo e águas superficiais e subterrâneas
 13 (Belluck et al., 1991). Diversos agrotóxicos podem ser aplicados diretamente à superfície da água
 14 para o controle de plantas aquáticas, ou podem ser transportados para águas superficiais por
 15 meio de diferentes vias de entrada (Fig. 1.3). A deposição atmosférica por pulverização direta
 16 ou deriva da pulverização transportada por correntes aéreas são rotas potenciais de
 17 contaminação dos ecossistemas aquáticos. Uma vez aplicado, agrotóxicos podem ser dissipados
 18 ou degradados (Figura 1.3). A dissipação compreende o movimento do agrotóxico de um local
 para outro, podendo ocorrer através do escoamento superficial, deriva atmosférica,

1 volatilização, lixiviação, adsorção e/ou dessorção de sedimentos e solos, ou absorção do
 2 ingrediente ativo por organismos. A degradação compreende a conversão de uma forma
 3 molecular do agrotóxico para outra e pode ser conduzida por processos químicos (por exemplo,
 4 hidrólise e oxidação), processos físicos (como por exemplo, fotólise), ou processos biológicos
 5 que ocorrem na microbiota, plantas e animais, normalmente levando a formação de produtos
 6 menos tóxicos do que o composto original (Solomon et al., 2013).

7



8

9 **Figura 1.3** - Representação esquemática das fontes, vias de dissipação e degradação de agrotóxicos em
 10 águas superficiais. Em destaque (vermelho) estão as principais vias de entrada de agrotóxicos aos
 11 ambientes aquáticos. Fonte: adaptado de Solomon et al. (2013).

12

13

14 Dentre os agrotóxicos que vêm ganhando destaque mundial pelo crescente uso em
 15 substituição aos tradicionais compostos organofosforados e carbamatos, podemos citar a classe
 16 de inseticidas neonicotinóides e piretróides. Inseticidas neonicotinóides foram desenvolvidos na
 17 década de 1980, e o imidacloprid (IMI), tornou-se o primeiro neonicotinóide comercialmente
 18 disponível (Goulson, 2013; Jeschke et al., 2011). A partir de 2008, os neonicotinóides passaram
 19 a representar 24% do mercado global de inseticidas e 80% do mercado de produtos para
 20 tratamento de sementes (Jeschke et al., 2011) e constituem a classe química de inseticidas que
 21 cresceu mais rapidamente no mercado mundial nas últimas duas décadas (Jeschke et al., 2011;
 22 Tomizawa e Casida, 2001). Segundo dados do IBAMA (2013), o IMI destacou-se como décimo
 23 ingrediente ativo mais vendido no Brasil durante o ano de 2013, o que corresponde a
 24 aproximadamente 8 mil toneladas do composto.

1 Apesar das concentrações ambientais de IMI serem de 2 a 7 ordens de magnitude
2 menores do que as CL₅₀ determinadas para peixes (SERA, 2005; Cox, 2001; Tišler et al., 2009), a
3 possibilidade de danos subletais, como estresse fisiológico e danos no DNA não pode ser
4 descartada (Gibbons et al., 2015), embora estudos sobre efeitos subletais em peixes ainda sejam
5 incipientes. Apenas um pequeno número de espécies de peixes foi avaliado quanto à
6 sensibilidade a neonicotinóides, tonando-se clara a necessidade de mais estudos acerca da
7 toxicidade destes compostos para organismos aquáticos, sobretudo em regiões tropicais e em
8 áreas com histórico crescente de aplicação destes compostos.

9 Da mesma forma que os neonicotinóides, inseticidas do grupo químico dos piretróides
10 exercem menor toxicidade em mamíferos, mas estudos com organismos aquáticos, como os
11 peixes, são necessários devido a potencial toxicidade destes compostos e ao seu ritmo mais
12 lento do metabolismo e eliminação em comparação com aves ou mamíferos (Bradbury e Coats,
13 1989). As meias-vidas de eliminação de várias piretróides por peixes são todos superiores a 48
14 horas, enquanto o tempo de meia-vida para aves e mamíferos variam de 6 a 12 horas (Bradbury
15 e Coats 1989).

16 Ao mesmo tempo, piretróides também exibem fortes propriedades de ligação ao solo,
17 devido ao seu elevado coeficiente de adsorção (He et al. 2008). Esta característica de piretróides
18 pode aumentar a sua concentração em sedimentos de corpos d'água, podendo desta forma,
19 cumulativamente aumentar o risco para a saúde de peixes dulcícolas, principalmente de
20 espécies associadas a estratos inferiores, como o sedimento, dos corpos hídricos que recebem
21 *runoffs* agrícolas.

22 Estudos toxicológicos recentes mostraram que os piretróides estão entre os agrotóxicos
23 mais tóxicos para organismos aquáticos, tais como peixes e crustáceos (Barrionuevo e Lanças,
24 2001; US EPA, 2001, Pimpão et al., 2007; Saxena e Seth, 2002; Gu et al., 2007). Devido ao seu
25 caráter lipofílico, estes compostos possuem uma alta taxa de absorção através das brânquias, o
26 qual pode explicar, em parte, a alta sensibilidade de espécies de peixes à exposição por
27 piretróides (Polat et al., 2012). Além disso, estes organismos parecem ser deficientes no sistema
28 enzimático que hidrolisa estes compostos (Viran et al., 2003).

29 A CL, assim como outros piretróides podem se acumular em sedimentos de corpos
30 d'água, e assim, organismos não-alvo como os peixes podem ser afetados pela exposição a estes
31 contaminantes (Marino e Ronco, 2005; Velmurugan et al, 2007). Atualmente, piretróides podem
32 ser detectados em águas naturais em todo o mundo após aplicações agrícolas, urbanas e
33 residenciais (Weston et al, 2009; Domagalski et al., 2010; Weston e Lydy, 2012; Jabeen et al.,
34 2015; Stehle e Schulz, 2015). A presença da CL foi verificada em sedimentos de rios brasileiros,
35 como tributários da bacia do rio Cuiabá, em concentração que variaram de 19,7 a 60,0 ng.g⁻¹

1 (Possavatz et al., 2014); e em tributários do rio São Francisco no estado do Paraná, na
2 concentração máxima de 1,32 ng.g⁻¹ (Hunt et al., 2016). Miranda et al. (2008) analisaram
3 sedimentos de 17 rios da região do Pantanal brasileiro e detectaram concentrações de CL que
4 variaram de 1 a 5 ng.g⁻¹.

5 Além dos agrotóxicos, os metais-traço são contaminantes ambientais comumente
6 encontrados na água, ar e solo em áreas agrícolas (Braconi et al., 2011). O uso de elementos
7 essenciais para o crescimento das plantas, tais como o cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe),
8 manganês (Mn) e boro (B), é uma prática comum para corrigir deficiências do solo e, ao mesmo
9 tempo, muitos agrotóxicos (fungicidas, inseticidas e herbicidas) contêm metais em suas
10 formulações. Como um exemplo, o Cu é comumente utilizado como um fungicida e está
11 presente em anti-helmínticos, enquanto que cádmio (Cd) e chumbo (Pb) podem entrar no solo
12 como impurezas de fertilizantes (He et al., 2005). Portanto, a intensa aplicação de fertilizantes
13 e agrotóxicos que contêm metais traço em sua formulação pode levar à contaminação de
14 ambientes aquáticos em áreas agrícolas, sendo estes elementos passíveis de serem
15 bioacumulados e biomagnificados, promovendo efeitos diretos na biota aquática.

16

17

18

19 1.4 EFEITOS DE AGROTÓXICOS EM COMUNIDADES E ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

20

21

22 Devido à sua alta dispersão ambiental, é provável que os agrotóxicos entrem em contato
23 com muitas espécies não-alvo. É importante notar que, embora os agrotóxicos
24 sejam "direcionados" para atuar sobre um grupo específico de organismos vivos (plantas,
25 insetos, fungos), eles nunca são totalmente específicos para essas espécies. Eles agem
26 quimicamente sobre as funções vitais ou a reprodução desses organismos, através da ruptura
27 da ou sinalização neural e hormonal, da respiração celular, da divisão celular ou da síntese de
28 proteínas ou lipídios (Krieger, 2010). Devido à sua origem comum, todos os organismos vivos
29 compartilham processos metabólicos, celulares e fisiológicos. A interrupção na reprodução de
30 aves (Risebrough, 1986), o declínio das populações de anfíbios (Davidson e Knapp, 2007), o
31 comprometimento do estado de saúde dos peixes (Agbohessi et al., 2015) assim como o
32 desenvolvimento de patologias cancerosas ou neurológicas em seres humanos (Mostafalou e
33 Abdollahi, 2013) têm sido identificadas como prováveis consequências da exposição à
34 agrotóxicos.

35

36 Os riscos da agrotóxicos para os ecossistemas aquáticos têm se baseado em estudos de
modelos de ecossistemas (micro ou mesocosmos) com diferentes grupos taxonômicos e níveis

1 tróficos, empregados para investigar a resposta das comunidades quando exposta à estes
2 contaminantes. Relyae (2005) testou o efeito de inseticidas e herbicidas em concentrações
3 ambientalmente relevantes em mesocosmos contendo algas e 25 espécies de animais, incluindo
4 zooplâncton (cladóceros e copépodos), insetos (odonatas), gastrópodes e girinos e adultos de
5 diferentes espécies de anfíbios. Os resultados mostram uma redução na riqueza de espécies de
6 até 30% sob o efeito de inseticidas e herbicidas. Enquanto os inseticidas afetaram
7 principalmente o zooplâncton e os insetos, os herbicidas apresentaram efeitos significativos nas
8 populações de anfíbios, levando ao desaparecimento completo de girinos de algumas espécies.
9 Maltby e colaboradores (2009) publicaram um estudo comparativo sobre a susceptibilidade de
10 produtores primários (algas e macrófitas), artrópodes e peixes expostos isoladamente ou em
11 mesocosmos a 42 fungicidas diferentes. Os resultados mostram que a sensibilidade dos
12 diferentes grupos taxonômicos foi influenciado pelo nível trófico, mas depende do modo de
13 ação dos fungicidas. As plantas foram especialmente sensíveis aos inibidores da síntese de
14 esteróis, enquanto os artrópodes e os peixes foram principalmente impactados por fungicidas
15 com ação multi-local.

16 Além dos efeitos tóxicos diretos sobre os organismos, esses estudos também mostraram
17 que os agrotóxicos podem influenciar indiretamente as comunidades de animais aquáticos.
18 Alguns inseticidas afetam, de forma positiva ou negativa, certos grupos taxonômicos,
19 diminuindo os recursos alimentares para algumas espécies e alterando as pressões de predação
20 e competição por recursos alimentares (Barry e Logan, 1998; Relyea e Hoverman, 2008). Os
21 herbicidas também apresentaram efeitos indiretos nas comunidades aquáticas através da
22 diminuição da biomassa de plantas aquáticas, o que, por sua vez, leva à diminuição da
23 oxigenação da água e ao aumento dos níveis de dióxido de carbono, níveis de amônia e fósforo
24 e destruição de habitat (Newbold, 1975). Esses efeitos nos recursos e na qualidade físico-
25 química do meio ambiente provavelmente terão impacto em todos os organismos e,
26 consequentemente, no funcionamento do ecossistema (Brock et al., 2005). A diminuição da
27 biomassa vegetal e do fitoplâncton também afeta os recursos alimentares dos consumidores
28 primários, de modo que, em cascata, toda a cadeia trófica aquática é afetada, em concentrações
29 muitas vezes menores que aquelas que resultam em efeito direto (Graymore et al., 2001). Da
30 mesma forma, os fungicidas afetam as comunidades de fungos aquáticos, que desempenham
31 um papel fundamental na degradação da liteira vegetal e afetando assim a alimentação de
32 macroinvertebrados (Zubrod et al., 2015). Os agrotóxicos podem, portanto, influenciar
33 indiretamente as populações naturais de peixes. Um estudo de Noyelles et al. (1989) mostrou
34 que a destruição de macrófitas em corpos d'água tratados com atrazina resultou em uma
35 diminuição de 50 a 80% na biomassa do *bluegill* *Lepomis macrochirus*. Este efeito está

1 relacionado (1) com a diminuição dos macroinvertebrados associados a essas macrófitas e
2 presas do peixe e (2) ao aumento da predação de peixes juvenis por adultos na ausência de
3 proteção fornecida pelas plantas .

4 Além destes efeitos indiretos, os agrotóxicos podem afetar diretamente a sobrevivência,
5 reprodução ou crescimento de vertebrados aquáticos (Sekine et al., 1996; Graymore et al., 2001;
6 Hayes et al., 2006). Nos peixes, eles podem induzir neurotoxicidade, danos oxidativos,
7 genotoxicidade, perturbar o sistema olfativo e imunológico e prejudicar a integridade dos
8 órgãos (Graymore et al., 2001; Tierney et al., 2010; Polard et al., 2011; Tierney et al., 2013).

9 Os efeitos dos inseticidas em peixes são relativamente bem documentados, e sua
10 toxicidade para estes organismos é difundida na comunidade científica. Esta classe de
11 agrotóxicos apresenta o maior quociente de risco para organismos aquáticos em ecossistemas
12 dulcícolas brasileiros (Albuquerque et al., 2016). Por outro lado, a toxicidade de herbicidas e
13 fungicidas para os vertebrados aquáticos, que constituem grande parte dos agrotóxicos
14 detectados em águas superficiais no Brasil, ainda é objeto de debate nos dias atuais. Dois
15 comentários sobre os efeitos dos herbicidas em geral (Solomon et al., 2013) e a atrazina em
16 particular (Van der Kraak et al., 2014) em peixes e anfíbios apontam para muitas lacunas e
17 deficiências nos estudos sobre o efeito dessas substâncias. Essas deficiências incluem o uso de
18 concentrações não representativas de contaminação ambiental, falta de relação dose-resposta,
19 falta de transparência de resultados, falhas no projeto experimental, resultados contraditórios
20 entre estudos ou a ausência de marcadores de efeito em todo o organismo (ou seja, reprodução,
21 crescimento ou sobrevivência). Através de uma análise baseada em peso quantitativo de
22 evidência, que incorporou uma avaliação detalhada da relevância das respostas observadas aos
23 *endpoints* diretamente relacionados à sobrevivência, crescimento, desenvolvimento e
24 reprodução, bem como a força e adequação dos métodos experimentais empregados, Van der
25 Kraak et al. (2014) concluíram que os herbicidas não têm toxicidade comprovada para peixes e
26 anfíbios em concentrações presentes no meio ambiente. Por outro lado, uma meta-análise de
27 Rohr e McCoy (2010) sobre os efeitos da atrazina em anfíbios e peixes leva à conclusão oposta.
28 Além disso, um estudo de Hayes et al. (2006) em várias espécies de anfíbios expostos a uma
29 mistura de herbicidas e fungicidas em concentrações ambientais, apresentou efeitos
30 significativos sobre crescimento, desenvolvimento, metamorfose e imunidade. Os autores
31 concluem que a falta de estudos sobre a toxicidade de herbicidas e fungicidas provavelmente
32 leva a uma subestimação do risco desses contaminantes para animais selvagens.

33

34

1 1.5 BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

2
3
4 O objetivo final do monitoramento ambiental é a proteção dos sistemas biológicos.
5 Deste modo, é imprescindível estudar os efeitos biológicos da exposição a substâncias presentes
6 no meio ambiente, dado que a mera quantificação destas substâncias em matrizes ambientais
7 não revela a biodisponibilidade das mesmas nem permite estabelecer eventuais efeitos nocivos
8 (Cajaraville et al., 2000; Barsiene et al., 2006). Além disso, os sistemas biológicos são
9 frequentemente expostos a misturas de contaminantes, os quais podem interagir de diferentes
10 formas (efeitos aditivos, antagonistas ou sinérgicos).

11 Os organismos, quando confrontados com modificações no ambiente (frequentemente
12 prejudiciais aos processos vitais), desencadeiam mecanismos adaptativos que lhes permitem
13 sobreviver, crescer e reproduzir-se, refletindo as interações com os contaminantes. Desta
14 forma, os efeitos que estas substâncias estranhas para o organismo (xenobióticos) causam nos
15 indivíduos podem ser utilizados como biomarcadores para avaliar o impacto dos contaminantes
16 na qualidade ambiental (Wells et al., 2001). Um biomarcador pode ser definido como "uma
17 variação bioquímica, celular, fisiológica ou comportamental que pode ser medida no tecido ou
18 amostras de fluidos corporais ou ao nível do organismo e que fornece evidências de exposição
19 a e/ou efeitos de um ou mais poluentes químicos (e/ou radiação)" (Depledge, 1993). Há, no
20 entanto, alguma controvérsia em torno do uso deste termo, dado que alguns investigadores
21 consideram biomarcadores apenas respostas ao nível molecular, bioquímico ou fisiológico (Lam,
22 2009). Neste contexto, os biomarcadores podem ser considerados ferramentas integradoras,
23 complementares às análises químicas e ecológicas classicamente usadas no monitoramento
24 ambiental (Sanchez et al., 2008).

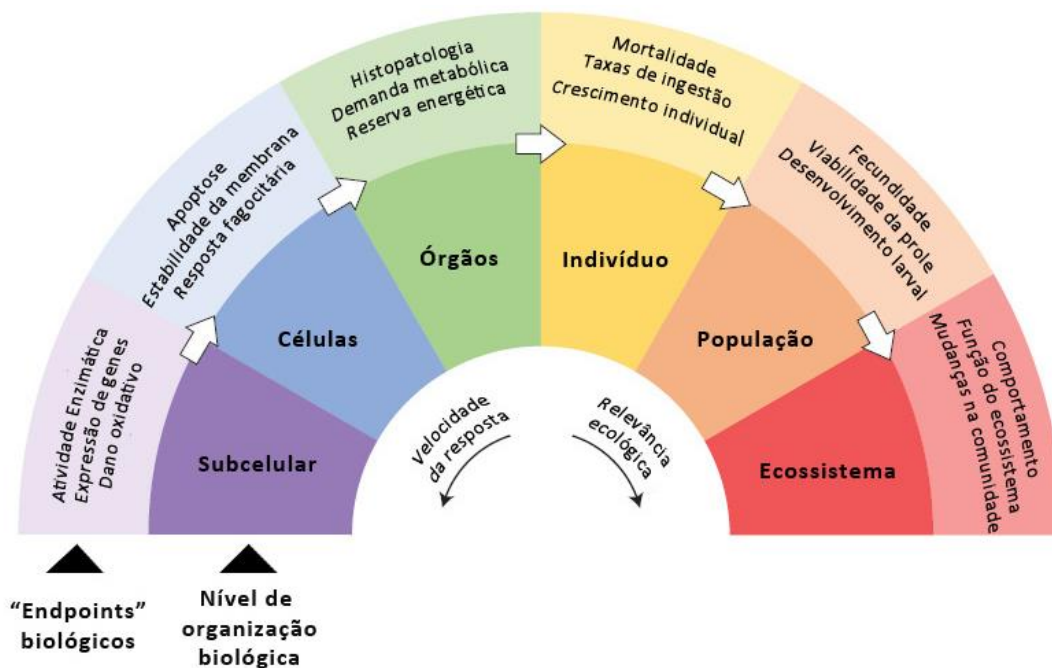
25 Os biomarcadores podem ser utilizados em três abordagens: 1) biomonitoramento
26 passivo, ou seja, comparando a resposta do biomarcador em animais de locais contaminados e
27 referência (não-contaminado); 2) biomonitoramento ativo, com o transplante ou confinamento
28 de espécies sentinelas para o local de estudo num período determinado, a fim de induzir as
29 respostas dos biomarcadores; 3) ensaios de laboratório, onde as espécies são expostas a
30 contaminantes sob condições controladas. Ambas as abordagens de biomonitoramento são
31 geralmente utilizadas para a avaliação ambiental, enquanto a abordagem laboratorial é utilizada
32 para investigar relações de causa e efeito (Losso e Ghirardini, 2009).

33 Alguns autores (Livingstone et al., 2000) consideram crucial a distinção entre
34 biomarcadores gerais – que respondem aos principais tipos de estresse ambiental, fornecendo
35 uma medida quantitativa da performance ou condição física do organismo – e específicos – que

1 respondem a grupos particulares de compostos químicos e, por este motivo, são indicadores do
2 grau de exposição ou dos possíveis efeitos de um composto ou grupo de compostos
3 semelhantes (Livingstone, 1993). No entanto, várias respostas historicamente descritas como
4 altamente específicas (por exemplo, a indução de metalotioneínas por metais) podem ser
5 perturbadas por outros compostos químicos (Davies et al., 1994). Além disso, a relação entre a
6 resposta do biomarcador e a exposição a substâncias químicas não é estritamente linear, devido
7 a fenômenos adaptativos ou transitórios, como verificado para os parâmetros antioxidantes
8 (Sanchez et al., 2005). Assim, a aplicação de um conjunto de biomarcadores com base em
9 medições de parâmetros complementares é uma ferramenta valiosa para diferenciar ambientes
10 limpos de ambientes contaminados ou para descrever com precisão os efeitos da contaminação
11 nos peixes (Flammarion et al., 2002; Galloway et al., 2004; Sanchez et al., 2007).

12 As respostas ao nível bioquímico e molecular tendem a ocorrer primeiro, sendo
13 seguidas por respostas ao nível da célula, tecido, órgão e organismo (Fig.1.4). Assim, as respostas
14 ao nível bioquímico e molecular podem funcionar como um instrumento de vigilância ambiental
15 (Aprea et al., 2002), ajudando a identificar o início de um possível impacto e permitindo uma
16 ação corretiva antes que os efeitos adversos sejam observados a níveis superiores, ou seja,
17 população, comunidade e ecossistema (Monserrat et al., 2003; Lam, 2009). Como os aspectos
18 comuns entre organismos diferentes se acentuam principalmente ao nível molecular, muitos
19 biomarcadores moleculares possuem a vantagem de poder ser aplicados a uma ampla variedade
20 de espécies (Lam e Gray, 2003). Por sua vez, os efeitos ao nível do indivíduo são respostas a
21 longo prazo com grande relevância ecológica (Lam, 2009) e, deste modo, mais aplicáveis aos
22 processos de análise de risco ecológico para gestão ambiental.

23



1
2 **Figura 1.4** – Esquema simplificado que ilustra os potenciais impactos da exposição a contaminantes em
3 níveis sucessivos de organização biológica. Fonte: Adaptado de Galloway et al. (2017).

7 **1.5.1 Biomarcadores fisiológicos: respostas de estresse em peixes**

10 O termo "estresse" refere-se à diferentes idéias (Romero, 2004): (1) ao estímulo gerado
11 por uma situação perigosa para o organismo ou percebida como tal; (2) a reação a este estímulo,
12 compreendendo todos as alterações fisiológicas, hormonais e comportamentais - ou respostas
13 - iniciados pelo corpo para lidar e manter sua estabilidade interna; (3) a doença resultante da
14 estimulação prolongada das respostas do organismo. A partir dessa percepção comum, mas
15 falsa, o estresse é considerado prejudicial para os organismos (Barton, 2002). Na realidade, o
16 estresse é uma resposta adaptativa necessária, permitindo que os organismos mantenham sua
17 homeostase interna através um conjunto complexo de ajustes bioquímicos, fisiológicos e
18 comportamentais (Chrousos, 1998). No entanto, quando o estressor se estabelece ao longo do
19 tempo ou torna-se muito intenso, essas respostas adaptativas podem ser comprometidas ou
20 torarem-se desadaptativas, promovendo efeitos deletérios sobre os organismos (Selye, 1950).

21 O endocrinologista Hans Selye, define o estresse como "a resposta não específica do
22 corpo a qualquer necessidade de adaptação". Em 1946 e 1950, ele publicou o conceito de
23 "Síndrome de Adaptação Geral (SAG)" que descreve todas as reações neurológicas, endócrinas
24 e fisiológicas desencadeadas por um estressor (Selye, 1946; 1950). Também é interessante notar
25 que a resposta ao estresse, seus mecanismos e as moléculas envolvidas são extremamente

1 similares entre diferentes espécies e têm sido fortemente conservadas durante a evolução
2 (Ottaviani e Franceschi, 1996).

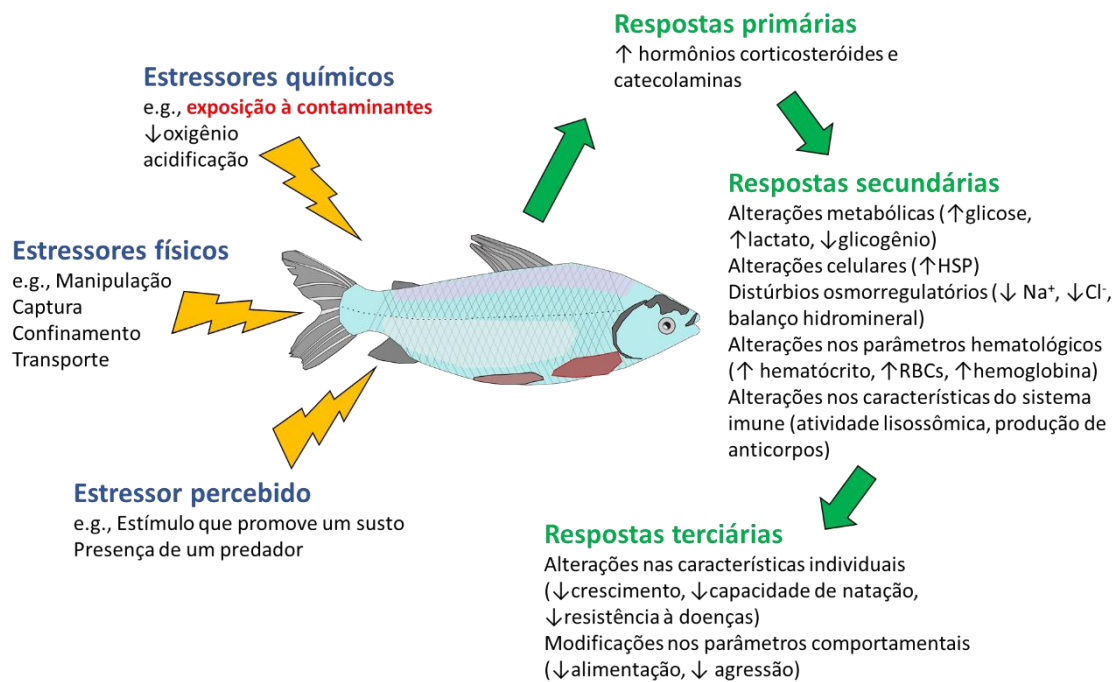
3 A SAG possui três fases, independentemente da natureza do agente estressor (Selye,
4 1946; 1950):

5 (1) Fase de alarme: a cascata de resposta ao estresse é iniciada pelo sistema
6 nervoso central (SNC) que percebe e reconhece a "ameaça", seja real ou não. O SNC atua
7 paralelamente ao sistema nervoso simpático (SNS) e ao eixo Hipotálamo-Hipófise-Interrenal
8 (HHI) que produzem "hormônios do estresse", catecolaminas (adrenalina, noradrenalina) e
9 glicocorticóides (cortisol), respectivamente. É uma resposta imediata do corpo que visa
10 promover uma reação rápida para escapar através de uma significativa mobilização de energia
11 para os músculos, conhecida como resposta de "luta ou fuga".

12 (2) Fase de resistência: é colocada em prática quando o corpo não pode fugir da
13 fonte de estresse. Esta fase é mais específica do que a primeira e as respostas geradas
14 dependem em parte da natureza do estresse. É uma fase essencialmente "adaptativa" destinada
15 a manter uma certa homeostase do corpo. Particularmente, é baseada na indução de sistemas
16 de defesa que promovem a neutralização ou eliminação de moléculas tóxicas, a proteção de
17 constituintes celulares ou a reparação dos danos causados.

18 (3) Fase de exaustão: quando as capacidades adaptativas de defesa e resistência
19 do organismo são excedidas, a homeostase fisiológica e energética não pode ser mantida. Esta
20 fase resulta em uma diminuição da capacidade do corpo de se alimentar, crescer e se reproduzir,
21 o que pode estar associado a uma deterioração do funcionamento de certos órgãos e um
22 enfraquecimento dos mecanismos de defesa imune.

23 Estas três fases da síndrome de adaptação geral envolvem respostas bioquímicas,
24 fisiológicas e comportamentais, descritas como a cascata de resposta ao estresse (Barton, 2002).
25 Barton (2002) descreveu três tipos principais de resposta ao estresse em peixes: respostas
26 primárias, secundárias e terciárias (Fig.1.5). Essas respostas podem resultar de efeitos diretos
27 do estresse ou fazer parte de uma cascata de respostas adaptativas que permitem ao corpo fugir
28 ou resistir ao estresse. A resposta primária é a secreção de hormônios do estresse,
29 catecolaminas e glicocorticóides, pelo sistema endócrino. As respostas secundárias referem-se
30 a todas as mudanças moleculares, celulares e fisiológicas induzidas pelo estresse (por exemplo,
31 indução de sistemas de defesa, perturbações da osmoregulação, alterações metabólicas e
32 imunológicas). As respostas terciárias dizem respeito às consequências da resposta ao estresse
33 no nível individual, como alterações comportamentais, efeitos no crescimento, reprodução e
34 resistência à doença.



1

2 **Fig. 1.5** - Representação esquemática dos níveis de respostas ao estresse, classificadas em Primárias,
3 Secundárias ou Terciárias. Esquema confeccionado com base nas revisões realizadas por Wendelaar
4 Bonga (1997), van der Oost et al. (2003) e Wendelaar Bonga (2011).

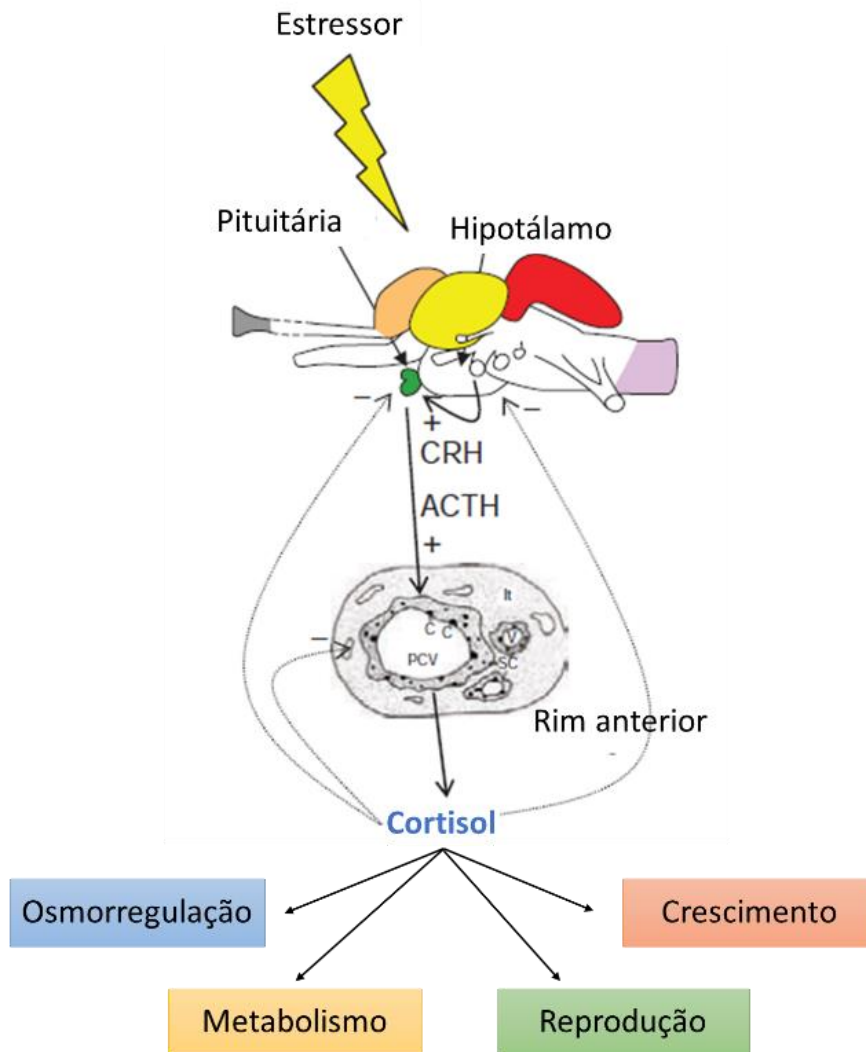
5

6

7 A resposta primária é chamada de "neuroendócrina". Sob o efeito do estresse, o SNC
8 ativa o sistema nervoso simpático (SNS) e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI), levando
9 à secreção de "hormônios do estresse" (Barton, 2002). O equivalente da glândula adrenal em
10 peixes é o tecido interrenal localizado na região anterior dos rins e composto de células
11 interrenais e cromafins (Hontela, 1997; Mommsen,1999). A ativação do sistema nervoso
12 simpático leva à secreção de catecolaminas (adrenalina, norepinefrina e dopamina) pelas células
13 cromafins. Esta resposta extremamente rápida leva a um aumento imediato na concentração
14 destes hormônios no sangue (Wenderlaar Bonga, 2011). Em paralelo, a ativação do eixo HHI leva
15 à secreção do fator de liberação de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo. O CRH atua sobre a
16 hipófise que secreta adrenocorticotropina (ACTH). Este hormônio, por sua vez, induz a secreção
17 de corticosteróides ou glicocorticóides pelas células interrenais (Hontela, 1997; Mommsen,
18 1999). Em teleósteos, o principal hormônio glicocorticóide é o cortisol. Esta resposta, é mais
19 lenta do que a primeira, e leva a um aumento da concentração plasmática de cortisol após
20 minutos ou horas da percepção do estressor (Wenderlaar Bonga, 2011).

21 As secreções de catecolaminas e cortisol são reguladas por *feedbacks*. Parece que as
22 catecolaminas têm um *feedback* positivo, o aumento da concentração plasmática de uma das

1 três catecolaminas estimula a liberação dos outros dois hormônios no sangue (Reid et al., 1998).
 2 Em contraste, o cortisol é regulado por *feedback* negativo (Figura 1.6). À medida que a
 3 concentração de cortisol aumenta, inibe a secreção de CRH pelo hipotálamo e do ACTH pela
 4 glândula pituitária, o que diminui a síntese de cortisol (Hontela, 1997). Esses hormônios do
 5 estresse promoverão uma série de respostas coordenadas, do nível molecular ao indivíduo.
 6 Essas respostas "secundárias" e "terciárias" permitem aos organismos fugir ou resistir ao
 7 estresse.



8

9 **Figura 1.6:** Representação esquemática dos mecanismos de liberação, das vias de regulação (*feedback*)
 10 e das funções fisiológicas afetadas pelo cortisol. Fonte: adaptado de Wenderlaar Bonga (2011).

11

12 As respostas secundárias incluem todas as respostas moleculares e celulares, bem como
 13 ajustes fisiológicos induzidos pelo estresse. Essas respostas podem ser iniciadas pelos
 14 hormônios do estresse ou diretamente pelo próprio agente estressor (Barton, 2002). Embora os
 15 padrões de resposta variem de acordo com a espécie e a natureza, intensidade ou duração do
 16 estresse, ocorre a indução de uma resposta de estresse geral no nível molecular, que inclui

1 mudanças no metabolismo energético, função mitocondrial, ciclo de vida e estrutura celular,
2 bem como sistemas de defesa (por exemplo, proteínas chaperonas, defesas antioxidantes) e
3 reparação de danos (Kassahn, 2009).

4 Sob o efeito do estresse, os organismos também podem modular as suas vias
5 energéticas. A ação combinada, sinérgica ou antagônica de diferentes fatores permite uma
6 regulação fina e específica da mobilização de substratos energéticos ao nível molecular, bem
7 como ao nível do organismo todo. As reações metabólicas intracelulares são assim moduladas
8 por diferentes enzimas cuja atividade e/ou expressão estão sob o controle de dois hormônios,
9 insulina e glucagon. Sob o efeito do estresse, a secreção de catecolaminas e glicocorticóides irá
10 modificar a regulação dessas vias metabólicas, a fim de fornecer a energia necessária para
11 diferentes respostas adaptativas (Mommsen, 1999).

12 Um dos principais papéis dos hormônios do estresse é mobilizar a energia necessária
13 para as respostas de fuga, combate e resistência ao estresse. A regulação do metabolismo
14 energético sob o efeito do estresse é apresentada em detalhes em várias revisões (Fabbri et al.,
15 1998; Mommsen, 1999; Moon, 2004). Resumidamente, as catecolaminas e, em seguida, o
16 cortisol causarão o aumento da produção de glicose no fígado (gliconeogênese), e em seguida,
17 sua liberação no sangue, a fim de fornecer energia facilmente utilizável para os órgãos e tecidos
18 periféricos (ou seja, músculos, coração). Para isso, os hormônios do estresse coordenam a
19 ativação/inibição de determinadas vias metabólicas em todo o corpo (Figura 1.7), tais como:

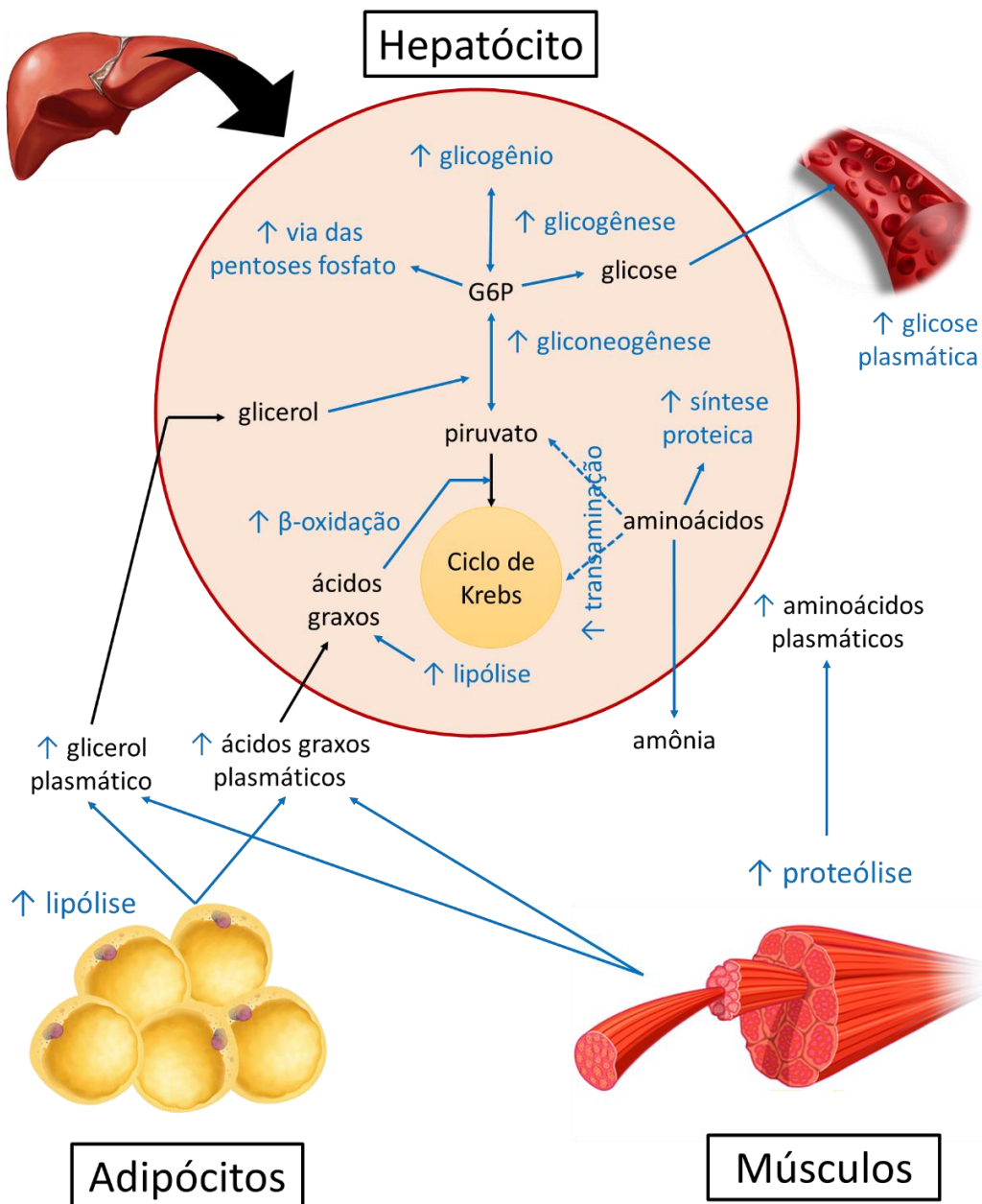
- 20 • a degradação das reservas de glicogênio no fígado para produzir glicose;
- 21 • a inibição da atividade de enzimas hepáticas envolvidas na glicólise;
- 22 • o aumento da atividade das enzimas envolvidas na gliconeogênese hepática a partir de
23 outros substratos (por exemplo, ácidos graxos, determinados aminoácidos, etc.),
- 24 • a degradação de lipídios e proteínas nos tecidos adiposos e musculares para fornecer
25 substratos para a gliconeogênese hepática.

26

27

28

29



1
2 **Fig. 1.7: Efeitos do cortisol sob o metabolismo energético:** sob efeito do cortisol, as proteínas e/ou
3 lipídios presentes nos músculos e nos tecidos adiposos são degradadas para formar aminoácidos, glicerol
4 e ácidos graxos. Essas moléculas são liberadas no sangue e capturadas pelos hepatócitos. Estes substratos
5 são então utilizados principalmente para produzir glicose através da gliconeogênese. A glicose assim
6 produzida é liberada no sangue para fornecer energia aos vários órgãos. Setas azuis: caminhos
7 metabólicos afetados pelo cortisol. ↑: aumento da via metabólica ou metabólito. Adaptado de Mommsen
8 et al. (1999).

9
10
11 Na fase de alarme, a resposta "luta ou fuga" é iniciada por uma descarga do sistema
12 nervoso simpático (SNS) que gera uma série de ajustes fisiológicos coordenados que permitem
13 ao corpo lutar ou fugir (McCarty, 2010; Romero, 2010). Esses ajustes estão sob o efeito de um

1 duplo controle do SNS: direto, através da inervação simpática de vários órgãos e indiretamente
2 sob a ação das catecolaminas (Perry e Bernier, 1999).

3 O SNS causa através da inervação dos órgãos vasculares e respiratórios a aceleração do
4 batimento cardíaco e da ventilação branquial, respectivamente. Nos peixes, as catecolaminas
5 também desempenham um papel no controle da frequência cardíaca, mas têm pouco efeito
6 sobre a ventilação (Perry e Bernier, 1999). O SNS leva simultaneamente à contrações de vasos
7 sanguíneos em certas partes do corpo e a dilatação dos vasos que suprem os músculos,
8 possibilitando aumentar o fluxo sanguíneo (e, portanto, a glicemia) para os músculos em
9 atividade. As catecolaminas também aumentam a afinidade da hemoglobina com o oxigênio e,
10 portanto, a quantidade de oxigênio no sangue (Perry e Bernier, 1999). Todas essas respostas
11 destinam-se a aumentar a velocidade e a força muscular e, assim, permitir uma ação natatória
12 intensa.

13 Por outro lado, o cortisol é um hormônio glicocorticóide que atua na osmorregulação
14 dos peixes, especialmente nas brânquias (Hontela, 2005; Wenderlaar Bonga, 2011). Em espécies
15 aquáticas, aumenta o fluxo de sódio e o transporte iônico através das brânquias, mucosa
16 intestinal e nos rins, aumentando a atividade da Na^+K^+ ATPase (Mommsen, 1999). O cortisol
17 permite a aclimação de espécies anádromas à água do mar, como salmonídeos, estimulando
18 a diferenciação celular de células ricas em mitocôndrias (CRM) e aumentando a atividade da
19 Na^+K^+ ATPase (Mommsen, 1999). O cortisol também aumenta a absorção de cálcio, sugerindo
20 um papel na aclimação à água doce (Mommsen, 1999).

21 As respostas terciárias estão relacionadas aos efeitos no nível do organismo que afetam
22 o desempenho e a aptidão física dos indivíduos: comportamento, reprodução, crescimento e
23 resistência a doenças. Esses efeitos são diretamente induzidos por hormônios do estresse
24 (principalmente cortisol) ou resultam de distúrbios fisiológicos (ou seja, respostas secundárias),
25 como a alteração do metabolismo energético.

26 O estresse também tem efeitos importantes sobre o comportamento dos peixes
27 (Beitinger, 1990). Na fase de alarme, os comportamentos de esquiva podem ocorrer se o animal
28 detectar o estresse. O comportamento de prevenção reduz a exposição ao estresse e mantém
29 o desempenho "normal" uma vez que o estresse é evitado. Numerosos estudos foram realizados
30 em peixes expostos à contaminantes ou estresse físico, mostrando na maioria dos casos reações
31 de evitação em níveis de estresse abaixo dos limites de tolerância letal (Beitinger, 1990). No
32 entanto, a resposta de evitação só é possível se houver um habitat alternativo, se o estresse for
33 suficientemente intenso para ser detectado e depender das capacidades de detecção e
34 deslocamento das espécies (Beitinger, 1990).

1 Outros tipos de comportamento podem ser afetados pelo estresse. Em peixes, o cortisol
2 é geralmente considerado um inibidor do comportamento alimentar (McCormick e Shrimpton,
3 1998; Bernier e Peter, 2001). O estresse também pode afetar a locomoção de peixes (Handy et
4 al., 1999; Herrera et al., 2014), a capacidade de enfrentamento de riscos (Herrera et al., 2014) e
5 o comportamento social, incluindo a agressão e as relações de dominância (Pottinger e Carrick,
6 2001; Herrera et al., 2014). As causas dessas mudanças comportamentais são complexas e
7 provavelmente multifatoriais, incluindo a interrupção do metabolismo energético sob a
8 influência do estresse, o efeito direto do cortisol ou o efeito de outros hormônios envolvidos no
9 metabolismo e comportamento do peixe e cuja produção e/ou atividade são afetadas pelo
10 estresse (Pottinger e Carrick, 2001; Herrera et al., 2014).

11 O estresse também influencia o crescimento principalmente através de mudanças no
12 metabolismo energético, no comportamento alimentar, na eficiência de conversão alimentar
13 e/ou estimulação hormonal (Gregory e Wood, 2010; Pankhurst e Van Der Kraak, 2011). A
14 mobilização de recursos energéticos (ou seja, para compensar o custo energético necessário
15 para evitar ou desenvolver respostas de resistência ao estresse) sob a ação combinada de
16 catecolaminas e glicocorticóides, bem como a inibição do comportamento alimentar, explicam
17 em grande medida a inibição do crescimento observado em peixes sob condições estressoras
18 (Gregory e Wood, 2010; Pankhurst e Van Der Kraak, 2011). No entanto, mudanças na
19 concentração de hormônio do crescimento (GH) foram demonstradas em peixes sob estresse
20 agudo ou crônico, indicando a interrupção do controle endócrino do crescimento (Pickering et
21 al., 1991).

22 O crescimento, a reprodução e as várias atividades de manutenção do corpo (ventilação,
23 osmorregulação, batimentos cardíacos, etc.) requerem grandes quantidades de energia, provida
24 pelos nutrientes e pelas reações catabólicas associadas (Kooijman, 2000; 2010). A alocação de
25 energia para essas diferentes atividades variam ao longo da vida dos animais, de um tecido para
26 outro, mas também de acordo com o contexto ambiental (Kooijman, 2000; 2010). A regulação
27 dos recursos e a modificação das diferentes vias metabólicas energéticas possibilitam modular
28 e direcionar a energia de acordo com as necessidades específicas de células, tecidos e órgãos,
29 com consequentes *trade-offs* de energia entre manutenção, desenvolvimento, crescimento e
30 reprodução (Kooijman, 2000; McGeer et al., 2000; Rajotte e Couture, 2002).

31 Quando os organismos estão sob estresse prolongado, a energia normalmente alocada
32 para crescimento e reprodução é investida em tolerância e resistência ao estresse (manutenção)
33 (Fig. 1.8). A longo prazo, essa demandas de energia para manutenção pode levar a uma
34 diminuição das reservas energéticas, crescimento e reprodução (Smolders et al., 2005).

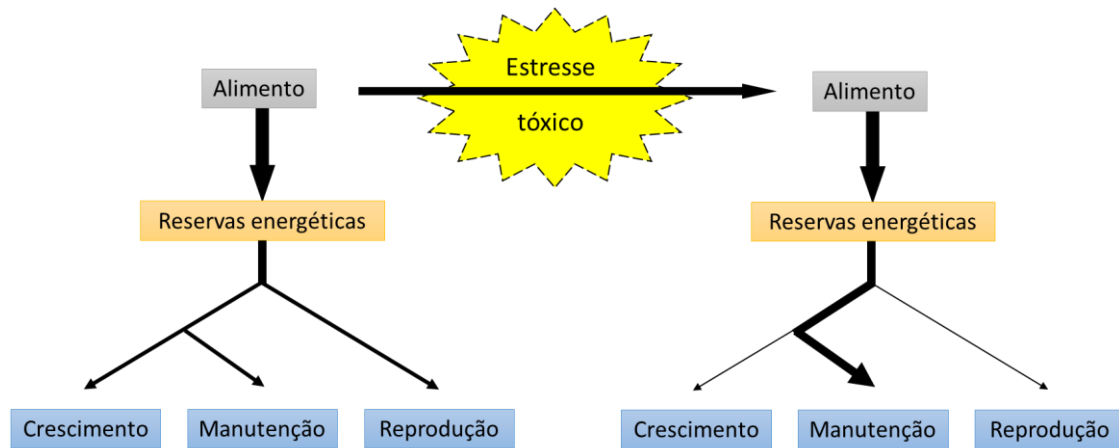
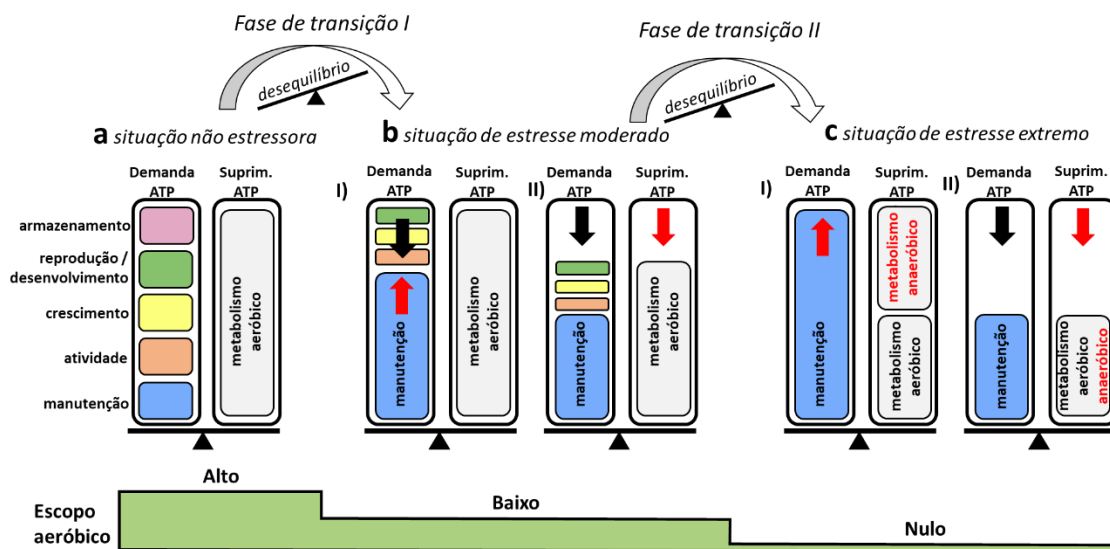


Figura 1.8 – Efeitos do estresse na mobilização dos recursos energéticos. O aumento da demanda energética para manutenção da homeostase leva a uma diminuição da energia disponível para as funções relacionadas ao crescimento e reprodução. Fonte: adaptado de Smolders et al., 2015.

O custo bioenergético de manter a homeostase e a indução de sistemas de defesa e reparação de danos aumenta com a intensidade e duração do estresse, levando a diferentes estratégias de compensação metabólica (Figura 1.9) (Sokolova et al, 2012). Quando o estresse é moderado (Figura 1.9-bI), a demanda de energia para a manutenção aumenta, diminuindo a energia disponível para crescimento, reprodução, atividade e armazenamento de energia sob a forma de reservas energéticas. Se os processos de assimilação ou metabolismo energético são perturbados pelo estresse (Figura 1.9-bII), a energia disponível diminui. Em ambos os casos, a capacidade metabólica aeróbica diminui. É uma estratégia de compensação metabólica que permite que o corpo se adapte ao estresse à custa de processos não vitais, como crescimento, reprodução e atividade. As reservas de energia também são usadas para fornecer energia aos vários processos envolvidos.

Quando o estresse é extremo (Figura 1.9 c), a demanda de energia para a manutenção aumenta além da capacidade metabólica aeróbica (cI), ou a interrupção do metabolismo aeróbio resulta em uma diminuição da energia disponível abaixo da demanda de energia (cII). Em ambos os casos, o metabolismo aeróbio não pode suprir a demanda de energia. A capacidade metabólica aeróbica desaparece e o metabolismo entra em anaerobiose parcial para sustentar o custo de manutenção. É uma estratégia de conservação, permitindo a sobrevivência a curto prazo do corpo até que as condições voltem ao normal. Quando a compensação pelo metabolismo anaeróbio não é suficiente, os organismos podem entrar em "parada metabólica". A parada metabólica é caracterizada por uma diminuição da atividade, a interrupção do investimento em reprodução e crescimento, uma diminuição no catabolismo de carboidratos e aminoácidos, bem como um aumento nas reservas de glicogênio.

1 Quando o desequilíbrio entre demanda de energia e a energia disponível não pode mais
 2 ser compensado, o cessamento do metabolismo leva à morte dos indivíduos. Este é o limite letal
 3 da tolerância ao estresse. Deste ponto de vista, o balanço energético determina os limites da
 4 tolerância dos organismos ao estresse. A análise combinada de diferentes marcadores ligados
 5 ao metabolismo energético permite determinar a estratégia metabólica utilizada pelo corpo e,
 6 portanto, seus limites de tolerância. Todas essas respostas secundárias e terciárias geralmente
 7 são temporárias e são revertidas quando os hormônios do estresse retornam aos níveis basais.
 8 No entanto, quando os organismos estão sob estresse crônico, como em situações de exposição
 9 em campo a múltiplos contaminantes, o feedback negativo do cortisol pode ser interrompido
 10 (Romero, 2004). Nesse caso, o aumento da resposta ao estresse a longo prazo pode ter efeitos
 11 significativos na competência e sobrevivência dos peixes. Como resultado, as populações
 12 naturais de peixes sob estresse crônico podem sofrer queda na taxa de crescimento,
 13 expectativa de vida e reprodução, com potenciais consequências para as comunidades e o
 14 funcionamento dos ecossistemas (Gotto e Wallace, 2010).



15

16 **Figura 1.9.** Estratégias metabólicas em resposta ao estresse moderado ou extremo.
 17 (a) na situação normal, a energia do corpo é alocada para manutenção, atividade, crescimento,
 18 reprodução ou desenvolvimento. O excesso de energia é depositado em compostos de armazenamento,
 19 como glicogênio e lipídeos. A energia na forma de ATP é proporcionada pelo metabolismo aeróbico.
 20 Durante o estresse moderado os custos para manutenção aumentam e atendem as demandas de energia
 21 adicional para proteção contra o estresse e para reparação de danos (bI) ou (dependendo do estressor) a
 22 assimilação de alimentos e/ou capacidade de metabolismo aeróbico são prejudicadas (bII). Em ambos os
 23 casos, a capacidade aeróbica (escopo aeróbico, na parte inferior do esquema) diminui. São utilizadas
 24 reservas de energia e a energia atribuída a funções não vitais, como o crescimento e a reprodução,
 25 diminui. Durante o estresse extremo, o aumento progressivo da demanda de ATP para manutenção e/ou
 26 o comprometimento progressivo do metabolismo aeróbico supera o fornecimento de ATP através do
 27 metabolismo aeróbico (cI) e/ou a diminuição do metabolismo aeróbico resulta em um decréscimo
 28 significativo da energia disponível (cII). Em ambos os casos, o escopo metabólico aeróbico desaparece e
 29 o metabolismo anaeróbico compensa a falta de energia. Se isso não for suficiente, o organismo entra em
 30 "depressão metabólica" que reduz as taxas de turnover de energia à custa de desligar funções exigentes
 31 da ATP que não são essenciais para a sobrevivência imediata. (Adaptado de Sokolova et al., 2012).

1 1.5.2 Biomarcadores bioquímicos

2

3 1.5.2.1 Enzimas de biotransformação

4

5 Diversos parâmetros bioquímicos têm sido utilizados como biomarcadores,
6 principalmente as enzimas envolvidas no processo de detoxificação de xenobióticos e de seus
7 metabólitos, ou seja, as enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante.

8 A maior parte dos xenobióticos que entram nos organismos é lipofílica, permitindo a
9 estes compostos entrar nas células através das membranas, além de serem transportados por
10 lipoproteínas nos fluídos corpóreos. O processo de biotransformação, de um ponto de vista
11 fisiológico/toxicológico, tem como principal função a conversão de xenobióticos lipofílicos em
12 produtos mais hidrossolúveis, facilitando a sua conjugação e respectiva excreção, reduzindo,
13 deste modo, a sua atividade biológica. Este processo pode ser estruturado em reações de fase I
14 e reações de fase II (Van der Oost et al., 2003), mantendo-se, contudo, presentes os conceitos
15 de interdependência e continuidade entre estas duas etapas. Alguns autores consideram ainda
16 a existência de uma fase III. Apesar da maioria dos xenobióticos serem submetidos
17 consecutivamente às reações de fase I e de fase II, alguns podem ser sujeitos apenas a uma
18 dessas fases.

19 A fase I consiste em reações de oxidação, redução e hidrólise, e os produtos formados
20 são frequentemente mais reativos que os iniciais. A fase II consiste na conjugação do xenobiótico
21 ou de substâncias reativas provenientes da fase I, a fim de serem eliminadas como substâncias
22 inertes (Hodgson e Goldstein, 2001). A transformação metabólica ou biotransformação dos
23 compostos químicos nos organismos é essencial para alterar a atividade biológica do composto
24 e, conseqüentemente, cessar sua interação com a célula (Van der Oost et al., 2003).

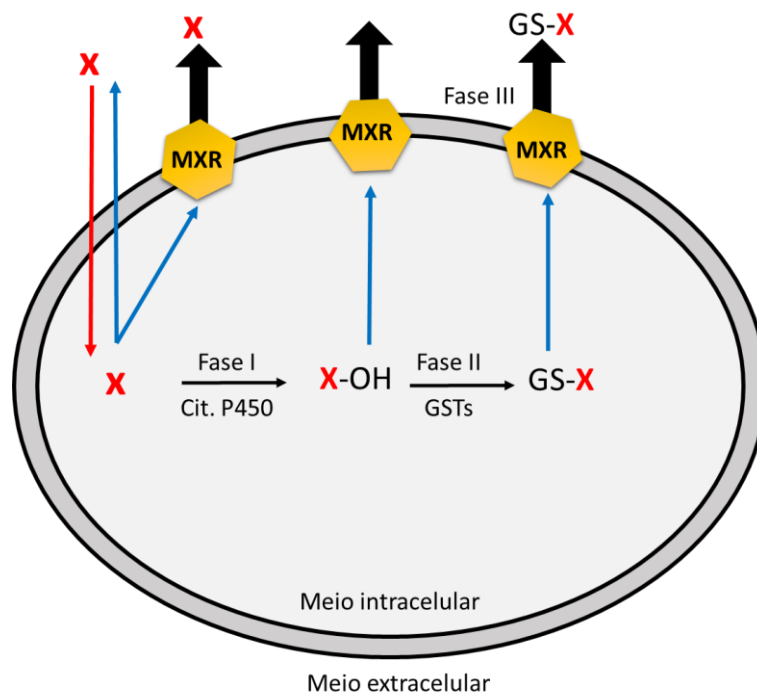
25 As enzimas envolvidas na Fase I de biotransformação pertencem às famílias do
26 citocromo P450, que são proteínas que contém um grupo heme envolvidas no transporte de
27 elétrons. Localizam-se no retículo endoplasmático e ocorrem em todas as espécies de animais e
28 plantas já estudados. Essas enzimas catalisam reações principalmente de hidroxilação, mas
29 também de epoxidação, desalquilação, desaminação, sulfoxidação e desulfuração. Algumas
30 formas de P450 catalisam várias reações, enquanto outras são mais específicas. Exemplos de
31 xenobióticos que são biotransformados nesta fase são os hidrocarbonetos policíclicos
32 aromáticos (HPAs) e muitos agrotóxicos (Di Giulio et al., 1995). A indução do P450 em fígado de
33 peixes é reconhecida como um excelente biomarcador de exposição a contaminantes orgânicos
34 antropogênicos, como HPAs, bifenilas policloradas (PCBs), dioxinas e furanos (Goksoyr e Förlin,
35 1992).

1 Através da alteração da estrutura química de compostos orgânicos, o citocromo P450
2 pode gerar compostos não tóxicos, menos ou mais tóxicos do que a substância original (Schlenk,
3 2008). Em estudos ecotoxicológicos com peixes, a família de citocromo P450 mais estudada é a
4 CYP1A. A atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) é uma das reações catalisadas pela
5 subfamília CYP1A (Bucheli e Fent, 1995). Ela catalisa uma reação de O-desalquilação,
6 dependente de NADPH, na qual o substrato é a 7-etoxiresorufina, o produto formado na reação,
7 a resorufina, pode ser medida espectrofluorimetricamente (Stegeman e Hann, 1994).

8 A biotransformação de Fase II consiste na conjugação de compostos tóxicos,
9 diretamente ou subsequentes à Fase I, com pequenas moléculas endógenas presentes nas
10 células (Hodgson et al., 2007). Diferente da Fase I, as enzimas envolvidas encontram-se
11 geralmente no citosol. As glutathione-S transferases (GSTs) são uma família de isoenzimas
12 envolvidas na conjugação de glutathione reduzida (GSH) com compostos eletrofílicos, reduzindo
13 a probabilidade desses compostos se ligarem a outras moléculas celulares, como o DNA
14 (Huggett et al., 1992).

15 Além de exercer o papel de conjugação, as GSTs apresentam outras funções importantes
16 na desintoxicação. Estas enzimas parecem estar envolvidas no carregamento de compostos
17 lipofílicos endógenos ou xenobióticos até os locais de ocorrência da biotransformação de Fase
18 I, são capazes de se ligar covalentemente a metabólitos ativos, como os epóxidos gerados na
19 Fase I, prevenindo que estes se liguem a outras moléculas e tem papel na conjugação de
20 produtos gerados na lipoperoxidação (Di Giulio et al., 1995). A GST possui ainda papel
21 importante no metabolismo de produtos secundários, incluindo a estabilização de flavonoides,
22 a redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcoois em conjunto com as peroxidases durante o
23 estresse oxidativo (Dixon e Laphorn, 2002). A elevação na atividade da GST hepática foi relatada
24 após exposição de organismos aquáticos a fungicidas, herbicidas, HPAs, PCBs e organoclorados
25 (Van der Oost et al., 2003).

26 Como as fases I e II transformam compostos lipofílicos em compostos mais hidrofílicos,
27 a difusão destes para fora das células através da bicamada lipídica se reduz. Assim,
28 transportadores de membrana do tipo ABC (ATP binding cassette), responsáveis pelo mecanismo
29 de resistência a multixenobióticos (MXR), fazem o efluxo destes metabólitos, caracterizando a
30 fase III de biotransformação (Bard, 2000). Acredita-se que, como em mamíferos, estes
31 transportadores nos peixes promovam a extrusão de xenobióticos não modificados e também
32 de metabólitos advindos da fase I ou da fase II de biotransformação (Fig. 1.10) (Epel et al., 2008).



1
2 **Figura 1.10** - Biotransformação de xenobióticos (X) dividida em três fases (I, II e III). Baseada em Bard
3 (2000).

4
5 É importante realçar que, apesar da maior parte dos compostos serem desintoxicados e
6 inativados por estas reações, alguns, que *per se* não são tóxicos, podem ser bioativados
7 originando intermediários reativos com potencial toxicidade. Os xenobióticos podem
8 igualmente causar o aumento da produção de ERO nas células por processos como a inibição do
9 transporte de elétrons nas mitocôndrias e consequente acumulação de intermediários
10 reduzidos (Nohl et al., 1981), inativação de enzimas antioxidantes (Odajima e Yamazaki, 1972;
11 Kono e Fridovich, 1932) e depleção de sequestradores de radicais (Winston e Di Giulio, 1991).
12 Compostos como metais de transição, quinonas, bupiridilos, herbicidas e compostos
13 nitroaromáticos são capazes de entrar em ciclo redox (que envolve a redução univalente do
14 xenobiótico a um intermediário reativo, por enzimas como a xantina oxidase e NADPH
15 citocromo P450 redutase, o qual transfere um elétron para o O₂, produzindo [•]O₂ e regenerando-
16 se o composto parental) e causar estresse oxidativo (Kappus e Sies, 1981). O ciclo redox
17 consome equivalentes celulares redutores, como o NADPH, o que poderá ter consequências ao
18 nível de outros processos metabólicos (Kappus e Sies, 1981). O ciclo pode ser repetido até que
19 o metabolito radical forme um aducto com uma macromolécula endógena (por exemplo, DNA
20 ou enzima) ou seja conjugado e eliminado.

21

22

1 1.5.2.2 Estresse oxidativo

2

3 As espécies reativas, ou mais conhecidas como radicais livres, podem ser definidos como
4 moléculas ou fragmentos moleculares contendo, em seus orbitais atômicos um ou mais elétrons
5 desemparelhados (Halliwell e Gutteridge, 1999), os quais geralmente lhes conferem uma
6 considerável reatividade. O estresse oxidativo está associado com a superprodução de espécies
7 reativas de oxigênio (ERO) pelas células, como por exemplo: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido
8 de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$), ou por espécies reativas de nitrogênio (ERN), como
9 o peroxinitrito ($ONOO^-$), óxido nítrico ($\bullet NO$) e o radical dióxido de nitrogênio ($\bullet NO_2$), os quais
10 podem levar a processos de oxidação de moléculas celulares. Estas espécies reativas são
11 produtos do metabolismo celular normal, reconhecidos por desempenharem um duplo papel,
12 deletério e benéfico (Valko et al., 2006).

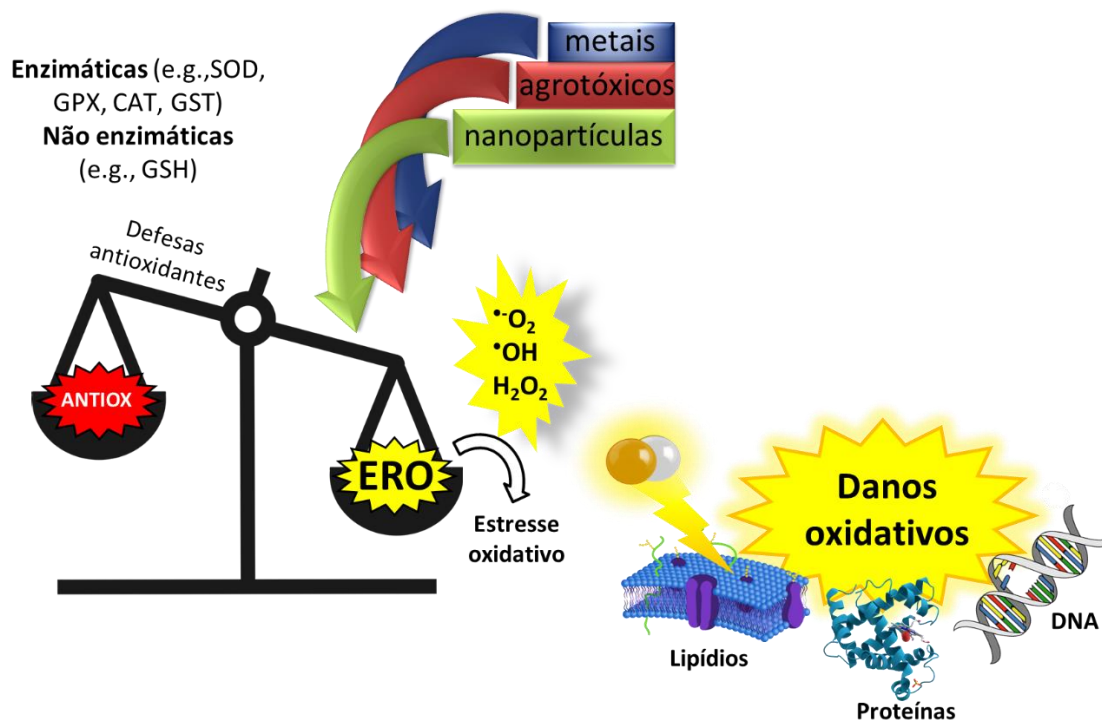
13 As ERO podem ser geradas em vários locais nas células (nas mitocôndrias, retículo
14 endoplasmático, lisossomos, membranas celulares, peroxissomos e citosol), durante processos
15 metabólicos normais, na sequência de processos de transporte de elétrons e da atividade
16 catalítica de algumas enzimas, autooxidação de compostos solúveis no citosol, bem como por
17 exposição a radiações e metabolização de xenobióticos. A produção de ERO pode ocorrer
18 intencionalmente como no caso da produção de $\bullet O_2$, HOCl (ácido hipocloroso) e H_2O_2 por
19 fagócitos ativados ou acidentalmente nos sistemas oxidativos catalisados por metais e
20 compostos orgânicos (Stadtman e Levine, 2000).

21 Em condições normais, as ERO desempenham um papel importante na regulação dos
22 processos celulares, incluindo a manutenção do potencial redox e a transmissão de sinais
23 celulares (Halliwell e Gutteridge, 1999). Elas também são usadas para combater invasões do
24 corpo por microorganismos (Lushchak, 2011; Regoli e Giuliani, 2014). No entanto, o aumento
25 intracelular de ERO pode causar danos aos lipídios da membrana, proteínas e DNA, resultando
26 em danos celulares e teciduais (Valavanidis et al., 2006).

27 Devido ao seu potencial prejudicial, uma regulação muito fina entre a produção e a
28 degradação das ERO são realizadas nas células. No entanto, em algumas situações, o saldo de
29 síntese/eliminação pode ser perturbado (Fig. 1.11). A maioria dos estressores provavelmente
30 causará formação excessiva de ERO em organismos aquáticos, incluindo estresse químico
31 (Slalinová et al., 2009; Lushchak, 2011), temperatura (Lushchak, 2011), nível de O_2 e CO_2 no
32 ambiente (Lushchak et al., 2011; Matoo et al., 2013), alterações na salinidade (Lushchak, 2011,
33 Wu et al., 2013) ou estresse biológico, como a predação (Guerra et al., 2013) e infecções
34 parasitárias (Lushchak, 2011). Isso é chamado de "estresse oxidativo". Muitos mecanismos estão
35 envolvidos na formação de ERO pelo estresse: aumento do metabolismo energético, ruptura do

1 equilíbrio de oxigênio celular ou funcionamento das mitocôndrias, perda de elétrons por metais,
 2 desintoxicação de xenobióticos etc. Estes mecanismos são discutidos em Luschchak (2011) e
 3 Regoli e Giuliani (2014).

4



5

6 **Figura 1.11** – Representação esquemática do desequilíbrio redox celular e o consequente estresse oxidativo, que afeta os componentes celulares. Adaptado de Braconi et al., 2011.

7

8

9 Estressores químicos, como os herbicidas, inseticidas e fungicidas, são moléculas pro-
 10 oxidantes porque causam a sobreprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células
 11 do organismos (Slalinová et al., 2009). Os mecanismos de produção de ERO por agrotóxicos são
 12 variados e dependem da molécula, incluindo alterações na cadeia transportadora de elétrons
 13 e/ou a perturbação do metabolismo mitocondrial, ciclos redox, metabolismo intracelular de
 14 xenobióticos, fotossensibilização, inibição de sistemas de defesa antioxidantes ou atividade
 15 anticolinérgica (Slalinová et al., 2009). O estresse oxidativo é cada vez mais frequentemente
 16 usado como biomarcador de poluição de ambientes aquáticos (Van der Oost et al., 2003;
 17 Valavanidis et al., 2006) para avaliar não só os efeitos da exposição, mas também entender o
 18 modo de ação dos contaminantes.

19

20 Existem várias maneiras de demonstrar a indução do estresse oxidativo sob o efeito do
 21 estresse químico, incluindo a medição da atividade de enzimas antioxidantes (por exemplo, a
 22 superóxido dismutase (GPx), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase
 (GR), glutathione peroxidase (GPx)) ou a concentração de antioxidantes não enzimáticos (p. ex.

1 glutationa reduzida, ácido ascórbico, tióis, etc.). A resposta dos sistemas oxidantes depende do
2 órgão estudado (por exemplo, fígado, brânquias, rim, cérebro), a espécie, o tempo de exposição
3 e a concentração dos agrotóxicos na água. O fígado é alvo da maioria desses estudos, uma vez
4 que desempenha um papel importante na desintoxicação de poluentes e geralmente mostra
5 maior sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por herbicidas do que as brânquias (Xing et
6 al., 2012) ou o cérebro (Sinhorin et al., 2014). Além disso, para a mesma espécie, o mesmo
7 contaminante e o mesmo órgão, cada sistema de defesa possui um padrão de resposta
8 diferente, particularmente em termos do limite de indução da resposta.

9 A interação das ERO com os constituintes celulares pode levar a lipoperoxidação (LPO),
10 oxidação de proteínas e danos oxidativos ao DNA (Sies, 1997). A LPO pode ser definida como
11 uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de radicais livres sobre os lipídeos
12 insaturados das membranas celulares, gerando principalmente L^\bullet , LO^\bullet e LOO^\bullet levando à
13 destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de trocas de metabólitos e, numa
14 condição extrema, à morte celular (Benzie, 1996). A LPO envolve a oxidação dos ácidos graxos
15 polinsaturados existentes nos fosfolipídios das membranas celulares, sendo estes os locais mais
16 susceptíveis às reações de oxidação. Entre os produtos finais formados durante o processo de
17 lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído
18 (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Halliwell e Gutteridge, 2007). O 4-HNE em níveis elevados
19 (acima de $1 \mu\text{M}$) pode atuar em processos citotóxicos e genotóxicos, provocando danos
20 mitocondriais e inibindo a ação de chaperonas, a síntese de DNA e de proteínas. Já o MDA pode
21 atacar proteínas quando presente em ambientes de baixo pH, resultando em modificações de
22 inúmeros resíduos de aminoácidos (especialmente lisina), também podendo reagir com bases
23 de DNA (especialmente guanina) gerando lesões mutagênicas (Halliwell e Gutteridge, 2007). A
24 LPO talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia um sequência de lesões
25 aos constituintes celulares. As alterações nas membranas levam a transtornos na
26 permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda
27 da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações
28 do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz celular (Halliwell e
29 Gutteridge, 2007).

30 A oxidação de proteínas pode ser reversível ou irreversível, dependendo do alvo e da
31 forma de dano oxidativo. Devido a alta reatividade do $\bullet\text{OH}$, ele exerce mais efeitos nocivos a
32 proteínas, enquanto que o H_2O_2 e O_2^\bullet ficam mais restritos aos ataques de grupos facilmente
33 oxidáveis, como os grupamentos tiólicos. Todos os resíduos de aminoácidos podem ser
34 oxidados por ERO, podendo também sofrer agregação e fragmentação, formando grupos
35 carbonilas (Valko et al., 2006; Trachootham et al., 2008). Estudos sobre a oxidação de proteínas

1 têm sido facilitados pela disponibilidade de um método simples e preciso, para quantificar a
2 oxidação de proteína: o ensaio da dosagem de proteínas carboniladas. O ensaio detecta os
3 grupos carbonila, por espectrofotômetro, após a sua reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina
4 (DNPH) (Levine et al., 1990). A dosagem de proteínas carboniladas em peixes pode fornecer
5 informações úteis e ser utilizada como biomarcador de danos oxidativos decorrentes da
6 exposição a contaminantes aquáticos.

9 **1.5.3 Biomarcadores de danos no DNA**

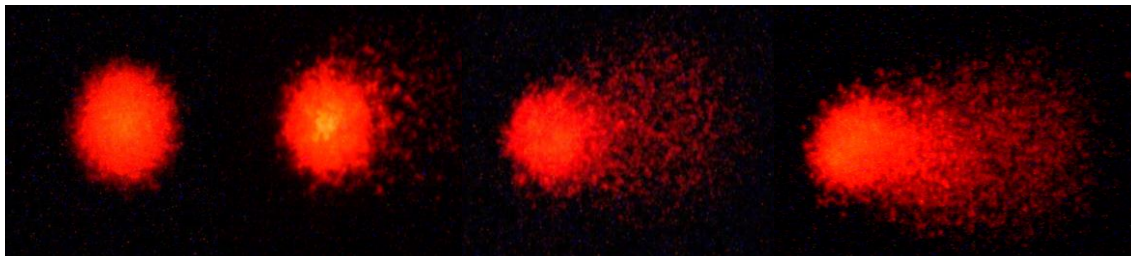
12 O DNA nos organismos aeróbicos está sempre sendo danificado e reparado, mesmo na
13 ausência de exposição a substâncias genotóxicas. Os processos causadores de dano incluem
14 fontes endógenas – como instabilidade do DNA (e.g. depurinação), erros espontâneos durante
15 a replicação e reparação do DNA, grandes quantidades de ERO resultantes do metabolismo do
16 oxigênio e produtos da LPO – e fontes exógenas, como radiação e xenobióticos. Apesar dos
17 sistemas biológicos estarem protegidos por antioxidantes e por mecanismos de reparação do
18 DNA, que reduzem substancialmente os níveis de dano, existe sempre um nível basal (Gupta e
19 Lutz, 1999).

20 Muitos compostos xenobióticos ou os seus metabólitos apresentam propriedades
21 genotóxicas, que lhes permitem induzir alterações no material genético. Alguns compostos
22 podem formar uma ligação covalente com DNA produzindo aductos (Dolcetti et al., 2002; Hellou
23 et al., 2006), os quais podem ser responsáveis por mutações impedindo a replicação fidedigna
24 do DNA ou desencadeando processos de reparação do mesmo, nem sempre efetivos
25 (Maccubbin, 1994). Existem igualmente outras alterações estruturais como quebras de cadeia
26 de DNA, perdas de bases, metilação e mutações que sugerem a exposição a compostos
27 genotóxicos.

28 Dentre as diferentes metodologias disponíveis para a avaliação de dano genético, a
29 avaliação das quebras de cadeia de DNA conjuntamente com o micronúcleo (MN) e as alterações
30 eritrocíticas nucleares (ENA) demonstraram elevada sensibilidade à exposição a compostos
31 xenobióticos, fornecendo informações relacionadas à danos moleculares (facilmente reparáveis
32 – quebras de cadeia) e danos subcelulares (irreversíveis – anomalias) (Oliveira et al., 2008). A
33 detecção de quebras nas cadeias de DNA representa uma técnica valiosa da Ecotoxicologia, uma
34 vez que tem revelado sensibilidade maior do que outros métodos comumente empregados na
35 avaliação de danos no material genético (Lee e Steinert, 2003). O ensaio alcalino do cometa (Fig.

1 1.12) é extremamente sensível e bastante útil para a detecção de danos no DNA (Singh et al.,
2 1988) e tem sido amplamente utilizado para avaliação de possíveis danos causados por
3 contaminantes ambientais. Este método é adequado para o monitoramento *in situ* de peixes
4 devido à sua facilidade, rapidez e baixo custo (Van der Oost et al., 2003).

5



6 **Figura 1.12** – Nucleóides de células sanguíneas de *Prochilodus lineatus*, com diferentes níveis de dano.
7 Foto: C.E.D. Vieira

8

9 Outro biomarcador genético bastante utilizado em peixes é o teste do micronúcleo
10 (MN). O teste do micronúcleo tem sido aplicado extensivamente em testes de genotoxicidade
11 de produtos químicos, pois estes são facilmente visualizados nos eritrócitos e são fortes
12 indicativos para mensuração de aberrações cromossômicas (Campana et al, 2003). O princípio
13 do teste baseia-se no fato de que, durante o processo de divisão celular, principalmente na
14 anáfase, as cromátides e os fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas
15 fibras do fuso para os polos opostos, enquanto que os fragmentos com centrômero o são. Após
16 a telófase, os cromossomos sem dano são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas.
17 No entanto, alguns elementos, normalmente muito pequenos, não são incluídos nos núcleos
18 formados e permanecem no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como
19 micronúcleos (Schmid, 1975).

20 Alterações morfológicas nos núcleos de eritrócitos de peixes também têm sido descritas
21 na literatura (Hose et al., 1987). Carrasco et al. (1990) caracterizaram estas alterações como
22 núcleos lobulados, núcleos segmentados, núcleos com constrição em formato de rim e núcleos
23 vacuolizados (Fig. 1.13). Sugere-se que as alterações eritrocíticas nucleares devem ser incluídas
24 nas análises de genotoxicidade em peixes complementando a contagem de micronúcleo, por
25 apresentar resultados mais confiáveis e mais completos (Ayllón e Garcia-Vazquez, 2001).

26 No geral, os biomarcadores de danos no DNA são ferramentas valiosas para avaliar os
27 efeitos da exposição aguda e crônica de organismos aquáticos às substâncias genotóxicas. Além
28 disso, como genotoxinas podem induzir mudanças no DNA que são passadas para gerações
29 futuras, este tipo de biomarcador pode ser usado de uma maneira preditiva, evitando
30 consequências ecológicas irreversíveis (Jha, 2008).

31

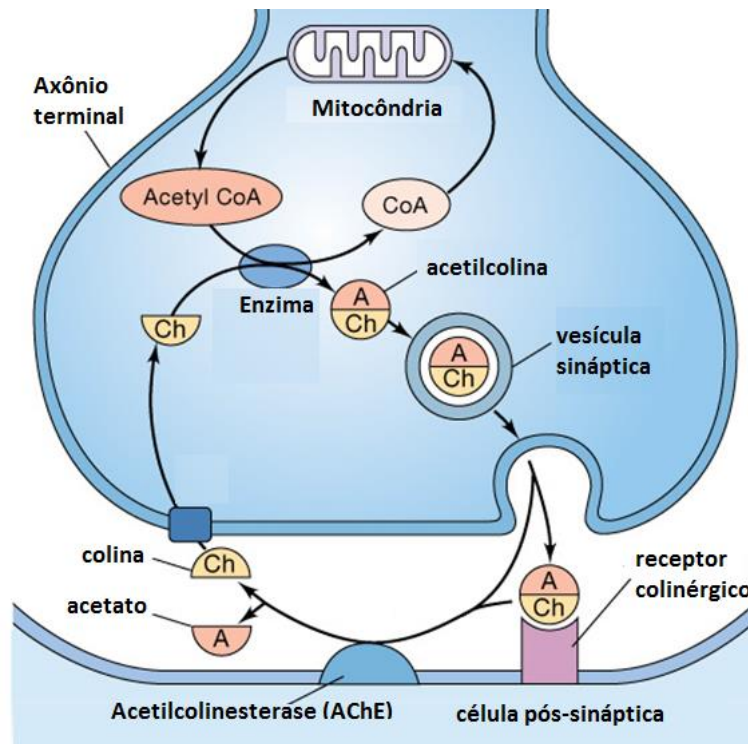


Figura 1.13 - Representação das principais alterações eritrocíticas nucleares e micronúcleo encontrados em peixes. Adaptado de Carrola et., 2014.

1.5.4 Biomarcadores de neurotoxicidade

Uma das atividades enzimáticas mais utilizadas para a avaliação de neurotoxicidade em peixes é a acetilcolinesterase (AChE). Visto que essa enzima é o alvo de inseticidas organofosforados e carbamatos, esse biomarcador é amplamente empregado em toxicologia aquática e um dos biomarcadores mais antigos (Payne et al., 1996). A AChE é uma enzima chave no processo de transmissão do impulso nervoso, sendo responsável pela hidrólise da acetilcolina em acetato e colina (Fig. 1.14). Durante a transmissão normal do impulso nervoso, a acetilcolina é liberada na sinapse para excitar um receptor. Se ela não for rapidamente hidrolisada, a célula pós-sináptica será constantemente excitada, resultando em estimulação contínua, o que pode levar à tetania, paralisia e até a morte do animal.

Embora a atividade da AChE tenha sido relacionada à exposição a inseticidas organofosforados e carbamatos, estudos recentes demonstram que as acetilcolinesterases são também sensíveis a outros tipos de contaminantes ambientais como metais, detergentes, agrotóxicos a base de glifosato, piretróides, além de misturas complexas de poluentes (Vale, 1998; Penã-Llopis et al., 2003; Ferrari et al., 2004; Monteiro et al., 2004; Modesto e Martinez, 2010a; Modesto e Martinez, 2010b; Piner e Üner, 2014). Classicamente, a atividade a AChE tem sido frequentemente utilizada como biomarcador para a verificação dos efeitos primários da contaminação em diversos organismos, incluindo peixes, e na avaliação da qualidade das águas (Sancho et al., 2000; Lionetto et al., 2003; Vieira et al., 2016; 2017).



1
2 **Figura 1.14-** Representação esquemática da síntese e reciclagem da acetilcolina e da ação da
3 acetilcolinesterase (AChE) na sinapse. Fonte: adaptada de <http://peaknootropics.com>

5 **1.5.5 Biomarcadores osmoiônicos**

7 Nos organismos aquáticos, a manutenção de um equilíbrio iônico interno é de suma
8 importância para o balanço entre a entrada de água e a saída de íons. Teleosteos dulcícolas são
9 hiperosmóticos em relação à água-doce, situação que estabelece um constante gradiente
10 osmótico para entrada de água no organismo, ao mesmo tempo em que favorece a perda
11 difusional de íons através do epitélio branquial. A captação de água nos teleosteos dulcícolas é
12 balanceada através de altas taxas de filtração glomerular e da produção de uma copiosa
13 quantidade de urina, sendo que a perda de sais advinda desses processos é compensada por
14 meio da reabsorção tubular dos íons necessários. A perda de íons na urina e por difusão através
15 das brânquias é balanceada por mecanismos ativos de captação existentes no epitélio branquial,
16 além do ganho iônico que ocorre através da alimentação (Evans et al., 2005). Os íons inorgânicos
17 Na^+ , K^+ e Ca^{2+} têm papel essencial em funções metabólicas e fisiológicas; o Na^+ e o Cl^- são os
18 principais cátion e ânion do fluido extracelular, ao passo que o K^+ é o cátion principal do fluido
19 intracelular (Sathya et al., 2012).

20 Os eletrólitos plasmáticos perfazem a maior parte das partículas osmoticamente ativas,
21 além de exercerem importantes funções, como proporcionar sistemas tampão e os mecanismos
22 para o equilíbrio ácido-base. Além disso, esses íons fornecem o balanço iônico adequado e

1 necessário para as funções tissulares, especialmente nas porções neuromusculares (Suvetha et
2 al., 2010).

3 Desequilíbrios iônicos em peixes podem levar a danos às funções fisiológicas destes
4 animais. Segundo Evans (1990), os peixes possuem problemas crônicos no balanço hídrico e de
5 sais, devido aos gradientes iônicos e osmóticos que atuam através do fino epitélio branquial. Os
6 peixes são extremamente sensíveis a contaminantes presentes na água, tendo em vista que
7 estes afetam as brânquias ao aumentar a permeabilidade do epitélio branquial à água e aos íons,
8 além de inibir a atividade de troca iônica das células cloreto (CC), ionócitos ou células ricas em
9 mitocôndrias (CRM) (Bonga e Lock, 1992). As ATPases são enzimas altamente conservadas,
10 desempenham um importante papel nos transportes de membrana, inclusive nos transportes
11 iônicos (Reddy e Phillip, 1994), e podem ser consideradas indicadores de toxicidade (Yadwad et
12 al., 1990).

13 A brânquia desempenha papel principal na respiração, regulação ácido-básica e
14 osmótica, além da excreção de resíduos nitrogenados. Exceto pela função respiratória, o rim
15 também é um órgão multifuncional e age como coadjuvante da brânquia nas demais atividades
16 de manutenção da homeostase.

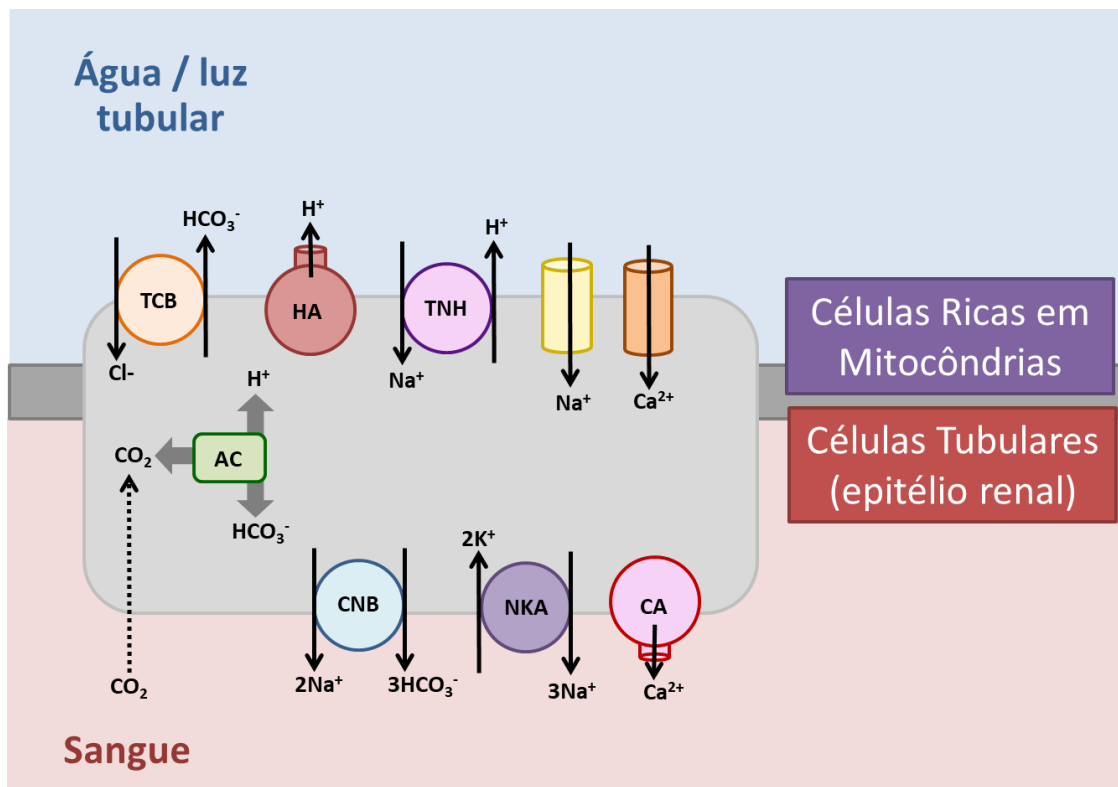
17 A Na^+/K^+ -ATPase (NKA) está localizada na membrana basolateral das CRM (Fig. 1.15) e
18 está envolvida na geração de força motriz para o transporte ativo de eletrólitos através dos
19 epitélios. Para obtenção de cálcio exógeno e demais íons, os peixes de água doce dependem dos
20 componentes da dieta, ou da captação ativa realizada pela brânquia (Hwang et al., 1996). A Ca^{2+} -
21 ATPase (CATPase) branquial é responsável pela absorção dos íons cálcio (Ca^{2+}) (Fig. 1.15)
22 presente em baixas concentrações na água doce, enquanto a CATPase renal é responsável pela
23 reabsorção do Ca^{2+} do filtrado glomerular para o plasma sanguíneo.

24 Em peixes dulcícolas, os processos bioquímicos envolvidos com a regulação iônica não
25 podem ser separados do controle ácido-básico, porque ambos ocorrem nos mesmos locais e
26 compartilham as mesmas vias. A maioria dos peixes mantém o pH interno ajustando a
27 concentração de bicarbonato plasmático pela excreção preferencial de H^+ ou HCO_3^- , e assim
28 como a regulação osmoiônica o rim tem papel secundário na manutenção ácido-básica em
29 relação às brânquias (Evans et al., 2005).

30 Os efluxos dos íons H^+ e do HCO_3^- estão acoplados ao influxo de Na^+ e Cl^-
31 respectivamente. Para excreção de H^+ existe uma H^+ -ATPase (HATPase) (Fig. 1.15) na região
32 apical das membranas de células epiteliais, que bombeia prótons da célula para o meio externo,
33 o que por sua vez gera um gradiente elétrico intracelular negativo (Lin et al., 1994; Lin e Randall,
34 1995). Esta condição favorece o influxo do Na^+ por difusão via canal de sódio (Fig 1.15), o
35 principal mecanismo osmorregulatório em peixes de água-doce para absorção de Na^+ (Lin e

1 Randal, 1995). A metaloenzima anidrase carbônica (AC) citosólica, catalisa a hidratação do CO_2
 2 para formar HCO_3^- e H^+ que é secretado pela HATPase apical. A NKA bombeia Na^+ através da
 3 membrana basolateral, favorecendo a entrada de Na^+ do meio aquático para as células. O Na^+ ,
 4 em conjunto com o HCO_3^- , produzido pela AC, é transportado pelo cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$
 5 (Fig. 1.15) (Evans et al., 2005).

6



7

8 **Figura 1.15** - Modelos de CRM de peixes de água doce. Transporte de H^+ , HCO_3^- , Na^+ , K^+ e de Ca^{2+} , AC –
 9 anidrase carbônica; TNH – transportador Na^+/H^+ ; HA – HATPase; TCB – transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$; CNB –
 10 cotransportador de Na^+ e HCO_3^- ; NKA - Na^+K^+ ATPase; CA – CATPase, Adaptado de Evans, 2005; Gilmour
 11 e Perry, 2009

12

13 1.5.6 Biomarcadores histológicos

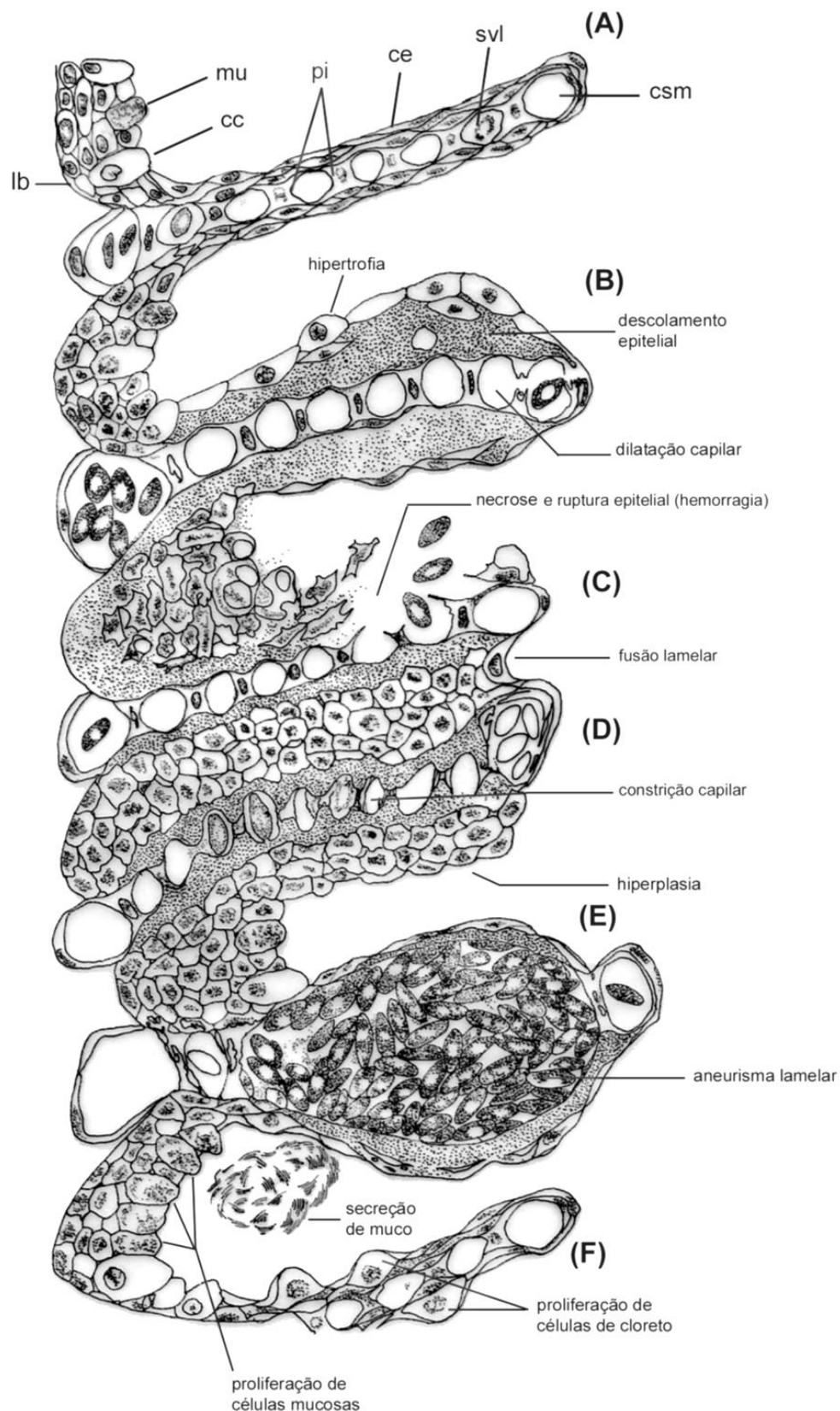
14

15 Modificações morfológicas em diferentes órgãos de peixes também são
 16 frequentemente associadas a exposição à contaminantes ambientais. A histologia representa
 17 um instrumento útil para a avaliação do grau de contaminação aquática, como um indicador de
 18 exposição a contaminantes (Cengiz, 2006). A análise histológica é um método rápido e eficiente
 19 para se determinar os efeitos dos agentes químicos em tecidos e órgãos, pois ocorrem
 20 alterações na morfologia em resposta ao estresse sub-letal ou crônico (Johnson, 1993). Há um
 21 grande número de estudos de avaliações de risco ambientais que utilizam os biomarcadores
 22 histopatológicos, todavia, a ausência de dados numéricos dificulta o estabelecimento de

1 relações de causa e efeito entre a patologia observada e os contaminantes. Dessa forma, tais
2 estudos têm focado em índices histopatológicos que forneçam dados numéricos baseados em
3 abordagens semi-quantitativas (Costa et al., 2009).

4 Em termos gerais, os resultados obtidos na avaliação de níveis de organização biológica
5 mais baixos, como as respostas bioquímicas e moleculares, são mais específicos, sensíveis e
6 apresentam alta reprodutibilidade. No entanto, estes são mais difíceis de ser correlacionados a
7 efeitos ecológicos. Por outro lado, as respostas obtidas em níveis mais altos de organização,
8 como por exemplo em populações e comunidades, indicam diretamente o status do
9 ecossistema, sendo relevantes em avaliações ambientais; entretanto, essas respostas são de
10 difícil acesso, principalmente considerando-se as avaliações *in loco*. Dessa forma, as avaliações
11 histopatológicas, as quais são relativamente fáceis de ser determinadas, atuam como um vínculo
12 entre o *fitness* individual e os efeitos ecológicos, permitindo a extrapolação das respostas
13 individuais a populações (Au, 2004; Schlenk et al., 2008).

14 Os principais tecidos selecionados para avaliação de efeitos histopatológicos são
15 aqueles envolvidos nas rotas de exposição ao xenobiótico, assim com a metabolização do
16 mesmo. Os sintomas histopatológicos descritos em peixes expostos a contaminantes podem
17 afetar o organismo através de perturbações na homeostase e no funcionamento adequado de
18 importantes processos biológicos, como a desintoxicação, osmoregulação, respiração, entre
19 outros (Au, 2004). O fígado é o principal órgão de biotransformação de xenobióticos e
20 provavelmente de excreção de metais pesados, além de atuar na digestão, no armazenamento
21 de energia e no metabolismo de hormônios sexuais (Hinton et al., 2001). De acordo com Hinton
22 e Laurén (1990), este órgão é essencial para o metabolismo e a excreção de substância tóxicas.
23 Dessa forma, a avaliação histopatológica de fígado em peixes expostos a poluentes fornece
24 subsídios para a elucidação da toxicidade que prejudica tais funções. O rim dos peixes recebe
25 grande quantidade de sangue que parte das brânquias, e portanto é passível de sofrer alterações
26 promovidas pelos contaminantes transportados pelo sangue, e desempenha funções
27 importantes relacionadas ao balanço hídrico e à manutenção de um ambiente interno estável,
28 atuando assim nos processos de excreção de resíduos nitrogenados e de osmorregulação
29 (Cengiz, 2006). As brânquias dos peixes são órgãos multifuncionais responsáveis pela respiração,
30 osmorregulação, equilíbrio ácido-base e excreção de produtos nitrogenados. Este órgão é
31 bastante sensível a alterações da água e poluentes, visto que os filamentos branquiais e as
32 lamelas fornecem uma grande superfície de contato direto e contínuo com a água (Au, 2004).
33 As principais histopatologias encontradas nas brânquias são ilustradas na Fig. 1.16.



1

2 **Figura 1.16** - Diagrama esquemático das lesões branquiais mais comuns, induzidas por irritantes. Seis
3 lamelas respiratórias são mostradas: **A** (normal), **B a F** (alteradas). Abreviações: **lb** – lâmina basal; **cc**
4 – célula de cloreto; **mu** – célula mucosa; **pi** – célula pilar; **ce** – célula epitelial lamelar; **svl** – seio venoso
5 lamelar; **csm** – canal sanguíneo marginal (modificada de Mallat, 1985).

6

1.6 *Prochilodus lineatus* COMO MODELO BIOLÓGICO

Os peixes possuem muitas características que justificam seu uso em análises ecotóxicológicas: são componentes críticos do ecossistema pois podem estar no ápice da cadeia alimentar aquática, funcionando como bioacumuladores de contaminantes; servem como modelos para outros vertebrados (anfíbios, aves, répteis, mamíferos e seres humanos), têm o metabolismo adaptado para inativar muitos toxicantes potenciais além de ser passíveis de estudos de campo e de laboratório (Embry et al., 2010). Por apresentar todas essas vantagens, os peixes têm sido utilizados em ensaios de avaliação do impacto ambiental de produtos químicos diversos, para avaliações de efluentes e monitoramento da qualidade de águas superficiais (García-Camero et al. 2012; Galus et al. 2013).

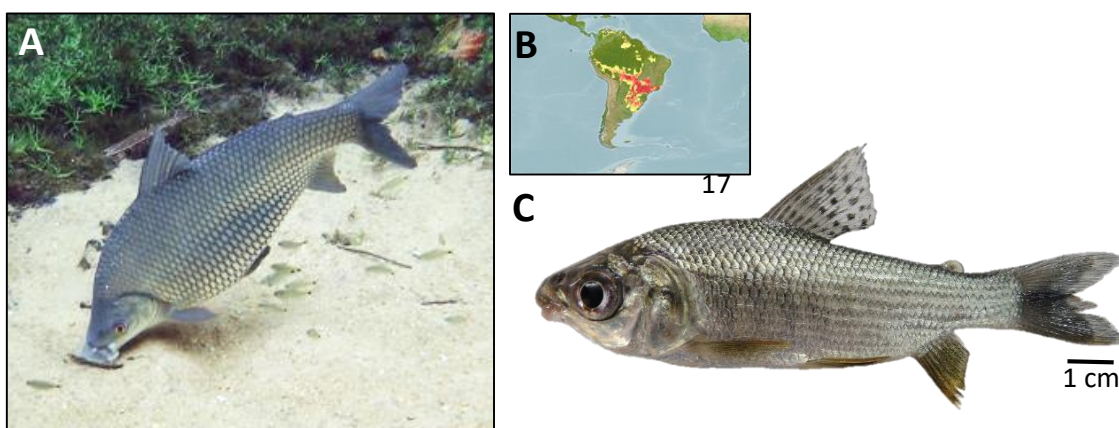


Figura 1.17 – (A) Exemplar adulto de *P. lineatus* se alimentando em seu ambiente natural, (B) mapa da distribuição nativa da espécie na América do Sul e (C) exemplar juvenil utilizado nos experimentos desta tese. Fonte: (A) <http://criapeixe.blogspot.com.br/2013/04/curimba-criacao-em-consorcio-com-outras.html>; (B) <http://www.fishbase.org/summary/SpeciesSummary.php?id=13056&lang=portuguese>; (C) C.E.D.Vieira.

Segundo Valenciennes (1836), a espécie *P. lineatus* ocupa a seguinte classificação sistemática:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Divisão: Teleostei

Superordem: Acanthopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus lineatus*

As espécies da família Prochilodontidae (onde está incluído o gênero *Prochilodus*) possuem como características em comum corpo de porte médio a grande, iliofagia (alimentam-se de detritos nos fundos lamacentos), reofilia (dependem da correnteza do ambiente natural

1 fluvial) e capacidade migratória durante o período de piracema. O gênero *Prochilodus* destaca-
2 se por sua ampla distribuição na região Neotropical, e possui 13 espécies descritas até o
3 momento (Reis et al., 2003).

4 Quanto à morfologia, os representantes desse gênero possuem lábios grossos, móveis
5 e providos de denticulos, escamas ctenóides (Castro, 1990) formando o anel etário durante a
6 época da desova (Godoy, 1975). Espécies de *Prochilodus* são conhecidas no Brasil pelos nomes
7 populares de curimatá, curimba, curimatã, curimatã-pioa, curimatã-pacu, papa-terra e
8 corimatá. As espécies de *Prochilodus* possuem características reprodutivas em comum, tais
9 como: desova única por temporada com elevado número de óvulos, fecundação externa e
10 ausência de cuidado parental (Lowe-McConnell, 1999).

11 A espécie *P. lineatus* (Valenciennes, 1836), conhecida popularmente como curimatá,
12 encontra-se amplamente distribuída em toda a bacia dos rios Paraná-Paraguai e no Rio Paraíba
13 do Sul (na costa sudeste do Brasil) (Castro, 1990). Entre as características diagnósticas de *P.*
14 *lineatus* estão: nadadeira caudal sem manchas negras, presença de linha lateral completa com
15 44 a 50 escamas e presença de 42 a 44 vértebras (Castro, 1990) e é a maior espécie da família,
16 podendo atingir até 74 cm de comprimento (Nelson et al., 2016).

17 Esta espécie é abundante na região do Alto rio Paraná e segundo Shibata et al. (2007) é
18 a terceira espécie de maior ocorrência na bacia hidrográfica do rio Tibagi. Os indivíduos da
19 família Prochilodontidae chegam a representar de 50 a 80% da biomassa de peixes em um rio
20 (Taylor et al., 2006). Além disso, *P. lineatus* desempenha importante papel ecológico (Botta et
21 al., 2010; Costa Filho e Gaya, 2012) e tem grande importância econômica, destacando-se como
22 fonte de renda e proteína para a população humana (Agostinho e Gomes, 2005).

23 Outra característica importante de *P. lineatus* é a sensibilidade a xenobióticos avaliada
24 em testes ecotoxicológicos com poluentes de naturezas diversas e as características alimentares
25 desta espécie, que o torna vulnerável a contaminantes presentes tanto na água quanto no
26 sedimento. Entre os poluentes que conhecidamente geram efeitos tóxicos agudos nesta espécie
27 estão os metais chumbo (Monteiro et al., 2011, Ribeiro et al., 2014), cobre (Nascimento et al.,
28 2012; Simonato et al., 2016), alumínio (Camargo et al., 2009), níquel (Palermo et al., 2015) e
29 cádmio (Silva e Martinez, 2014) e compostos orgânicos como os herbicidas glifosato (Langiano
30 e Martinez, 2008), atrazina (Santos e Martinez, 2012) e clomazone (Pereira et al., 2013) e o
31 inseticida endosulfan (Bacchetta et al., 2011), além de derivados do petróleo, como a gasolina
32 (Simonato et al., 2011) e diesel (Vanzela et al., 2007). Esta espécie também já foi empregada
33 satisfatoriamente em estudos *in situ* para monitoramento da qualidade de ambientes aquáticos
34 sobre influência de diversas atividades humanas (Camargo e Martinez, 2006; Cazenave et al.,
35 2014; Vieira et al., 2016; Lunardelli et al., 2018; Pérez et al., 2018).

1 1.7 JUSTIFICATIVA

2

3 Esta tese visa contribuir para preencher algumas lacunas dentro da Ecotoxicologia,
4 buscando uma melhor compreensão de como a contaminação complexa e difusa em ambientes
5 agrícolas sul-americanos pode afetar a saúde de peixes expostos a estes contaminantes, por
6 meio de múltiplos *endpoints* em diferentes níveis de organização biológica e em tempos curtos
7 e prolongados de exposição.

8 Apesar da ênfase dada aos estudos de campo e ao maior realismo ecológico desta
9 abordagem, os testes em laboratório também são de extrema relevância e indispensáveis
10 dentro da Ecotoxicologia, pois permitem o estabelecimento das relações de causa e efeito, assim
11 como comparações entre a toxicidade de compostos isolados ou em misturas mais simples. O
12 mercado mundial de agrotóxicos passa por constantes modificações, e os padrões de consumo
13 assim como os ingredientes ativos utilizadas são substituídos por outros que sejam mais efetivos
14 no controle do organismo-alvo indesejado e “menos” prejudiciais ao ambiente. Neste contexto,
15 é importante avaliar os efeitos isolados destes “novos” contaminantes liberados no ambiente
16 sobre os organismos não-alvo, como os inseticidas neonicotinóides e piretróides, buscando-se
17 compreender melhor os mecanismos de toxicidade e relações causa e efeito nestas espécies.

18 Os biomarcadores são ferramentas amplamente difundidas dentro da Ecotoxicologia
19 aquática. Entretanto, a importância de estudos ambientais baseados nestas ferramentas tem
20 sido questionada, principalmente pelo fato de que os mesmos não necessariamente têm
21 reflexos negativos em níveis mais elevados de organização biológica. O maior problema pode
22 estar relacionado com a falta de conhecimento sobre as relações entre biomarcadores com os
23 parâmetros considerados “ecologicamente relevantes” e mais pesquisas são necessárias para
24 que se possa tirar o máximo proveito dessas ferramentas. Neste contexto, buscamos nesta tese
25 utilizar múltiplos biomarcadores em nível molecular, celular e tecidual e integrar estas respostas
26 com biomarcadores em nível individual, como o crescimento e o comportamento, em múltiplos
27 tecidos e órgãos dos peixes, de maneira a obter uma visão mais holística dos efeitos de
28 contaminantes agrícolas em espécies de ambientes tropicais.

29

30

31

32

33

1 1.8 OBJETIVOS

2

3 1.8.1 Objetivo geral

4

- 5 ➤ Avaliar os efeitos promovidos pela exposição a contaminantes agrícolas, tanto em
6 situações de misturas complexas de campo quanto isoladamente, em laboratório, por
7 meio da análise de bioacumulação e de múltiplos biomarcadores em diferentes órgãos
8 do teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus*.

9

10 1.8.2 Objetivos específicos

11 Considerando o objetivo geral do trabalho, os objetivos específicos foram:

12

- 13 I. Avaliar a ocorrência de agrotóxicos de uso atual (CUPs) e organoclorados (OCPs) em dois
14 ambientes dulcícolas susceptíveis à contaminação agrícola e verificar a bioacumulação
15 destes compostos bem como os potenciais efeitos destes contaminantes em juvenis de
16 curimbas confinados *in situ* nestes locais por 120 dias;
- 17 II. Avaliar os efeitos destes contaminantes no fígado dos peixes por meio de
18 biomarcadores relacionados a processos de desintoxicação, defesas antioxidantes,
19 danos oxidativos e genéticos e comprometimento morfofuncional do órgão;
- 20 III. Identificar as alterações metabólicas e fisiológicas promovidas pela exposição à
21 multiestressores em campo e como estas alterações em nível subindividual podem
22 afetar o crescimento e performance natatória dos peixes ao longo do tempo;
- 23 IV. Quantificar a presença de metais no ambiente e em diferentes órgãos dos peixes
24 confinados *in situ* ao longo de 120 dias e as possíveis interferências destes metais em
25 parâmetros osmorregulatórios e na morfologia das brânquias e rim;
- 26 V. Integrar as múltiplas análises químicas e de biomarcadores buscando-se determinar
27 quais as respostas mais sensíveis e como estas se correlacionam espacial e
28 temporalmente;
- 29 VI. Verificar os efeitos agudos isolados dos inseticidas imidacloprid e lambda-cialotrina, em
30 concentrações ambientalmente relevantes, nos diferentes órgãos de *P. lineatus*;
- 31 VII. Definir *endpoints* adequados para diagnosticar e monitorar os efeitos de contaminantes
32 agrícolas em peixes em diferentes abordagens ecotoxicológicas.

33

34

35

1 1.9 REFERÊNCIAS

- 2
- 3 Agbohessi, P. T., Toko, I. I., Ouédraogo, A., Jauniaux, T., Mandiki, S. N. M., & Kestemont,
4 P. (2015). Assessment of the health status of wild fish inhabiting a cotton basin
5 heavily impacted by pesticides in Benin (West Africa). *Science of the Total*
6 *Environment*, 506, 567-584.
- 7 Agostinho, A. A., & Gomes, L. C. (2005). O manejo da pesca em reservatórios da bacia
8 do alto rio Paraná: avaliação e perspectivas. *Nogueira, C. & R. Henry. Ecologia de*
9 *reservatórios: Impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata*, 23-
10 55.
- 11 Albuquerque, A. F., Ribeiro, J. S., Kummrow, F., Nogueira, A. J. A., Montagner, C. C., &
12 Umbuzeiro, G. A. (2016). Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review.
13 *Environmental Science: Processes & Impacts*, 18(7), 779-787.
- 14 Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., ...
15 & Serrano, J. A. (2010). Adverse outcome pathways: a conceptual framework to
16 support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology*
17 *and Chemistry*, 29(3), 730-741.
- 18 Aprea, C., Colosio, C., Mammone, T., Minoia, C., & Maroni, M. (2002). Biological
19 monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *Journal of*
20 *Chromatography B*, 769(2), 191-219.
- 21 Au, D. W. T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine
22 pollution monitoring: a review. *Marine pollution bulletin*, 48(9-10), 817-834.
- 23 Ayllon, F., & Garcia-Vazquez, E. (2001). Micronuclei and other nuclear lesions as
24 genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and*
25 *Environmental Safety*, 49(3), 221-225.
- 26 Bacchetta, C., Cazenave, J., & Parma, M. J. (2011). Responses of biochemical markers in
27 the fish *Prochilodus lineatus* exposed to a commercial formulation of endosulfan.
28 *Water, Air, & Soil Pollution*, 216(1-4), 39-49.
- 29 Bard, S. M. (2000). Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic
30 organisms. *Aquatic Toxicology*, 48(4), 357-389.
- 31 Barni, M. F. S., Ondarza, P. M., Gonzalez, M., Da Cuña, R., Meijide, F., Grosman, F., ... &
32 Miglioranza, K. S. (2016). Persistent organic pollutants (POPs) in fish with different
33 feeding habits inhabiting a shallow lake ecosystem. *Science of the Total*
34 *Environment*, 550, 900-909.
- 35 Barrionuevo, W. R., & Lanças, F. M. (2001). Extração em fase sólida (SPE) e micro
36 extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Química Nova*, 24(2), 172-
37 175.
- 38 Barry, M. J., & Logan, D. C. (1998). The use of temporary pond microcosms for aquatic
39 toxicity testing: direct and indirect effects of endosulfan on community structure.
40 *Aquatic Toxicology*, 41(1-2), 101-124.

- 1 Baršienė, J., Lehtonen, K. K., Koehler, A., Broeg, K., Vuorinen, P. J., Lang, T., ... & Repečka,
2 R. (2006). Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus*
3 *edulis*) in the Klaipėda-Būtingė area (Baltic Sea). *Marine Pollution Bulletin*, 53(8-9),
4 422-436.
- 5 Barton, B. A. (2002). Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference
6 to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and comparative biology*,
7 42(3), 517-525.
- 8 Beitinger, T. L. (1990). Behavioral reactions for the assessment of stress in fishes. *Journal*
9 *of Great Lakes Research*, 16(4), 495-528.
- 10 Beketov, M. A., & Liess, M. (2012). Ecotoxicology and macroecology—time for
11 integration. *Environmental Pollution*, 162, 247-254.
- 12 Beltuck, D. A., Benjamin, S., & Dawson, T. (1991). Groundwater contamination by
13 atrazine and its metabolites. In *ACS Symp Ser* (Vol. 459, pp. 254-273).
- 14 Benzie, I. F. F. (1996). Lipid peroxidation: a review of causes, consequences,
15 measurement and dietary influences. *International journal of food sciences and*
16 *nutrition*, 47(3), 233-261.
- 17 Bernier, N. J., & Peter, R. E. (2001). The hypothalamic–pituitary–interrenal axis and the
18 control of food intake in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*
19 *Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2-3), 639-644.
- 20 Blahová, J., Plhalová, L., Hostovský, M., Divišová, L., Dobšíková, R., Mikulíková, I., ... &
21 Svobodová, Z. (2013). Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after
22 subchronic exposure to atrazine. *Food and chemical toxicology*, 61, 82-85.
- 23 Bonga, S. W., & Lock, R. A. C. (1991). Toxicants and osmoregulation in fish. *Netherlands*
24 *Journal of Zoology*, 42(2), 478-493.
- 25 Botta, P., Sciara, A., Arranz, S., Murgas, L. D. S., Pereira, G. J. M., & Oberlender, G. (2010).
26 Estudio del desarrollo embrionario del sábalo (*Prochilodus lineatus*). *Archivos de*
27 *medicina veterinaria*, 42(2), 109-114.
- 28 Braconi, D., Bernardini, G., & Santucci, A. (2011). Linking protein oxidation to
29 environmental pollutants: redox proteomic approaches. *Journal of proteomics*,
30 74(11), 2324-2337.
- 31 Bradbury, S. P., & Coats, J. R. (1989). Comparative toxicology of the pyrethroid
32 insecticides. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 133-
33 177). Springer, New York, NY.
- 34 Brannstrom, C. (2009). South America's neoliberal agricultural frontiers: places of
35 environmental sacrifice or conservation opportunity. *AMBIO: A Journal of the*
36 *Human Environment*, 38(3), 141-149.
- 37 Brock, T. C., Crum, S. J., Deneer, J. W., Heimbach, F., Roijackers, R. M., & Sinkeldam, J. A.
38 (2004). Comparing aquatic risk assessment methods for the photosynthesis-
39 inhibiting herbicides metribuzin and metamiltron. *Environmental Pollution*, 130(3),
40 403-426.

- 1 Brodeur, J. C., Malpel, S., Anglesio, A. B., Cristos, D., D'Andrea, M. F., & Poliserpi, M. B.
2 (2016). Toxicities of glyphosate-and cypermethrin-based pesticides are antagonistic
3 in the ten-spotted livebearer fish (*Cnesterodon decemmaculatus*). *Chemosphere*,
4 *155*, 429-435.
- 5 Brodeur, J. C., Poliserpi, M. B., & Sánchez, M. (2014). Synergy between glyphosate-and
6 cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common
7 South American Toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere*, *112*, 70-76.
- 8 Bucheli, T. D., & Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for
9 environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical reviews in*
10 *environmental science and technology*, *25*(3), 201-268.
- 11 Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., & Viarengo, A.
12 (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal
13 environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total*
14 *Environment*, *247*(2-3), 295-311.
- 15 Camargo, M. M., & Martinez, C. B. (2006). Biochemical and physiological biomarkers in
16 *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern
17 Brazil. *Environmental toxicology and pharmacology*, *21*(1), 61-69
- 18 Camargo, M. M., Fernandes, M. N., & Martinez, C. B. (2009). How aluminium exposure
19 promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish
20 *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, *94*(1), 40-46.
- 21 Campana, M. A., Panzeri, A. M., Moreno, V. J., & Dulout, F. N. (2003). Micronuclei
22 induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-
23 cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology*, *26*(1), 99-103.
- 24 Carneiro FF, Pignati W, Rigotto RM, Friedrich K, Burigo AC. 2012. Dossie ABRASCO – Um
25 alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1, agrotóxicos, segurança
26 alimentar e nutricional e saúde [Portuguese]. Rio de Janeiro (BR): Associação
27 Brasileira de Saúde Coletiva. 88 p.
- 28 Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the piscine
29 micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant
30 effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *47*(11), 2123-2136.
- 31 Carriquiriborde, P., Díaz, J., Mugni, H., Bonetto, C., & Ronco, A. E. (2007). Impact of
32 cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean
33 production. *Chemosphere*, *68*(4), 613-621.
- 34 Carriquiriborde, P., Mirabella, P., Waichman, A., Solomon, K., Van den Brink, P. J., &
35 Maund, S. (2014). Aquatic risk assessment of pesticides in Latin America.
36 *Integrated environmental assessment and management*, *10*(4), 539-542.
- 37 Carrola, J., Santos, N., Rocha, M. J., Fontainhas-Fernandes, A., Pardal, M. A., Monteiro,
38 R. A., & Rocha, E. (2014). Frequency of micronuclei and of other nuclear
39 abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and
40 Ave estuaries—Portugal. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(9),
41 6057-6068.

- 1 Castro, R. M. C. (1990). Revisão taxonômica da família Prochilodontidae (Ostariophysi:
2 Characiformes). *Unpublished Ph.D. dissertation. São Paulo: Universidade de São*
3 *Paulo. 293pp.*
- 4 Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., & Parma, M. J. (2014).
5 Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: a field caging study.
6 *Ecological indicators, 38*, 104-112.
- 7 Cengiz, E. I. (2006). Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio*
8 after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and*
9 *Pharmacology, 22*(2), 200-204.
- 10 Chelinho, S., Lopes, I., Natal-da-Luz, T., Domene, X., Tenorio Nunes, M. E., Espíndola, E.
11 L., ... & Sousa, J. P. (2012). Integrated ecological risk assessment of pesticides in
12 tropical ecosystems: a case study with carbofuran in Brazil. *Environmental*
13 *toxicology and chemistry, 31*(2), 437-445.
- 14 Chrousos, G. P. (1998). Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive
15 response: The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Annals of the New York*
16 *Academy of Sciences, 851*(1), 311-335.
- 17 Costa Filho, J., & de Genova Gaya, L. (2012). Recent approaches of fish breeding.
18 Abordagens recentes do melhoramento genético de peixes. *Ambiência, 8*(1), 195-
19 210.
- 20 Costa, P. M., Diniz, M. S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., ... & Costa, M.
21 H. (2009). Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis*
22 exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach.
23 *Aquatic toxicology, 92*(3), 202-212.
- 24 Cox, C. (2001). Insecticide factsheet: imidacloprid. *J Pestic Reform, 21*(1), 15-21.
- 25 Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Lazzari, R., Duarte, M. F.,
26 ... & Vieira, V. P. (2006). Effects of clomazone herbicide on hematological and some
27 parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia*
28 *quelen*. *Ecotoxicology and environmental safety, 65*(1), 48-55.
- 29 Curnutte, J. T., & Babior, B. M. (1987). Chronic granulomatous disease. In *Advances in*
30 *human genetics* (pp. 229-297). Springer, Boston, MA.
- 31 Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein
32 carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta, 329*(1-2),
33 23-38.
- 34 Davidson, C., & Knapp, R. A. (2007). Multiple stressors and amphibian declines: dual
35 impacts of pesticides and fish on yellow-legged frogs. *Ecological Applications,*
36 *17*(2), 587-597.
- 37 Davies, P. E., Cook, L. S. J., & Goenarso, D. (1994). Sublethal responses to pesticides of
38 several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout.
39 *Environmental toxicology and chemistry, 13*(8), 1341-1354.
- 40 Dennis, N., Tiede, K., & Thompson, H. (2012). Repeated and multiple stress (exposure to
41 pesticides) on aquatic organisms. *EFSA Supporting Publications, 9*(10).

- 1 Depledge, M.H., 1993. Nondestructive biomarkers in vertebrates. Lewis Publishers, Boca
2 Raton, FL, USA.
- 3 Di Giulio, R. T., Benson, W. H., Sanders, B. M., & Van Veld, P. A. (1995). Biochemical
4 mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. *Fundamentals of aquatic*
5 *toxicology*, 2, 523e560.
- 6 Di Marzio, W. D., Sáenz, M. E., Alberdi, J. L., Fortunato, N., Cappello, V., Montivero, C.,
7 & Ambrini, G. (2010). Environmental impact of insecticides applied on biotech
8 soybean crops in relation to the distance from aquatic ecosystems. *Environmental*
9 *toxicology and chemistry*, 29(9), 1907-1917.
- 10 Dickson, K. L., Waller, W. T., Kennedy, J. H., & Ammann, L. P. (1992). Assessing the
11 relationship between ambient toxicity and instream biological response.
12 *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11(9), 1307-1322.
- 13 Dixon, D. P., Laphorn, A., & Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome*
14 *biology*, 3(3), reviews3004-1.
- 15 Dolcetti, L., Dalla Zuanna, L., & Venier, P. (2002). DNA adducts in mussels and fish
16 exposed to bulky genotoxic compounds. *Marine environmental research*, 54(3-5),
17 481-486.
- 18 Domagalski, J. L., Weston, D. P., Zhang, M., & Hladik, M. (2010). Pyrethroid insecticide
19 concentrations and toxicity in streambed sediments and loads in surface waters of
20 the San Joaquin Valley, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*,
21 29(4), 813-823.
- 22 Dores, E. F., Carbo, L., Ribeiro, M. L., & De-Lamonica-Freire, E. M. (2008). Pesticide levels
23 in ground and surface waters of Primavera do Leste Region, Mato Grosso, Brazil.
24 *Journal of chromatographic science*, 46(7), 585-590.
- 25 Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde / Organização
26 de Fernando Ferreira Carneiro, Lia Giraldo da Silva Augusto, Raquel Maria Rigotto,
27 Karen Friedrich e André Campos Búrigo. - Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo:
28 Expressão Popular, 2015.
- 29 Eggen, R. I., Behra, R., Burkhardt-Holm, P., Escher, B. I., & Schweigert, N. (2004). Peer
30 reviewed: Challenges in ecotoxicology.
- 31 Embry, M. R., Belanger, S. E., Braunbeck, T. A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D. E., ...
32 & Whale, G. (2010). The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard
33 and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology*, 97(2), 79-87.
- 34 England, K., O'Driscoll, C., & Cotter, T. G. (2004). Carbonylation of glycolytic proteins is a
35 key response to drug-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell death and*
36 *differentiation*, 11(3), 252.
- 37 Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C. N., MacManus-Spencer, L. A., Hamdoun, A., &
38 Smital, A. T. (2008). Efflux transporters: newly appreciated roles in protection
39 against pollutants. *Environmental Science & Technology*, v. 42, p. 3914–3920,
40 2008.
- 41 Evans, D. H. (1990). An emerging role for a cardiac peptide hormone in fish
42 osmoregulation. *Annual Review of Physiology*, 52(1), 43-60.

- 1 Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill:
2 dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and
3 excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85(1), 97-177.
- 4 Fabbri, E., Capuzzo, A., & Moon, T. W. (1998). The role of circulating catecholamines in
5 the regulation of fish metabolism: an overview. *Comparative Biochemistry and
6 Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 120(2), 177-192.
- 7 Ferrari, A., Venturino, A., & de D'Angelo, A. M. P. (2004). Time course of brain
8 cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute
9 azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius
10 auratus*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 57(3), 420-425.
- 11 Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P., & Garric, J. (2002).
12 Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology
13 and environmental safety*, 51(2), 145-153.
- 14 Furley, T. H., Brodeur, J., de Assis Silva, H. C., Carriquiriborde, P., Chagas, K. R., Corrales,
15 J., ... & Miguez, D. C. (2018). Toward sustainable environmental quality: Identifying
16 priority research questions for Latin America. *Integrated environmental
17 assessment and management*.
- 18 Galloway, T. S., Brown, R. J., Browne, M. A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M. B., &
19 Depledge, M. H. (2004). A multibiomarker approach to environmental assessment.
20 *Environmental Science & Technology*, 38(6), 1723-1731.
- 21 Galloway, T. S., Cole, M., & Lewis, C. (2017). Interactions of microplastic debris
22 throughout the marine ecosystem. *Nature ecology & evolution*, 1(5), 0116.
- 23 Galus, M., Jeyaranjan, J., Smith, E., Li, H., Metcalfe, C., & Wilson, J. Y. (2013). Chronic
24 effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in
25 zebrafish. *Aquatic toxicology*, 132, 212-222.
- 26 García-Camero, J. P., Catalá, M., & Valcárcel, Y. (2012). River waters induced
27 neurotoxicity in an embryo-larval zebrafish model. *Ecotoxicology and
28 environmental safety*, 84, 84-91.
- 29 Gibbons, D., Morrissey, C., & Mineau, P. (2015). A review of the direct and indirect
30 effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science
31 and Pollution Research*, 22(1), 103-118.
- 32 Gilmour, K. M., & Perry, S. F. (2009). Carbonic anhydrase and acid-base regulation in
33 fish. *Journal of Experimental Biology*, 212(11), 1647-1661.
- 34 Godoy, M. P. (1975). Peixes do Brasil, subordem Characoidei, bacia do Rio Mogi Guassu-
35 v. 1-4. Editora Franciscana, Piracicaba, SP.
- 36 Goksøyr, A., & Förlin, L. (1992). The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology
37 and environmental monitoring. *Aquatic toxicology*, 22(4), 287-311.
- 38 Goto, D., & Wallace, W. G. (2010). Bioenergetic responses of a benthic forage fish
39 (*Fundulus heteroclitus*) to habitat degradation and altered prey community in
40 polluted salt marshes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 67(10),
41 1566-1584.

- 1 Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid
2 insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987.
- 3 Graymore, M., Stagnitti, F., & Allinson, G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic
4 ecosystems. *Environment international*, 26(7-8), 483-495.
- 5 Gregory, T. R., & Wood, C. M. (1999). The effects of chronic plasma cortisol elevation on
6 the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of
7 juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 72(3), 286-295.
- 8 Gu, B. G., Wang, H. M., Chen, W. L., Cai, D. J., & Shan, Z. J. (2007). Risk assessment of λ -
9 cyhalothrin on aquatic organisms in paddy field in China. *Regulatory Toxicology
10 and Pharmacology*, 48(1), 69-74.
- 11 Guerra, C., Zenteno-Savín, T., Maeda-Martínez, A. N., Abele, D., & Philipp, E. E. R. (2013).
12 The effect of predator exposure and reproduction on oxidative stress parameters
13 in the Catarina scallop *Argopecten ventricosus*. *Comparative Biochemistry and
14 Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165(1), 89-96.
- 15 Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M. A., & Pacheco, M. (2012). DNA damage in fish
16 (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide—elucidation of organ-
17 specificity and the role of oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology
18 and Environmental Mutagenesis*, 743(1), 1-9.
- 19 Gupta, R. C., & Lutz, W. K. (1999). Background DNA damage for endogenous and
20 unavoidable exogenous carcinogens: a basis for spontaneous cancer incidence?
21 *Mutation research*, 424(1-2), 1-8.
- 22 Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford
23 University Press, USA.
- 24 Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. 4th.
25 Oxford University Press, USA.
- 26 Handy, R. D., Sims, D. W., Giles, A., Campbell, H. A., & Musonda, M. M. (1999). Metabolic
27 trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood
28 chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during
29 chronic dietary exposure to copper. *Aquatic Toxicology*, 47(1), 23-41.
- 30 Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., ... & Tsui, M. (2006).
31 Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we
32 underestimating the impact? *Environmental health perspectives*, 114(Suppl 1), 40.
- 33 He, L. M., Troiano, J., Wang, A., & Goh, K. (2008). Environmental chemistry, ecotoxicity,
34 and fate of lambda-cyhalothrin. In *Reviews of environmental contamination and
35 toxicology* (pp. 71-91). Springer New York.
- 36 He, Z. L., Yang, X. E., & Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and
37 impacts on the environment. *Journal of trace elements in medicine and biology*,
38 19(2-3), 125-140.
- 39 Hellou, J., Leonard, J., Collier, T. K., & Ariese, F. (2006). Assessing PAH exposure in feral
40 finfish from the Northwest Atlantic. *Marine pollution bulletin*, 52(4), 433-441.

- 1 Herrera, M., Castanheira, M. F., Conceição, L. E., & Martins, C. I. (2014). Linking risk
2 taking and the behavioral and metabolic responses to confinement stress in
3 gilthead seabream *Sparus aurata*. *Applied Animal Behaviour Science*, *155*, 101-
4 108.
- 5 Hinton, D. E. (1990). Integrative histopathological effects of environmental stressor on j
6 fishes. In *American Fisheries Society Symposium* (Vol. 8, pp. 51-66).
- 7 Hinton, D. E., Segner, H., & Braunbeck, T. (2001). Toxic responses of the liver. *Target*
8 *organ toxicity in marine and freshwater teleosts*, *1*, 224-268.
- 9 Hodgson, E., Das, P. C., Cho, T. M., & Rose, R. L. (2007). Phase 1 metabolism of toxicants
10 and metabolic interactions. *Molecular and Biochemical Toxicology, Fourth Edition*,
11 173-203.
- 12 Hodgson, E., Goldstein, J.A. (2001). Metabolism of toxicants: phase I reactions and
13 pharmacogenetics. In: Hodgson, E., Smart, R.C. (ed) *Introduction to biochemical*
14 *toxicology*. 3rd ed. New York, Wiley-Interscience, pp.67-113
- 15 Hontela, A. (1997). Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: Role of
16 glucocorticosteroid hormones. *Rev. Toxicol.* *1*, 1-46.
- 17 Hose, J. E., Cross, J. N., Smith, S. G., & Diehl, D. (1987). Elevated circulating erythrocyte
18 micronuclei in fishes from contaminated sites off southern California. *Marine*
19 *Environmental Research*, *22*(3), 167-176.
- 20 Huggett, R. J. (1992). *Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of*
21 *anthropogenic stress*. CRC Press.
- 22 Hunt, L., Bonetto, C., Resh, V. H., Buss, D. F., Fanelli, S., Marrochi, N., & Lydy, M. J. (2016).
23 Insecticide concentrations in stream sediments of soy production regions of South
24 America. *Science of the Total Environment*, *547*, 114-124.
- 25 Hwang, P. P., Tung, Y. C., & Chang, M. H. (1996). Effect of environmental calcium levels
26 on calcium uptake in tilapia larvae *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiology and*
27 *Biochemistry*, *15*(5), 363-370.
- 28 IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis,
29 2013. Agrotóxicos e Afins e Histórico das Vendas - 2000 a 2012. Available at.
30 http://ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/boletim%20de%20c
31 [omercializacao_2000_2012.pdf](http://ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/boletim%20de%20c).
- 32 Jabeen, F., Chaudhry, A. S., Manzoor, S., & Shaheen, T. (2015). Examining pyrethroids,
33 carbamates and neonicotinoids in fish, water and sediments from the Indus River
34 for potential health risks. *Environmental monitoring and assessment*, *187*(2), 29.
- 35 Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2010). Overview of the status and
36 global strategy for neonicotinoids. *Journal of agricultural and food chemistry*,
37 *59*(7), 2897-2908.
- 38 Jha, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay.
39 *Mutagenesis*, *23*(3), 207-221.

- 1 Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., ... & Fu, Z. (2010). Oxidative stress
2 response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish
3 (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78(7), 846-852.
- 4 Johnson, L. L., Stehr, C. M., Olson, O. P., Myers, M. S., Pierce, S. M., Wigren, C. A., ... &
5 Varanasi, U. (1993). Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder
6 (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States.
7 *Environmental science & technology*, 27(13), 2759-2771.
- 8 Kappus, H., & Sies, H. (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism:
9 redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, 37(12), 1233-1241.
- 10 Kassahn, K. S., Crozier, R. H., Pörtner, H. O., & Caley, M. J. (2009). Animal performance
11 and stress: responses and tolerance limits at different levels of biological
12 organisation. *Biological Reviews*, 84(2), 277-292.
- 13 King, R. S., Brain, R. A., Back, J. A., Becker, C., Wright, M. V., Toteu Djomte, V., ... &
14 Chambliss, C. K. (2016). Effects of pulsed atrazine exposures on autotrophic
15 community structure, biomass, and production in field-based stream mesocosms.
16 *Environmental toxicology and chemistry*, 35(3), 660-675.
- 17 Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of Biological*
18 *Chemistry*, 257(10), 5751-5754.
- 19 Kooijman, S. A. L. M. (2000). *Dynamic energy and mass budgets in biological systems*.
20 Cambridge university press.
- 21 Kooijman, S. A. L. M. (2010). *Dynamic energy budget theory for metabolic organisation*.
22 Cambridge university press.
- 23 Krieger, R. (2010). *Hayes' handbook of pesticide toxicology* (Vol. 1). Academic press.
- 24 La Point, T. W., & Waller, W. T. (2000). Field assessments in conjunction with whole
25 effluent toxicity testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(1), 14-24.
- 26 Lam, P. K. (2009). Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean & Coastal*
27 *Management*, 52(7), 348-354.
- 28 Lam, P. K., & Gray, J. S. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring
29 programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 46(2), 182-186.
- 30 Langiano, V.C., & Martinez, C. B. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based
31 herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry*
32 *and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147(2), 222-231.
- 33 Lee, R. F., & Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for
34 detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation*
35 *Research/Reviews in Mutation Research*, 544(1), 43-64.
- 36 Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., ... & Stadtman,
37 E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.
38 In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 464-478). Academic Press.
- 39 Lin, H., & Randall, D. (1995). 9 Proton Pumps in Fish Gills. In *Fish physiology* (Vol. 14, pp.
40 229-255). Academic Press.

- 1 Lin, H., Pfeiffer, D., Vogl, A., Pan, J., & Randall, D. (1994). Immunolocalization of H⁺-
2 ATPase in the gill epithelia of rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*,
3 *195*(1), 169-183.
- 4 Livingstone, D. R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular
5 biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and*
6 *Biotechnology*, *57*(3), 195-211.
- 7 Livingstone, D. R., Chipman, J. K., Lowe, D. M., Minier, C., & Pipe, R. K. (2000).
8 Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic
9 invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on
10 the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *International Journal of*
11 *Environment and Pollution*, *13*(1-6), 56-91.
- 12 Losso, C., & Ghirardini, A. V. (2010). Overview of ecotoxicological studies performed in
13 the Venice Lagoon (Italy). *Environment international*, *36*(1), 92-121.
- 14 Lowe-McConnell, R. H. (1999). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais.
15 In *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Edusp, São Paulo, SP.
- 16 Lunardelli, B., Cabral, M. T., Vieira, C. E., Oliveira, L. F., Risso, W. E., Meletti, P. C., &
17 Martinez, C. B. (2018). Chromium accumulation and biomarker responses in the
18 Neotropical fish *Prochilodus lineatus* caged in a river under the influence of
19 tannery activities. *Ecotoxicology and environmental safety*, *153*, 188-194.
- 20 Lupi, L., Bedmar, F., Wunderlin, D. A., & Miglioranza, K. S. (2016). Organochlorine
21 pesticides in agricultural soils and associated biota. *Environmental Earth Sciences*,
22 *75*(6), 519.
- 23 Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals.
24 *Aquatic toxicology*, *101*(1), 13-30.
- 25 Maccubbin, A. E. (1994). DNA adduct analysis in fish: laboratory and field studies.
26 *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*, 267-294.
- 27 Mallatt, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a
28 statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *42*(4), 630-
29 648.
- 30 Maltby, L., Brock, T. C., & van den Brink, P. J. (2009). Fungicide risk assessment for
31 aquatic ecosystems: importance of interspecific variation, toxic mode of action,
32 and exposure regime. *Environmental Science & Technology*, *43*(19), 7556-7563.
- 33 Marino, D., & Ronco, A. (2005). Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in
34 surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of environmental*
35 *contamination and toxicology*, *75*(4), 820-826.
- 36 Martini, L. F. D., Caldas, S. S., Bolzan, C. M., Bundt, A. D. C., Primel, E. G., & Avila, L. A. D.
37 (2012). Risk assessment of surface and groundwater contamination by the rice
38 pesticides. *Ciência Rural*, *42*(10), 1715-1721.
- 39 Matoo, O. B., Ivanina, A. V., Ullstad, C., Beniash, E., & Sokolova, I. M. (2013). Interactive
40 effects of elevated temperature and CO₂ levels on metabolism and oxidative stress
41 in two common marine bivalves (*Crassostrea virginica* and *Mercenaria*

- 1 *mercenaria*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular &*
2 *Integrative Physiology*, 164(4), 545-553.
- 3 McCarty, R., 2010. Fight-or-Flight Response, in: *Encyclopedia of Stress*. Elsevier Inc., pp.
4 62–64.
- 5 McCormick, S. D., Shrimpton, J. M., Carey, J. B., O'dea, M. F., Sloan, K. E., Moriyama, S.,
6 & Björnsson, B. T. (1998). Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic
7 salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor
8 I and cortisol. *Aquaculture*, 168(1-4), 221-235.
- 9 McGeer, J. C., Szebedinszky, C., McDonald, D. G., & Wood, C. M. (2000). Effects of
10 chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-
11 regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, 50(3), 231-243.
- 12 Miglioranza, K. S., Gonzalez, M., Ondarza, P. M., Shimabukuro, V. M., Isla, F. I., Fillmann,
13 G., ... & Moreno, V. J. (2013). Assessment of Argentinean Patagonia pollution:
14 PBDEs, OCPs and PCBs in different matrices from the Río Negro basin. *Science of*
15 *the Total Environment*, 452, 275-285.
- 16 Miller, G., & Spoolman, S. (2015). *Environmental Science*. Cengage Learning.
- 17 Miranda, K., Cunha, M. L., Dores, E. F., & Calheiros, D. F. (2008). Pesticide residues in
18 river sediments from the Pantanal Wetland, Brazil. *Journal of Environmental*
19 *Science and Health Part B*, 43(8), 717-722.
- 20 Modesto, K. A., & Martinez, C. B. (2010a). Roundup® causes oxidative stress in liver and
21 inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*.
22 *Chemosphere*, 78(3), 294-299.
- 23 Modesto, K. A., & Martinez, C. B. (2010b). Effects of Roundup Transorb on fish:
24 hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity.
25 *Chemosphere*, 81(6), 781-787.
- 26 Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics,
27 mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and*
28 *Fisheries*, 9(3), 211-268.
- 29 Monserrat, J. M., Geracitano, L. A., & Bianchini, A. (2003). Current and future
30 perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems.
31 *Comments on Toxicology* 9, 255 -269.
- 32 Monteiro, M., Quintaneiro, C., Morgado, F., Soares, A. M. V. M., & Guilhermino, L.
33 (2005). Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the
34 estuarine fish *Pomatoschistus microps*: application to biomonitoring.
35 *Ecotoxicology and environmental safety*, 62(3), 341-347.
- 36 Monteiro, V., Cavalcante, D. G. S. M., Viléla, M. B. F. A., Sofia, S. H., & Martinez, C. B. R.
37 (2011). In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of
38 lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic toxicology*,
39 104(3-4), 291-298.

- 1 Moon, T. W. (2004). Hormones and fish hepatocyte metabolism: “the good, the bad and
2 the ugly!”. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and*
3 *Molecular Biology*, 139(3), 335-345.
- 4 Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases:
5 evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology*,
6 268(2), 157-177.
- 7 Nascimento, C. R., Souza, M. M., & Martinez, C. B. (2012). Copper and the herbicide
8 atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*.
9 *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*,
10 155(3), 456-461.
- 11 Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley &
12 Sons.
- 13 Newbold, C. (1975). Herbicides in aquatic systems. *Biological Conservation*, 7(2), 97-118.
- 14 Nohl, H., Jordan, W., & Dietmer, H. (1981). Identification of free hydroxyl radicals in
15 respiring rat heart mitochondria by spin trapping with the nitron DMPO. *FEBS*
16 *letters*, 123(2), 241-244.
- 17 Noyelles, F., Kettle, W. D., Fromm, C. H., Moffett, M. F., & Dewey, S. L. (1989). Use of
18 experimental ponds to assess the effects of a pesticide on the aquatic
19 environment. *Using Mesocosms to Assess the Aquatic Ecological Risk of Pesticides:*
20 *Theory and Practice (Voshell JR, ed)*. Lanham, MD: Entomological Society of
21 America, 41-56.
- 22 Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., & Lakra, W. S. (2013). DNA damage
23 and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in
24 freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*,
25 36(2), 539-547.
- 26 OCDE – FAO (2015). Capítulo 2. Agricultura brasileira: Perspectivas e Desafios. In:
27 Perspectivas agrícolas 2015 – 2024. Disponível em:
28 http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en. Acesso em: 02 de jan. 2018.
- 29 Odajima, T., & Yamazaki, I. (1972). Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood
30 III. The reaction of ferric myeloperoxidase with superoxide anion. *Biochimica et*
31 *Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 284(2), 355-359.
- 32 Oliveira, M., Serafim, A., Bebianno, M. J., Pacheco, M., & Santos, M. A. (2008). European
33 eel (*Anguilla anguilla L.*) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic
34 responses to copper exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 70(1), 20-
35 26.
- 36 Ondarza, P. M., Gonzalez, M., Fillmann, G., & Miglioranza, K. S. B. (2014). PBDEs, PCBs
37 and organochlorine pesticides distribution in edible fish from Negro River basin,
38 Argentinean Patagonia. *Chemosphere*, 94, 135-142.
- 39 Ottaviani, E., & Franceschi, C. (1996). The neuroimmunology of stress from invertebrates
40 to man. *Progress in neurobiology*, 48(4-5), 421-440.

- 1 Palermo, F. F., Risso, W. E., Simonato, J. D., & Martinez, C. B. (2015). Bioaccumulation of
2 nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish
3 *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 116, 19-28.
- 4 Palma, G., Sánchez, A., Olave, Y., Encina, F., Palma, R., & Barra, R. (2004). Pesticide levels
5 in surface waters in an agricultural–forestry basin in Southern Chile. *Chemosphere*,
6 57(8), 763-770.
- 7 Pankhurst, N. W., Ludke, S. L., King, H. R., & Peter, R. E. (2008). The relationship between
8 acute stress, food intake, endocrine status and life history stage in juvenile farmed
9 Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 275(1-4), 311-318.
- 10 Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W., & Fancey, L. L. (1996). Acetylcholinesterase, an old
11 biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and
12 a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, 32(2), 225-231.
- 13 Peña-Llopis, S., Ferrando, D., & Peña, J. B. (2003). Increased recovery of brain
14 acetylcholinesterase activity in dichlorvos-intoxicated European eels *Anguilla*
15 *anguilla* by bath treatment with N-acetylcysteine. *Diseases of aquatic organisms*,
16 55(3), 237-245.
- 17 Pereira, L., Fernandes, M. N., & Martinez, C. B. (2013). Hematological and biochemical
18 alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone.
19 *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(1), 1-8.
- 20 Pérez, M. R., Rossi, A. S., Bacchetta, C., Elorriaga, Y., Carriquiriborde, P., & Cazenave, J.
21 (2018). In situ evaluation of the toxicological impact of a wastewater effluent on
22 the fish *Prochilodus lineatus*: biochemical and histological assessment. *Ecological*
23 *Indicators*, 84, 345-353.
- 24 Perry, S. F., & Bernier, N. J. (1999). The acute humoral adrenergic stress response in fish:
25 facts and fiction. *Aquaculture*, 177(1-4), 285-295.
- 26 Pickering, A. D., Pottinger, T. G., Sumpter, J. P., Carragher, J. F., & Le Bail, P. Y. (1991).
27 Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in
28 the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*,
29 83(1), 86-93.
- 30 Pimpão, C.T., Zamprônio, A.R.; Silva de Assis, H.C. 2007. Effects os deltamethrin on
31 hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces,
32 Teleostei). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 122- 127.
- 33 Piner, P., & Üner, N. (2014). Neurotoxic effects of lambda-cyhalothrin modulated by
34 piperonyl butoxide in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental*
35 *toxicology*, 29(11), 1275-1282.
- 36 Polat, H., Erkoç, F. Ü., Viran, R., & Koçak, O. (2002). Investigation of acute toxicity of
37 beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*, 49(1), 39-44.
- 38 Possavatz, J., Zeilhofer, P., Alves Pinto, A., Tives, A. L., & Freire Gaspar de Carvalho Dores,
39 E. (2014). Resíduos de pesticidas em sedimento de fundo de rio na Bacia
40 Hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Ambiente & Água-An*
41 *Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 9(1).

- 1 Pottinger, T. G., & Carrick, T. R. (2001). Stress responsiveness affects dominant–
2 subordinate relationships in rainbow trout. *Hormones and Behavior*, *40*(3), 419–
3 427.
- 4 Rajotte, J. W., & Couture, P. (2002). Effects of environmental metal contamination on
5 the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild
6 yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic
7 Sciences*, *59*(8), 1296-1304.
- 8 Reddy, P. M., & Philip, G. H. (1994). In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in
9 the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade
10 cypermethrin. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *52*(4), 619–
11 626.
- 12 Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative
13 stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, *93*, 106–
14 117.
- 15 Reid, S. G., Bernier, N. J., & Perry, S. F. (1998). The adrenergic stress response in fish:
16 control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and
17 Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, *120*(1), 1-27.
- 18 Reis, R. E., Kullander, S. O., & Ferraris, C. J. (2003). *Check list of the freshwater fishes of
19 South and Central America*. Edipucrs.
- 20 Relyea, R. A. (2005). The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and
21 productivity of aquatic communities. *Ecological applications*, *15*(2), 618-627.
- 22 Relyea, R. A., & Hoverman, J. T. (2008). Interactive effects of predators and a pesticide
23 on aquatic communities. *Oikos*, *117*(11), 1647-1658.
- 24 Resgalla, C., Noldin, J. A., Tamanaha, M. S., Deschamps, F. C., Eberhardt, D. S., & Rörig,
25 L. R. (2007). Risk analysis of herbicide quinclorac residues in irrigated rice areas,
26 Santa Catarina, Brazil. *Ecotoxicology*, *16*(8), 565-571.
- 27 Ribeiro, A. M., Risso, W. E., Fernandes, M. N., & Martinez, C. B. (2014). Lead
28 accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*.
29 *Fish physiology and biochemistry*, *40*(3), 645-657.
- 30 Richards, P. D., Myers, R. J., Swinton, S. M., & Walker, R. T. (2012). Exchange rates,
31 soybean supply response, and deforestation in South America. *Global
32 environmental change*, *22*(2), 454-462.
- 33 Rico, A., Waichman, A. V., Geber-Corrêa, R., & van den Brink, P. J. (2011). Effects of
34 malathion and carbendazim on Amazonian freshwater organisms: comparison of
35 tropical and temperate species sensitivity distributions. *Ecotoxicology*, *20*(4), 625–
36 634.
- 37 Risebrough, R. W. (1986). Pesticides and bird populations. In *Current ornithology* (pp.
38 397-427). Springer, Boston, MA.
- 39 Rohr, J. R., & McCoy, K. A. (2010). A qualitative meta-analysis reveals consistent effects
40 of atrazine on freshwater fish and amphibians. *Environmental health perspectives*,
41 *118*(1), 20.

- 1 Romero, L. M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research.
2 *Trends in Ecology & Evolution*, 19(5), 249-255.
- 3 Romero, L.M., 2010. Fight or Flight responses, Encyclopedia of Animal Behavior. Elsevier.
- 4 Ronco, A. E., Carriquiriborde, P., Natale, G. S., Martin, M. L., Mugni, H., & Bonetto, C.
5 (2008). Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides
6 impact on low order stream ecosystems of the Pampasic Region. *Ecosystem*
7 *ecology research*, 209-239.
- 8 Sanchez, W., Ait-Aissa, S., Palluel, O., Ditche, J. M., & Porcher, J. M. (2007). Preliminary
9 investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback
10 (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology*,
11 16(2), 279-287.
- 12 Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditche, J. M., & Porcher, J. M. (2008). Biomarker
13 responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful
14 tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach. *Environment*
15 *International*, 34(4), 490-498.
- 16 Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J. M., & Ait-Aissa, S. (2005).
17 Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with
18 hepatic metal levels. *Environmental toxicology and pharmacology*, 19(1), 177-183.
- 19 Sancho, E., Cerón, J. J., & Ferrando, M. D. (2000). Cholinesterase activity and
20 hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in
21 *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 46(1), 81-86.
- 22 Santos, T. G., & Martinez, C. B. (2012). Atrazine promotes biochemical changes and DNA
23 damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, 89(9), 1118-1125.
- 24 Sathya, V., Ramesh, M., Poopal, R. K., & Dinesh, B. (2012). Acute and sublethal effects in
25 an Indian major carp *Cirrhinus mrigala* exposed to silver nitrate: Gill Na⁺/K⁺-
26 ATPase, plasma electrolytes and biochemical alterations. *Fish & shellfish*
27 *immunology*, 32(5), 862-868.
- 28 Saxena, K. K., & Seth, N. (2002). Toxic effects of cypermethrin on certain hematological
29 aspects of fresh water fish *Channa punctatus*. *Bulletin of environmental*
30 *contamination and toxicology*, 69(3), 364-369.
- 31 Schiesari, L., Waichman, A., Brock, T., Adams, C., & Grillitsch, B. (2013). Pesticide use and
32 biodiversity conservation in the Amazonian agricultural frontier. *Phil. Trans. R. Soc.*
33 *B*, 368(1619), 20120378.
- 34 Schlenk, D., Handy, R., Steinert S., Depledge, M., Benson, W. (2008). Biomarkers. In: Di
35 Giulio, R.T., Hinton D.E. (ed). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, New York, pp.
36 683-715.
- 37 Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental*
38 *Mutagenesis and Related Subjects*, 31(1), 9-15.
- 39 Schreinemachers, P., & Tipraqsa, P. (2012). Agricultural pesticides and land use
40 intensification in high, middle and low income countries. *Food Policy*, 37(6), 616-
41 626.

- 1 Selye, H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *The*
2 *journal of clinical endocrinology*, 6(2), 117-230.
- 3 Selye, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *British medical journal*,
4 1(4667), 1383.
- 5 SERA. Syracuse Environmental Research Associates, 2005. Imidacloprid: Human Health
6 and Ecological Risk Assessment - Final Report. Prepared for USDA Forest Service.
7 Available online. [http://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/
8 122805_Imidacloprid.pdf](http://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/122805_Imidacloprid.pdf)].
- 9 Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*,
10 82(2), 291-295.
- 11 Silva, A. O., & Martinez, C. B. (2014). Acute effects of cadmium on osmoregulation of the
12 freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. *Aquatic*
13 *toxicology*, 156, 161-168.
- 14 Simonato, J. D., Fernandes, M. N., & Martinez, C. B. (2011). Gasoline effects on
15 biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus*
16 *lineatus*. *Ecotoxicology*, 20(6), 1400-1410.
- 17 Simonato, J. D., Mela, M., Doria, H. B., Guiloski, I. C., Randi, M. A., Carvalho, P. S., ... &
18 Martinez, C. B. (2016). Biomarkers of waterborne copper exposure in the
19 Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, 170, 31-41.
- 20 SINDAG – Sindicato nacional das indústrias de defensivos agrícolas. Dados de produção
21 e consumo de agrotóxicos, 2011. Disponível em: <www.sindag.com.br>. Acesso
22 em: 20 dez. 2018.
- 23 Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for
24 quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell*
25 *research*, 175(1), 184-191.
- 26 Sinhorin, V. D. G., Sinhorin, A. P., dos Santos Teixeira, J. M., Miléski, K. M. L., Hansen, P.
27 C., Moreira, P. S. A., ... & Loro, V. L. (2014). Effects of the acute exposition to
28 glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant
29 responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotoxicology*
30 *and environmental safety*, 106, 181-187.
- 31 Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., & Svobodova, Z. (2009). Oxidative stress in fish
32 induced by pesticides. *Neuroendocrinology Letters*, 30(1), 2.
- 33 Smolders, R., De Coen, W., & Blast, R. (2005). Integrative measures of toxicant exposure
34 in zebra fish (*Danio rerio*) at different levels of biological organization. *Techniques*
35 *in Aquatic Toxicology*, 2, 3.
- 36 Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., & Sukhotin, A. A. (2012). Energy
37 homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress
38 tolerance in aquatic invertebrates. *Marine environmental research*, 79, 1-15.
- 39 Solomon, K. R., Dalhoff, K., Volz, D., & Van Der Kraak, G. (2013). Effects of herbicides on
40 fish. In *Fish physiology* (Vol. 33, pp. 369-409). Academic Press.

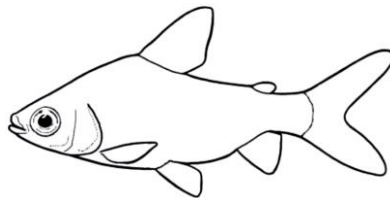
- 1 Soso, A. B., Barcellos, L. J. G., Ranzani-Paiva, M. J., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Anziliero,
2 D., ... & Finco, J. A. (2007). Chronic exposure to sub-lethal concentration of a
3 glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of
4 female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*,
5 23(3), 308-313.
- 6 Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York*
7 *Academy of Sciences*, 899(1), 191-208.
- 8 Stara, A., Machova, J., & Velisek, J. (2012). Effect of chronic exposure to simazine on
9 oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.).
10 *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 33(2), 334-343.
- 11 Stegeman, J. J., & Hahn, M. E. (1994). Biochemistry and molecular biology of
12 monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of
13 cytochrome P450 in aquatic species. *Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and*
14 *cellular perspectives*, 87, 206.
- 15 Stehle, S., & Schulz, R. (2015). Agricultural insecticides threaten surface waters at the
16 global scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5750-
17 5755.
- 18 Suvetha, L., Ramesh, M., & Saravanan, M. (2010). Influence of cypermethrin toxicity on
19 ionic regulation and gill Na⁺/K⁺-ATPase activity of a freshwater teleost fish
20 *Cyprinus carpio*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 29(1), 44-49.
- 21 Taylor, B. W., Flecker, A. S., & Hall, R. O. (2006). Loss of a harvested fish species disrupts
22 carbon flow in a diverse tropical river. *Science*, 313(5788), 833-836.
- 23 Theisen, G.O. (2010) O mercado de agroquímicos. Disponível em: <[www.cpact.embrapa.
24 br/eventos/2010/met/palestras/28/281010_ Paine13_Giovani_THEISEN.pdf](http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/met/palestras/28/281010_Painel3_Giovani_THEISEN.pdf)>.
25 Acesso em: 17 jan. 2018.
- 26 Tierney, K. B., Baldwin, D. H., Hara, T. J., Ross, P. S., Scholz, N. L., & Kennedy, C. J. (2010).
27 Olfactory toxicity in fishes. *Aquatic toxicology*, 96(1), 2-26.
- 28 Tierney, K. B., Farrell, A. P., & Brauner, C. J. (Eds.). (2013). *Fish Physiology: Organic*
29 *Chemical Toxicology of Fishes* (Vol. 33). Academic Press.
- 30 Tišler, T., Jemec, A., Mozetič, B., & Trebše, P. (2009). Hazard identification of
31 imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, 76(7), 907-914.
- 32 Tomei, J., & Upham, P. (2009). Argentinean soy-based biodiesel: An introduction to
33 production and impacts. *Energy Policy*, 37(10), 3890-3898.
- 34 Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Valle, N. R. D., & Huang, P. (2008). Redox
35 regulation of cell survival. *Antioxidants & redox signaling*, 10(8), 1343-1374.
- 36 US EPA, Retrieved 13.02.13. http://npic.orst.edu/factsheets/l_cyhalogen.pdf 2001.
37 Lambda-cyhalothrin factsheet. National Pesticide Telecommunications Net-work
38 (Oregon State University and the U.S. Environmental Protection Agency).
- 39 Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular
40 biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic

- 1 environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64(2), 178-
2 189.
- 3 Vale, J. A. (1998). Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP)
4 insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 102, 649-652.
- 5 Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals,
6 metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological*
7 *interactions*, 160(1), 1-40.
- 8 Van Der Kraak, G. J., Hosmer, A. J., Hanson, M. L., Kloas, W., & Solomon, K. R. (2014).
9 Effects of atrazine in fish, amphibians, and reptiles: An analysis based on
10 quantitative weight of evidence. *Critical reviews in toxicology*, 44(sup5), 1-66.
- 11 Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and
12 biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology*
13 *and pharmacology*, 13(2), 57-149.
- 14 Vanzella, T. P., Martinez, C. B. R., & Cólus, I. M. S. (2007). Genotoxic and mutagenic
15 effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation*
16 *Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 631(1), 36-43.
- 17 Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E. I., & Unlu, E. (2007). Histopathology of
18 lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus*
19 *mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(3), 286-291.
- 20 Venturino, A., Montagna, C. M., & de D'Angelo, A. M. P. (2007). Risk assessment of
21 Magnacide® H herbicide at Río Colorado irrigation channels (Argentina). Tier 3:
22 studies on native species. *Environmental toxicology and chemistry*, 26(1), 177-182.
- 23 Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Cabrera, L. C., Primel, E. G., Fillmann, G., Bianchini, A., & dos
24 Reis Martinez, C. B. (2017). A comparative approach using biomarkers in feral and
25 caged Neotropical fish: implications for biomonitoring freshwater ecosystems in
26 agricultural areas. *Science of the Total Environment*, 586, 598-609.
- 27 Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., da Costa Cabrera, L., Risso,
28 W. E., ... & dos Reis Martinez, C. B. (2016). Multiple biomarker responses in
29 *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from
30 agricultural areas in Southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 542, 44-56.
- 31 Vighi, M., & Villa, S. (2013). Ecotoxicology: the challenges for the 21st century. *Toxics*,
32 1(1), 18-35.
- 33 Vignati, D. A., Ferrari, B. J., & Dominik, J. (2007). Laboratory-to-field extrapolation in
34 aquatic sciences. *Environmental Science and Technology*, 41(4), 1067-1073.
- 35 Viran, R., Erkoç, F. Ü., Polat, H., & Koçak, O. (2003). Investigation of acute toxicity of
36 deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and environmental*
37 *safety*, 55(1), 82-85.
- 38 Waichman, A. V., Römbke, J., Ribeiro, M. O. A., & Nina, N. C. (2002). Use and fate of
39 pesticides in the Amazon State, Brazil. *Environmental Science and Pollution*
40 *Research*, 9(6), 423.

- 1 Waring, C. P., & Moore, A. (2004). The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*)
2 smolts in fresh water and after sea water transfer. *Aquatic Toxicology*, *66*(1), 93-
3 104.
- 4 Wells, P. G., Depledge, M. H., Butler, J. N., Manock, J. J., & Knap, A. H. (2001). Rapid
5 toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants—exploiting the
6 potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. *Marine Pollution*
7 *Bulletin*, *42*(10), 799-804.
- 8 Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, *77*(3),
9 591-625.
- 10 Wendelaar Bonga, S. E. (2011). Hormonal responses to stress. *Encyclopedia of fish: fish*
11 *physiology from genome to environment*, *2*, 1515-1523.
- 12 Weston, D. P., & Lydy, M. J. (2012). Stormwater input of pyrethroid insecticides to an
13 urban river. *Environmental toxicology and chemistry*, *31*(7), 1579-1586.
- 14 Weston, D. P., Holmes, R. W., & Lydy, M. J. (2009). Residential runoff as a source of
15 pyrethroid pesticides to urban creeks. *Environmental Pollution*, *157*(1), 287-294.
- 16 Winston, G. W., & Di Giulio, R. T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in
17 aquatic organisms. *Aquatic toxicology*, *19*(2), 137-161.
- 18 Wu, H., Liu, X., Zhang, X., Ji, C., Zhao, J., & Yu, J. (2013). Proteomic and metabolomic
19 responses of clam *Ruditapes philippinarum* to arsenic exposure under different
20 salinities. *Aquatic toxicology*, *136*, 91-100.
- 21 Zubrod, J. P., Englert, D., Feckler, A., Koksharova, N., Kenschak, M., Bundschuh, R., ... &
22 Bundschuh, M. (2015). Does the current fungicide risk assessment provide
23 sufficient protection for key drivers in aquatic ecosystem functioning?
24 *Environmental science & technology*, *49*(2), 1173-1181.

Capítulo II

Manuscrito I



Uma abordagem integrada em Ecotoxicologia: ocorrência de agrotóxicos, bioacumulação e respostas de múltiplos biomarcadores em peixes submetidos a testes *in situ* em áreas agrícolas

Carlos Eduardo Delfino Vieira^a, Maria Eduarda Tesser^a, Patrícia Gomes Costa^b, Wagner Ezequiel Risso^a, Sergiane Souza Caldas^c, Ednei Gilberto Primel^c, Adalto Bianchini^b, Cláudia Bueno dos Reis Martinez^a

^a Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, Londrina, Paraná, Brazil

^b Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália, km8, s/n, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália, km 8, s/n, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

2.1 INTRODUÇÃO

As práticas agrícolas atuais constituem uma das principais fontes de contaminação dos ambientes aquáticos, tendo em vista que o atual modelo agrícola é caracterizado por uma produção intensiva e fortemente dependente de agrotóxicos, adubos e fertilizantes químicos (Carriquiriborde et al., 2014). Consequentemente, estas atividades podem contribuir para a deterioração da qualidade da água devido a liberação de diferentes poluentes (Ongley, 1996; FAO, 2002), levando à ocorrência de misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos no ambiente, que por sua vez podem interagir e produzir efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos nos organismos.

Os agrotóxicos sintéticos constituem um grupo de produtos químicos criados para serem lançados no meio ambiente para o controle de organismos vivos, implicando também em um risco intrínseco para os organismos não-alvo (Harrison e Hester, 2012; Ongley, 1996). Ao redor do mundo, ambientes de água doce em regiões agrícolas estão contaminados por misturas de diversos agrotóxicos (Konstantinou et al., 2006; Gilliom, 2007; Moreira et al., 2012; Bereswill et al., 2013; Bonansea et al., 2013; Smiley et al., 2014; De Geronimo et al., 2014; Albuquerque et al., 2016; Vieira et al., 2016; 2017) que

representam uma ameaça para a biodiversidade, para os serviços ecossistêmicos e para a saúde humana.

O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos e em 2014 foram utilizados aproximadamente 508 mil toneladas (IBGE, 2014), correspondendo a cerca de 20% do total do consumo mundial e 86% do total consumido na América Latina (Albuquerque et al., 2016). Este consumo exagerado desperta uma grande preocupação ambiental, principalmente devido à contaminação histórica por agrotóxicos organoclorados (OCPs) e por agrotóxicos de uso atual (CUPs) (Caldas et al., 1999, Dores et al., 2016). O uso de OCPs na agricultura, tais como o endossulfan, aldrin, dieldrin e heptacloro foi oficialmente banido no Brasil em 1985, com algumas poucas exceções, enquanto o endossulfan somente em 2014 (ANVISA, 2014). Apesar da proibição de uso, estes compostos foram detectados na água e nos sedimentos de vários ecossistemas aquáticos brasileiros (Rissato et al., 2006; Paulino et al., 2014; Vieira et al., 2016, 2017), demonstrando a grande persistência destes compostos no ambiente.

OCPs são contaminantes ubíquos nos ecossistemas aquáticos e podem ser adsorvidos por materiais em suspensão na água e posteriormente depositados nos sedimentos. O comportamento ambiental e os efeitos ecotoxicológicos destas moléculas são de grande preocupação, devido ao seu caráter semivolátil, persistente, bioacumulável e tóxico, tanto para animais silvestres quanto para humanos (Guzzella et al., 2005; Muhayimana et al. 2009; Eqani et al., 2013). A alta estabilidade e as características lipofílicas dos OCPs contribuem para o seu potencial de bioacumulação nos tecidos adiposos dos animais e sua biomagnificação através da cadeia alimentar, que pode afetar tanto a vida aquática quanto a saúde humana (Lie et al., 2003; Guzzella et al., 2005; Thomas et al., 2012; Eqani et al., 2013; Chen et al., 2013; Paulino et al., 2014). Em geral, OCPs ainda estão presentes e dispersos no ambiente em grande escala geográfica, sendo capazes de promover efeitos tóxicos nos organismos cronicamente expostos, como os peixes, mesmo em níveis baixos pois os mesmos estão constantemente expostos aos poluentes através da respiração, alimentação ou do meio em que vivem (Stanley e Preetah, 2016).

Além dos OCPs, agrotóxicos de uso atual (CUPs) também são frequentemente detectados em corpos hídricos ao redor do mundo, com destaque para os herbicidas e atrazina, presente em quase todas as avaliações, além da presença frequente de simazina, metolaclo e trifluralina e inseticidas diversos (Konstantinou et al., 2006; Gilliom, 2007;

Moreira et al., 2012; Bereswill et al., 2013; Bonansea et al., 2013; Smiley et al., 2014; De Geronimo et al., 2014; Albuquerque et al., 2016; Vieira et al., 2016; 2017). Esses CUPs agravam a preocupação ambiental, uma vez que novos compostos são lançados a cada ano no mercado mundial, sem mesmo conhecermos todos os efeitos tóxicos dos compostos já existentes para a biota aquática.

Neste contexto, espécies de peixes têm sido empregadas como bons indicadores ecológicos para monitorar os padrões e os níveis de contaminação no ambiente em vários programas de monitoramento de águas costeiras e continentais ao redor do mundo (Besse et al., 2012; Vieira et al., 2016; 2017), pois refletem a fração biodisponível e acumulativa de contaminantes e têm sido utilizadas para estimar o risco de exposição em níveis tróficos superiores (Blocksom et al., 2010; Guo et al., 2012). Entretanto, alguns autores ressaltam que a maioria do nosso conhecimento sobre os efeitos de agrotóxicos em peixes provém de estudos em laboratório com substâncias isoladas (Stanley e Preetah, 2016), que carecem de realismo ecológico e são pouco adequados para entender as consequências reais da contaminação por misturas de agrotóxicos em ambientes naturais (Vighi e Villa, 2013), uma vez que as exposições a agrotóxicos em corpos d'água normalmente ocorrem sob a forma de pulsos isolados ou sequenciais de misturas complexas, em concentrações flutuantes (Eggen et al., 2004; Ashauer et al., 2006; Bundschuh et al., 2014). Um número limitado de estudos que representem de forma realista a complexidade de variáveis de campo é encontrado na literatura (Carriquiriborde et al., 2007; Bony et al., 2008; Moreira et al., 2010; Vieira et al., 2016, 2017) e neste contexto, é fundamental o desenvolvimento de trabalhos de campo que investiguem os efeitos de agrotóxicos em situações ambientalmente realistas.

Estudos prévios de biomonitoramento ativo mostraram que diferentes ambientes aquáticos da região Norte do Paraná, Sul do Brasil, apresentaram níveis elevados de agrotóxicos na água e sedimentos, destacando-se os OCPs, alguns dos quais em níveis superiores aqueles estabelecidos pela legislação ambiental brasileira (Vieira et al., 2016, Vieira et al., 2017). A espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) apresenta-se como um potencial organismo biomonitor devido à sua importância ecológica e econômica, sendo um importante recurso pesqueiro comercializado no mercado nacional e que compreende grande parte da ictiomassa de um rio, podendo chegar a representar de 50 a 80% da biomassa de peixes de um ambiente (Taylor et al.,

2006). Adicionalmente, esta espécie de peixe mostra-se sensível a exposição à mistura de contaminantes, pois é uma espécie detritívora de fundo e que portanto está em contato tanto com os contaminantes no sedimento, bem como àqueles dissolvido na coluna de água, sendo empregada com sucesso em diversos estudos de monitoramento ambiental (Camargo e Martinez, 2006; Cazenave et al., 2009, 2014; Troncoso et al., 2012; Vieira et al., 2016, Pérez et al., 2018).

As correlações entre as concentrações ambientais de contaminantes, sua bioacumulação e as respostas biológicas nos organismos devem ser integradas para melhor compreender os riscos ambientais (Van der Oost et al., 2003). Neste contexto, o uso de múltiplos biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica constitui uma abordagem adequada para detectar respostas biológicas desencadeadas por contaminantes e deve ser incorporada em estudos de monitoramento aquático, fornecendo assim um diagnóstico ecotoxicológico necessário para o gerenciamento ambiental (Vieira et al., 2016, Ghisi et al., 2017).

Em nível subindividual, biomarcadores bioquímicos, genotóxicos e histológicos têm sido amplamente utilizados em peixes, uma vez que são as primeiras alterações a surgir frente à exposição a um contaminante (Van der Oost et al., 2003). Biomarcadores bioquímicos como as enzimas envolvidas na metabolização de compostos orgânicos, como as enzimas da família da CYP1A (7-etoxiresorufina-O-desetilase – EROD) e da glutathione S-transferase (GST) e as enzimas envolvidas na defesa antioxidante e manutenção do equilíbrio redox celular, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glutamato-cisteína ligase (GCL), além dos antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione (GSH), têm um potencial considerável para avaliar os efeitos de produtos químicos em condições de campo, uma vez que são as primeiras respostas a serem detectadas frente a exposição à contaminantes ambientais (Van der Oost, 2013). Os biomarcadores genotóxicos, como as quebras no DNA e danos clastogênicos e aneugênicos podem refletir em doenças carcinogênicas e anormalidades morfológicas, que afetam a aptidão física, adaptabilidade e sobrevivência dos animais (Jha et al., 2008. Araldi et al., 2015) e por fim, as análises histopatológicas de órgãos alvo também são biomarcadores importantes que podem detectar a exposição aguda e crônica e integrar respostas moleculares/celulares com patologias em nível orgânico/individual (Schlenk *et al.*, 2008). A integração desses biomarcadores, em conjunto com o perfil

químico da água e sedimentos e a bioacumulação de contaminantes fornece uma avaliação de risco confiável para a biota exposta.

O biomonitoramento ativo é um dos métodos mais eficientes para avaliar os efeitos de misturas de contaminantes no ambiente e os seus efeitos sobre os organismos, e dentro desta perspectiva o confinamento *in situ* de espécies de peixes integram maior relevância ecológica em relação aos testes de toxicidade em laboratório, uma vez que levam em consideração interações entre variáveis bióticas, físicas e químicas do ambiente, além de permitir o exato conhecimento do período de exposição, bem como a padronização dos organismos utilizados nos testes, como a idade, sexo e tamanho, possibilitando a comparação dos resultados de diferentes locais (Schlenk *et al.*, 2008, Vieira *et al.*, 2014; 2016; 2017, Pérez *et al.*, 2018). Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram: I - avaliar os níveis de OCPs e CUPs presentes na água e sedimentos de ambientes dulcícolas localizados em áreas com diferentes níveis de perturbação antrópica no Sul do Brasil; II – verificar a ocorrência e bioacumulação de OCPs no fígado de *P. lineatus* ao longo de 120 dias de confinamento *in situ* nestes ambientes; III- verificar os efeitos prejudiciais das exposições à mistura destes contaminantes, por meio de biomarcadores bioquímicos, genotóxicos e histológicos nos peixes confinados ao longo de 120 dias de exposição e IV – integrar estes resultados buscando compreender de forma mais realista os impactos destes contaminantes sobre a qualidade e saúde de ecossistemas aquáticos sob influência de atividades agrícolas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Área de estudo

Os dois locais de confinamento dos peixes (Fig. 2.1) são ambientes lacustres construídos ao longo de ribeirões, localizados no município de Londrina (norte do estado do Paraná, Sul do Brasil), que se distinguem pelo grau de impacto antrópico:

Local de referência (REF) (23°20'01.35" S e 51°12'31.22"W): localizado em uma sequência de lagos ao longo de um pequeno afluente da microbacia do Ribeirão Cafezal,

que constitui a Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL), sendo um local com um menor nível de perturbação antrópica, com presença de maior vegetação ciliar e, portanto, menos susceptível à entrada de contaminantes.

Local experimental (EXP) (23°25,50.43" S e 51°20'28.84"W): lago construído em um afluente da bacia do Ribeirão Apertados, localizado em uma região de intensa atividade rural, caracterizada pela ausência de vegetação ciliar, prevalência de cultivo de monoculturas não perenes e utilização de agrotóxicos, com o risco de contaminação do solo, bem como as águas subterrâneas e superficiais.

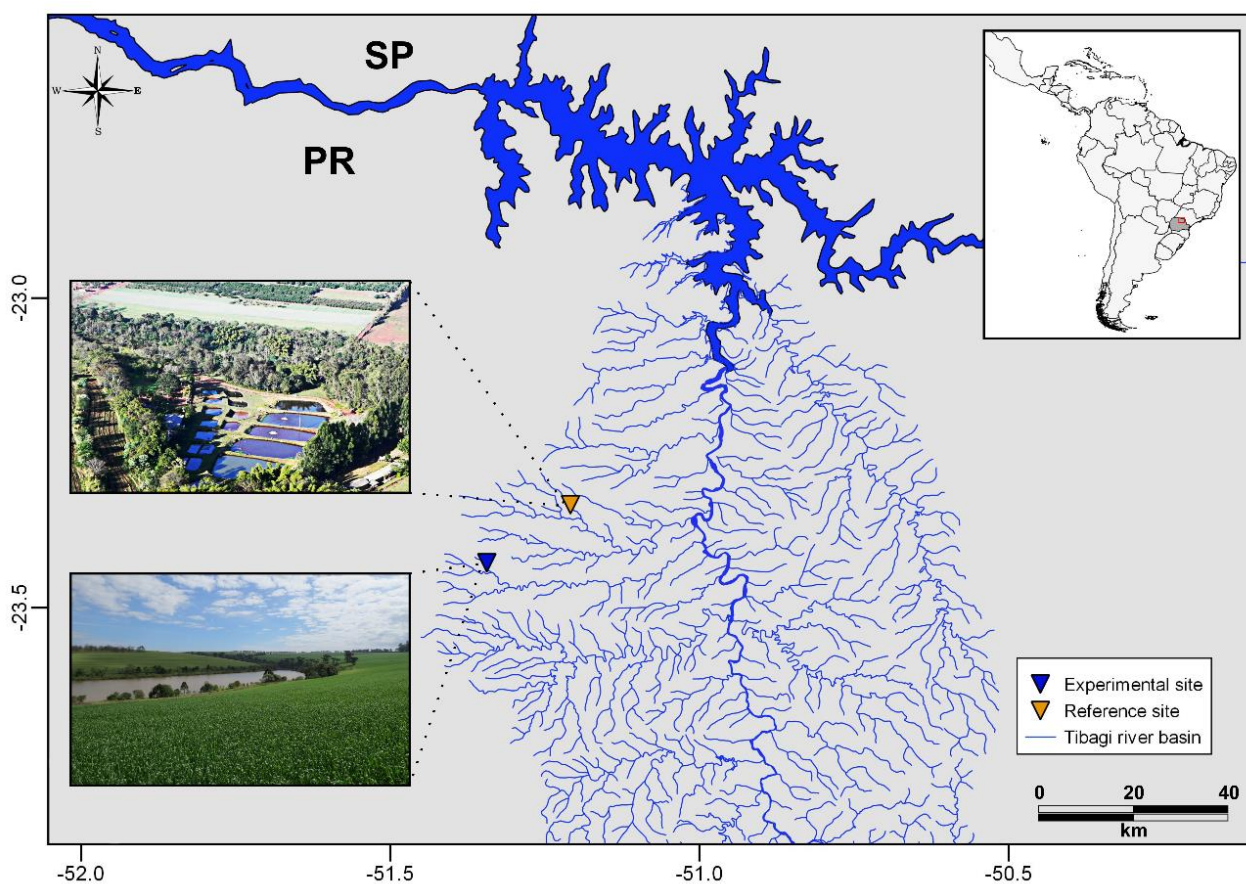


Figura 2.1: Mapa do Brasil mostrando o Estado do Paraná (canto superior direito) em cinza escuro e em detalhe a porção alta da bacia do rio Tibagi, destacando os dois pontos de confinamento *in situ* do peixe Neotropical *P. lineatus*: ponto de referência – REF (triângulo laranja), localizado na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina e o local experimental – EXP (triângulo azul) em área de intensa atividade agrícola.

2.2.2 Desenho experimental

Juvenis de *P. lineatus* (n= 1000; tamanho médio inicial = $12,94 \pm 3,98$ g; $10,57 \pm 1,16$ cm [média \pm DP]; aproximadamente seis meses de idade) foram fornecidos pela EPUEL. Os peixes foram divididos em dois grupos: grupo de referência (REF), no qual os animais (n = 500) foram confinados em uma grande gaiola constituída de flutuadores de polietileno e tela de poliéster recoberta com PVC com abertura de malha de 5 mm (2 x 2 x 1,5 m; 6000 L) na própria EPUEL; e um grupo experimental (EXP), constituído por exemplares (n= 500) que foram transportados para o campo em sacos plásticos contendo água e oxigênio e confinados no local EXP, sob as mesmas condições experimentais que o grupo REF. Anterior à introdução dos peixes nas gaiolas, um grupo de animais (n = 30) foi amostrado na própria EPUEL para determinação dos valores basais de cada biomarcadores (T_0). Os experimentos foram conduzidos durante os meses de março a julho de 2015.

As gaiolas foram instaladas com quatro semanas de antecedência à introdução dos peixes para que pudesse ocorrer a entrada de material particulado e sedimento dentro deste compartimento e foram mantidas no local de maneira que a parte inferior permanecesse em contato direto com o fundo dos lagos, possibilitando aos peixes o acesso ao sedimento. Os animais foram alimentados três vezes por semana com ração comercial (Guabi®, 36% de conteúdo proteico), de maneira equivalente em ambos os locais de exposição.

Os peixes permaneceram confinados durante um período de 120 dias e, ao longo desse período, foram realizadas amostragens periódicas, especificamente após 5 (t5), 15 (t15), 30 (t30), 60 (t60), 90 (t90) e 120 (t120) dias de exposição. Decorrido cada tempo experimental pré-estabelecido, um grupo de animais (n= 50) foi retirado de cada local e imediatamente transportado ao laboratório (em trânsito < 1 hora) em caixas plásticas contendo água do próprio local e oxigenação.

Durante a realização dos experimentos, parâmetros físicos e químicos da água (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade) foram monitorados por meio de um medidor multiparâmetro (YSI ProDSS, USA).

No laboratório, os peixes foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), medidos (cm) e pesados (g) e em seguida mortos por secção medular. Os animais tiveram uma amostra de sangue coletada a partir da veia caudal com o auxílio de seringas heparinizadas para realização dos ensaios genotóxicos. Amostras de fígado (n = 20) foram retiradas e armazenadas em tubos criogênicos e imediatamente mantidas a -80°C até o momento das

análises. Outros 10 animais foram mortos e tiveram o fígado retirado para a análise histológica. Estes procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (Processo 10493.2014.27).

2.2.3 Análises de OCPs em água superficial, sedimentos e biota

Um litro de amostra de água de cada local e em cada tempo experimental foi coletado em uma garrafa de vidro âmbar lavada com acetona e seca à 100°C. Antes da coleta, os frascos foram enxaguados com água do próprio local e as amostras foram armazenadas a 4°C até o processamento, que ocorreu no mesmo dia. As amostras de água foram pré-concentradas e extraídas em tubos SPE contendo 500 mg de octadecilsilano (Chroma Bond C₁₈) com tamanho médio de partícula de 45 µm. Para as análises de agrotóxicos organoclorados (OCPs), um volume de 250 mL de água foi fortificado pela adição de 100 µL do padrão de recuperação (PCB 103 e PCB 198). Subsequentemente, os tubos foram eluídos com acetato de etila e *n*-hexano. Os extratos foram reduzidos em um evaporador rotativo e fluxo de nitrogênio para um volume final de 1 mL e transferidos para vials onde receberam 100 µL de padrão interno (2,4,5,6 -tetra-cloro-*m*-xileno [TCMX] e PCB-209). Uma alíquota de 2 µL de cada extrato foi analisada por cromatografia de fase gasosa com detector de captura de elétrons (GC-ECD).

A análise de OCPs em sedimentos e biota, incluindo extração, purificação, fracionamento e análise cromatográfica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Niencheski e Fillmann, 2006. As sub-amostras de sedimentos secos (10 g) foram fortificadas com 30 ng de PCB-103 como padrão de recuperação e após 12 horas de repouso para estabilização, os compostos foram extraídos em Soxhlet com 200 mL de uma mistura *n*-hexano/diclorometano (1:1) por 12 horas. Na sequência, os extratos foram reduzidos no evaporador rotativo e fluxo de nitrogênio para um volume final de 1 mL. Uma alíquota de 2 µL de extrato foi analisada por cromatografia. Cada análise foi realizada em triplicada.

A identificação e quantificação dos compostos organoclorados foi realizada em um cromatógrafo de fase gasosa (GC-17-A Schimadzu) equipado com detector de captura de elétrons ^{63}Ni (ECD) e injetor automático de amostra e uma coluna capilar de sílica Elite-5MS (5% de difenil / 95% dimetil polissiloxano, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Os OCPs determinados em amostras de água, sedimento e fígado foram: HCHs (α , β , γ e δ -hexaclorociclohexano); ciclodienos (aldrin, endrin, dieldrin, endrin cetona, heptacloro, heptacloro epóxido, α e γ -clordano, trans e cis-nonaclor e mirex); DDTs (diclorodifeniltricloroetano - DDT, diclorodifenilcloroetileno - DDE, diclorodifenildicloroetano, DDD e metoxicloro) e endossulfans (α -endossulfan, β -endossulfan, endossulfan sulfato).

Procedimentos de controle e garantia de qualidade (QC/QA) incluíram análises em triplicata, materiais de referência certificados e brancos analíticos. Os resultados mostraram que não houve contaminação nem interferência durante o manuseio no laboratório. As concentrações nas amostras foram baseadas nos padrões de recuperação que foram adicionados a elas. A identificação dos compostos foi baseada em espectros de massa individual e tempos de retenção no cromatógrafo em comparação com dados da literatura, dados da biblioteca e padrões autênticos. Padrões foram utilizados para calcular as recuperações acima de 70% para todos os grupos de contaminantes.

2.2.4 Análises de CUPs em amostras de água

Em amostras de água superficial, 33 agrotóxicos de uso atual (CUPs) e alguns metabólitos foram analisados simultaneamente: 2,4-D, 3,4-dicloroanilina, 3-hidroxicarbofuran, atrazina, azoxistrobina, bentazona, bispyribac-sódio, carbendazim, carbofuran, ciproconazol, clomazone, difenoconazol, diuron, epoxiconazol, fipronil, imazapic, imazaphyr, iprodione, irgarol, malation, metalaxil-M, metilsulfuron-metil, molinato, penoxsulan, pirazosulfuran-etil, pirimifós-metil, propanil, propiconazol, quinclorac, simazina, tebuconazol, tiabendazol e trifloxistrobina; de acordo com a metodologia descrita por Caldas et al. (2013).

As amostras de água foram divididas em duas sub-amostras: uma teve o pH ajustado para 3 com ácido fosfórico e a outra não sofreu ajuste de pH. Posteriormente, as

amostras (250 mL) foram bem misturadas e passaram através de um tubo SPE (500 mg C₁₈), com tamanho médio de partícula de 45 µm previamente acondicionado com 3 mL de metanol, 3 mL de água purificada e 3 mL de água purificada pH 3,0, a 10 mL min⁻¹. Para as amostras de água não acidificadas, a coluna SPE foi condicionada passando consecutivamente 6 mL de metanol e 6 mL de água purificada. Após o procedimento de SPE, os analitos foram eluídos com 2 mL (1 +1 mL) de metanol. Os extratos orgânicos finais foram analisados diretamente por LC-ESI-MS / MS.

As determinações foram realizadas em um cromatógrafo líquido Waters Alliance 2695 acoplado a um detector de massas tipo triplo quadrupolo com fonte de ionização por eletrospray (Waters, Milford, MA, USA). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna analítica Kinetex C18 (3,0 mm × 50 mm d.i., 2,6 µm) marca Phenomenex (Torrance, CA, USA). A fase móvel foi composta por (A) água ultrapura 0,1% ácido acético e (B) metanol, com eluição no modo gradiente. O volume de injeção foi de 10 µL. Métodos de controle e garantia de qualidade (QC / QA) foram empregados, de acordo com a metodologia descrita por Caldas et al. (2013).

2.2.5 Biomarcadores bioquímicos

As amostras de fígado foram pesadas, homogeneizadas (1:10 w/v) em tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,0) e centrifugadas (10.000 g, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi utilizado para análises dos seguintes biomarcadores bioquímicos:

Enzimas de biotransformação

A atividade da CYP1A foi determinada por meio da atividade da EROD, estimada pela taxa de conversão da 7-Etoxiresorufina em resorufina, seguindo-se o protocolo de Eggens e Galgani (1992), com algumas modificações. A reação foi iniciada pela adição da amostra na mistura reativa (tampão fosfato de K 0,1M; pH 7,6; NADPH 2 mM e 7-Etoxiresorufina 0,1 mM). O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, foi medido a cada minuto, durante 30 minutos (ex/em: 530/590nm). A

atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina $\text{min}^{-1} \text{mg}$ de proteína⁻¹, baseada em uma curva padrão de resorufina.

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada pelo monitoramento da complexação da glutathione reduzida (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em espectrofotômetro a 340 nm, de acordo com o método descrito por Keen et al. (1976). O aumento de CDNB conjugado foi monitorado durante 1 minuto, em espectrofotômetro a 340 nm e a atividade da enzima foi expressa em nmol de CDNB conjugado $\text{min}^{-1} \text{mg}$ de proteína⁻¹.

Antioxidantes enzimáticos e não-enzimático

A atividade da Cu-Zn superóxido-dismutase (SOD) foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido em espectrofotômetro, a 550 nm, de acordo com McCord e Fridovich (1969). A atividade da enzima foi expressa em U de SOD. mg de proteína⁻¹, sendo que U representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada através da velocidade de decomposição de peróxido de hidrogênio pela enzima, sendo quantificado o decréscimo de absorvância em espectrofotômetro a 240 nm (Beutler, 1975). As amostras (1:100) foram adicionadas a um meio de reação (H_2O_2 0,03%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,25 mM), e o decréscimo de sua absorvância a 240 nm determinado durante 1 min. A atividade da enzima foi expressa em μmol de H_2O_2 degradado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹.

A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi estimada indiretamente através da oxidação do NADPH em presença de glutathione redutase (GR) e o substrato glutathione oxidada, produzida pela ação da GPx. Uma alíquota (10 μL) das amostras foi misturada concomitantemente a 1 mL do tampão (NaH_2PO_4 , 25 mM, Na_2HPO_4 , 25 mM, EDTA 2 mM, NaN_3 5 mM, NADPH 0,2 mM, GSH 1 mM, 25°C e protegido da luz), à GR (1 U) e ao H_2O_2 (0,4 mM) e a cinética da reação foi analisada por 1 minuto em espectrofotômetro a 340 nm. Os resultados foram expressos em μmol de NADP. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína⁻¹ (Hopkins e Tudhope, 1973).

A atividade da glutamato-cisteína ligase GCL (também conhecida como γ -glutamylcisteína sintetase) foi determinada de acordo com o método descrito por White et al. (2003), que baseia-se na reação do naftaleno dicarboxialdeído (NDA) com a GSH ou γ -glutamylcisteína (γ -GC) para formar produtos cíclicos altamente fluorescentes. Para tanto, as amostras do homogenato (25 μ L) foram misturadas com o meio de reação para GCL (Tris 400 mM, ATP 40 mM, ácido L-glutâmico 20 mM, EDTA 2,0 mM, borato de sódio 20 mM, serina 2 mM e $MgCl_2$ 40 mM) e a reação foi iniciada pela adição de 25 μ L de cisteína (2 mM). A concentração de GSH basal de cada amostra foi determinada simultaneamente no ensaio, e utilizada para determinar a atividade da GCL, e neste caso, a cisteína não foi adicionada aos poços da GSH basal neste momento. Após 60 min, a reação da GCL foi interrompida pela adição de ácido sulfosalicílico (200 mM) em todos os poços, e em sequência adicionou-se cisteína 2 mM aos poços da GSH basal. Uma alíquota da reação foi misturada com a solução de NDA (Tris 50 mM, NaOH 0,5 N e NDA 10 mM [pH 12,5] em dimetil sulfoxido [1,4/0,2/0,2 v/v/v, respectivamente]) em uma placa branca de 96 poços e após a incubação de 30 minutos, no escuro, mediu-se a intensidade de fluorescência (472 nm de excitação / 528 nm de emissão) em espectrofluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer) e a concentração NDA-GC ou GSH foi determinada através de uma curva padrão de GSH (2,5 – 40 nM), sendo a atividade da enzima expressa em $[GSH] \cdot \text{hora}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade da glutathione-redutase (GR) foi determinada indiretamente pela redução do NADPH mediante a presença da glutathione oxidada (Carlbert e Mannervik, 1975), em espectrofotômetro a 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$

A concentração de glutathione (GSH) no fígado foi determinada de acordo com o método de Beutler et al. (1963), através da reação dos grupamentos -SH com o reagente de cor 5,5-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB) que foi quantificado em 412 nm. A concentração de glutathione foi expressa em $\mu\text{g GSH} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

Danos oxidativos

Para avaliação da lipoperoxidação foi utilizado o ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, entre elas o malondialdeído [MDA]) de acordo com o protocolo descrito por Camejo et al. (1998). Ao sobrenadante foi acrescentado butilhidroxitolueno (BHT 1M), solução salina fosfatada (2 mM KCl; 1,4 mM NaH₂PO₄; 357 mM NaCl; 10 mM Na₂HPO₄; pH 7,4), ácido tricloroacético (TCA 50%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 1,3%) dissolvido em 0,3% NaOH e a mistura foi mantida a 60°C em estufa por 1 hora. Posteriormente, foi feita a leitura de fluorescência (ex/em: 535/590 nm) e a concentração de TBARS determinada através de uma curva padrão de malondialdeído (MDA). A concentração de TBARS foi expressa em nmol de TBARS. mg de proteína⁻¹.

Para avaliação de danos oxidativos em proteínas foi empregado o método descrito por Levine et al. (1994). O método consiste em reagir o 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas que podem ser detectadas a 358-370 nm. Primeiramente, 200 µl do sobrenadante, previamente normalizado para 2 mg.mL⁻¹ de proteína, foi adicionado a um eppendorf e misturado com 500 µl de DNPH a 10 mM, preparado em HCl a 2 M. O conteúdo do eppendorf foi misturado através de vortex durante 5 min e incubados a 30°C por 1,5 h. Após incubação, as proteínas foram precipitadas em 700 µl de TCA a 28% e centrifugados a 9.000 x g por 10 min. O pellet foi lavado três vezes por ressuspensão (etanol/acetato de etila 1:1), homogeneizado em vortex e centrifugado. As proteínas foram então solubilizadas em hidrocloreto de guanidina a 6 M, centrifugadas a 9.000 x g por 5 min para remover quaisquer resíduos de material insolúvel. O conteúdo de carbonilas foi então determinado em espectrofotômetro de microplaca à 360 nm utilizando o coeficiente de absorção molar de 2,1x10⁴ M⁻¹.cm⁻¹ para hidrazonas. O branco recebeu o mesmo tratamento, contudo sem a adição do DNPH. Os resultados foram expressos nmol carbonilas por mg⁻¹ de proteína.

Concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação de proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. A curva de calibração foi feita com albumina de soro bovino (BSA) e a absorbância lida em espectrofotômetro a 595 nm.

2.2.6 Biomarcadores genotóxicos

Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)

O ensaio alcalino do cometa foi realizado com eritrócitos, com base na metodologia descrita por Singh et al. (1988), com algumas modificações. Após a amostragem, uma alíquota de sangue foi adicionada à solução de soro bovino fetal (SBF, 1:100) e misturado com agarose de baixo ponto de fusão. Esta mistura foi colocada em lâmina de vidro previamente coberta com agarose normal, coberta com lamínula, e permaneceu na geladeira por 30 min. Em seguida as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 % DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 hora. Após esse tempo as lâminas foram transferidas para cubas de eletroforese contendo solução tampão (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) e permaneceram por 30 minutos. Logo depois foram submetidas à eletroforese por 20 minutos (300 mA, 25 V, 1 V.cm⁻¹), e após as lâminas foram neutralizadas com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5), em 3 lavagens de 5 min, e fixadas em etanol por 10 minutos.

Para as análises, as lâminas foram coradas com o corante GelRed (Uniscience) e cobertas com lamínula. Foram examinadas em microscópio de fluorescência na objetiva de 40x em teste cego. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina. Os danos no DNA foram classificados visualmente conforme a migração dos fragmentos de DNA em quatro classes: 0: sem dano visível; 1: cauda menor que o diâmetro do núcleo; 2: comprimento de cauda de 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo; 3: comprimento da cauda maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. Para cada peixe o escore foi calculado multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe de dano pelo valor da classe (0, 1, 2 e 3), gerando um valor entre 0 e 300.

Teste do MN e AENS

O teste do micronúcleo (MN) e de alterações eritrocíticas nucleares (ENA) com coloração fluorescente de laranja de acridina (LA) foram realizados de acordo com a técnica

descrita por Ueda et al. (1992), com algumas modificações. Uma pequena gota de sangue foi misturada na própria lâmina com soro bovino fetal (1:1) e foi realizada uma extensão sanguínea. As lâminas secaram *overnight* e foram então fixadas com metanol por 10 min. No momento da análise, cada lâmina foi corada com 20 µL de laranja de acridina (0,003%) e analisadas imediatamente em microscópio de epifluorescência, em aumento de 1000X. Para cada peixe, foram analisadas 3000 células, sendo avaliada a presença de MN e alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, sendo descritas como alterações eritrocíticas nucleares (AENS) (Carrasco et al., 1990). As AENS foram classificadas em três categorias: núcleo segmentado, núcleo lobulado e núcleo em forma de rim, além da presença de células binucleadas.

2.2.7 Histopatologia de fígado

Para as análises histológicas o lobo direito do fígado (n = 8) foi separado no momento da amostragem, fixado em Bouin (4 – 5 h), conservado em álcool 70%, e posteriormente processado segundo protocolo histológico de rotina passando por processos de desidratação alcoólica seriada, diafanização em xilol e inclusão em parafina a 60°C. Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo semiautomatizado (Leica Biosystems, RM2245) para montagem das lâminas com 5 µm de espessura, que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas em microscópio de luz (Zeiss, Primo Star, Alemanha) com uma câmera acoplada (Zeiss, AxioCamERc 5S, Alemanha) e um sistema computacional de análise e captura de imagens (Zeiss, AxioVision 4.8, Alemanha). A avaliação semiquantitativa das alterações histológicas hepáticas baseou-se na severidade de cada lesão, segundo critério estabelecido por Poleksid e Mitrovic-Tutundžic (1994), fornecendo o Índice de Alteração Histológica (IAH). A análise avalia progressivamente o grau de comprometimento da funcionalidade do órgão da seguinte forma: alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do tecido; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis. Para o cálculo do IAH de cada animal utilizou-se a seguinte fórmula: $IAH = 10^0 \sum I + 10^1 \sum II + 10^2 \sum III$, de modo que I, II e III correspondem ao número de alterações de

estágio I, II e III, respectivamente. A classificação do prejuízo funcional do tecido foi estabelecida segundo o valor obtido para o IAH da seguinte forma: 0 a 10 – funcionamento normal do órgão; 11 a 20 – danos de leves a moderados; 21 a 50 – danos de moderados a severos; 51 a 100 – danos muito severos; > 100 – danos irreparáveis.

2.2.8 Análises estatísticas

Após a verificação da normalidade (teste de Shapiro Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene) dos dados, os resultados encontrados de cada parâmetro para os grupos REF e EXP foram comparados entre si usando o teste *t* de *Student* ou *Mann-Whitney*, para cada um dos tempos experimentais (t5, t15, t30, t60, t90 e t120). Os resultados obtidos para cada local de exposição (REF e EXP) também foram comparados entre si nos diferentes tempos experimentais usando análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskall Wallis). As diferenças, quando indicadas, foram localizadas pelo teste de comparações múltiplas SNK (paramétrico) ou Dunn's (não paramétrico). O uso da estatística paramétrica ou não paramétrica foi definido dependendo da distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Adicionalmente, a análise de componentes principais (PCA) foi aplicada com os diferentes biomarcadores e os níveis de OCPs no fígado (Zar, 1996).

O Índice de Resposta de Biomarcadores (IRB) proposto por Hagger et al. (2008, 2010) foi calculado para cada local experimental (REF e EXP) e para os diferentes tempos de exposição (t5, t15, t30, t60, t90 e t120), com algumas modificações propostas por Parolini et al. (2013). O grupo basal (T₀) foi utilizado como valores de referência e os locais de confinamento *in situ* (REF e EXP) nos diferentes tempos (t5 a t120) foram classificados de acordo com o estado biológico. Os biomarcadores foram categorizados em termos de alterações moleculares, celulares e teciduais de acordo com o nível de organização biológica e foram estabelecidos diferentes pesos para cada categoria. De acordo com Parolini et al. (2013), as alterações histológicas no fígado foram ponderadas com peso 3; os biomarcadores de danos celulares (danos do DNA, ocorrência de MNs, ENAs, LPO e PCC) foram ponderados com peso 2, enquanto os ensaios moleculares (atividade da EROD, GST, SOD, CAT, GPx, GCL, GR e a concentração de GSH) foram ponderados como 1, com base no

pressuposto de que uma alteração em nível de órgão/tecido terá um impacto maior no estado de saúde do organismo do que as variações em nível celular e assim por diante. A porcentagem de alteração foi calculada para cada biomarcador a partir da % de variação dos valores médios do local experimental com relação aos valores do grupo basal, e depois classificou-se em categorias com pontuações de 1 a 4. Os biomarcadores com diferenças pequenas ($\pm 20\%$) receberam uma pontuação de 4, com diferenças entre $\pm 20\%$ a $\pm 50\%$ uma pontuação de 3, com diferenças maiores ($\pm 50 - 100\%$) uma pontuação de 2 e desvios que excederam significativamente o nível basal correspondente ($\pm 100\%$) uma pontuação de 1. Finalmente, o IRB foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{IRB} = \frac{\sum (\text{score biomarcador } n \times \text{peso biomarcador})}{\sum \text{peso biomarcador } n}$$

O IRB foi relacionado com o estado de saúde do animal que representa o grau de variação dos biomarcadores a partir dos níveis normais/ basais, de acordo com as seguintes categorias, conforme definido por Hagger et al. (2008): bom - nenhuma ou pequenas alterações a partir da resposta basal (valor de IRB: 3,01 – 4,0); moderado - alterações moderadas (valor de IRB: 2,76 - 3,00); pobre - alterações importantes (valor de IRB: 2,51 – 2,75); ruim - respostas severamente alteradas (valor de IRB: 0 - 2,5).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Parâmetros físicos e químicos da água

Os parâmetros físicos e químicos da água aferidos em ambos os locais de exposição, em cada tempo experimental estão apresentados na tabela 2.1. As maiores diferenças nestes parâmetros entre o local REF e o local EXP foram observadas nas concentrações de oxigênio dissolvido, que se mostraram maiores em todos os tempos experimentais no local EXP e na condutividade elétrica, que contrário ao OD se mostrou mais elevada no local REF em comparação ao local EXP. Em ambos os locais, variações foram observadas na

temperatura da água, que diminui progressivamente ao longo do período experimental de 120 dias, em virtude de mudanças sazonais esperadas para a região.

Tabela 2.1 - Parâmetros físicos e químicos da água aferidos durante a exposição in situ de *P. lineatus* em dois locais de áreas agrícolas no norte do Paraná: ponto de referência (REF) e ponto experimental (EXP).

Parâmetros da água		Tempo de exposição (dias)						
		0	5	15	30	60	90	120
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	REF	5.7	5.45	5.58	5.62	6.09	7.03	6.53
	EXP	7.69	7.57	7.37	6.66	7.47	7.59	7.78
Temperatura (°C)	REF	24.9	24.6	24.7	24.2	21.5	17.6	17.5
	EXP	26	25.1	25.8	25.1	20.4	20	19.7
pH	REF	7.26	7.24	7.31	7.42	7.08	7.26	7.44
	EXP	7.99	7.63	7.66	7.62	7.17	7.54	7.4
Condutividade (µS cm ⁻¹)	REF	63.8	60.9	63.5	62.8	56.2	50.6	52
	EXP	31.9	31.8	31.9	31.9	28	27.7	26.4
Dureza (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	REF	40.4	42.6	41.2	40.6	45.4	42.8	44.6
	EXP	37.4	37.2	35.4	38.8	36.6	34.4	37.8
Potencial de Oxirredução (mV)	REF	175.3	170.9	174.6	172.7	196.4	185.4	187.7
	EXP	173.7	191.2	174.5	155.1	209.1	202.5	207

2.3.2 Concentrações de agrotóxicos na água e sedimentos

As concentrações de agrotóxicos na água e sedimentos estão apresentadas na Tabela 2.2. Nestas amostras, as concentrações de OCPs mostraram-se relativamente baixas, possivelmente em decorrência da baixa solubilidade destes compostos na água, sendo detectados apenas o α -HCH, em ambos os locais de exposição e o α -endossulfan apenas em uma amostra do local EXP, no tempo experimental de cinco dias (t5). Dos 33 CUPs analisados, foram detectados apenas 5 acima do limite de quantificação os herbicidas 2,4-D e atrazina, os inseticidas malation e fipronil e o fungicida carbendazim. A atrazina foi detectada em todas as amostras, de ambos os locais, indicando a grande utilização deste herbicida nas práticas agrícolas locais, e percebe-se uma diminuição temporal nas suas concentrações, possivelmente em decorrência da diminuição do seu uso nas lavouras com o fim das safras de culturas específicas que utilizam este composto. Por outro lado, percebe-se um aumento relevante das concentrações de 2,4-D e fipronil ao longo do tempo experimental no local EXP, possivelmente em virtude do aumento de utilização destes

produtos em outras culturas específicas em desenvolvimento no local no período amostral. O fungicida carbendazim foi detectado em todas as amostras do local EXP, em contraste com apenas uma amostra positiva no local de REF.

Com relação as concentrações de OCPs nos sedimentos, as diferenças mais relevantes foram observadas nas concentrações de aldrin, β -HCH, α -endossulfan e heptacloro, detectados em maiores concentrações nas amostras coletadas no local EXP em comparação com o local REF. A Σ [OCPs] no local REF foi de $0,20 \pm 0,07$ (média \pm DP) e no local experimental a $0,78 \pm 0,11$ (média \pm DP) $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$.

2.3.3 Ocorrência e perfil de OCPs no fígado de *P. lineatus*

As concentrações médias de OCPs ($\text{ng} \cdot \text{g}$ peso lipídico⁻¹) no fígado dos peixes estão apresentadas na Figura 2.2a. Todos os resultados foram baseados na porcentagem do peso lipídico das amostras. A média da Σ OCPs (Fig.2.2a) nos peixes mantidos em REF variaram de $8,61 \pm 3,73$ a $27,56 \pm 3,04$ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ peso lipídico enquanto nos animais mantidos no local EXP variaram de $11,77 \pm 6,24$ a $60,40 \pm 8,31$ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ peso lipídico. Maiores concentrações de OCPs foram observadas nos peixes confinados em EXP em t5, t90 e t120, em relação a REF. O endossulfan foi o organoclorado que apresentou maior potencial bioacumulativo no fígado de *P. lineatus* ao longo do tempo de exposição, e um aumento expressivo na concentração do inseticida foi observado nos peixes confinados em EXP após 120 dias de exposição (Fig. 2.2b).

Tabela 2.2 - Concentrações de agrotóxicos em amostras de água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e sedimento ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$) coletadas ao longo da exposição *in situ* de *Prochilodus lineatus* em dois locais: referência (REF) e experimental (EXP), em áreas agrícolas do Sul do Brasil.

	Tempo de exposição (dias)											
	5	15	30	60	90	120	5	15	30	60	90	120
	REF						EXP					
Água												
α -HCH	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.005	0.003	<LOQ	0.01	0.01	<LOQ	<LOQ	0.001	0.07
α -Endossulfan	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.004	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2,4 D	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	0.01	0.024	0.032
Atrazine	0.025	0.031	0.031	0.006	0.004	0.003	0.032	0.034	0.029	0.020	0.009	0.004
Carbendazim	n.d.	n.d.	0.004	n.d.	n.d.	n.d.	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Fipronil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0056	0.002	n.d.	0.372	0.708
Malation	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sedimento												
Aldrin	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.08	0.03	0.07	0.06	0.03	0.04
α -HCH	0.03	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.13	<LQ	0.01	0.01
β -HCH	<LQ	0.04	0.01	0.01	<LQ	<LQ	0.16	0.06	<LQ	0.06	0.27	0.19
δ -HCH	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.01
γ -HCH (Lindane)	0.02	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.13	<LQ	<LQ	<LQ
α -Endossulfan	0.01	0.01	0.06	0.11	0.07	<LQ	0.24	0.41	0.09	0.3	0.26	0.50
β -Endossulfan	0.03	<LQ	<LQ	0.01	0.01	<LQ	<LOQ	<LOQ	0.02	<LQ	<LQ	<LQ
p,p-DDT	0.01	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.01	0.02	0.04	<LQ	<LQ	<LQ
4,4-DDD	<LQ	<LQ	0.02	<LQ	0.05	0.1	0.02	0.05	0.11	0.01	0.01	0.01
o,p-DDE	<LQ	<LQ	0.01	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.03	<LQ	0.03	0.02
Heptachlor	0.03	<LQ	<LQ	0.01	0.03	0.04	<LQ	<LQ	0.06	0.29	0.14	0.07
Metoxichlor	0.003	0.002	<LOQ	<LOQ	0.0021	0.003	0.011	0.008	0.007	0.012	0.007	0.005

n.d = não detectado

< LOQ = menor que o limite de quantificação do instrumento

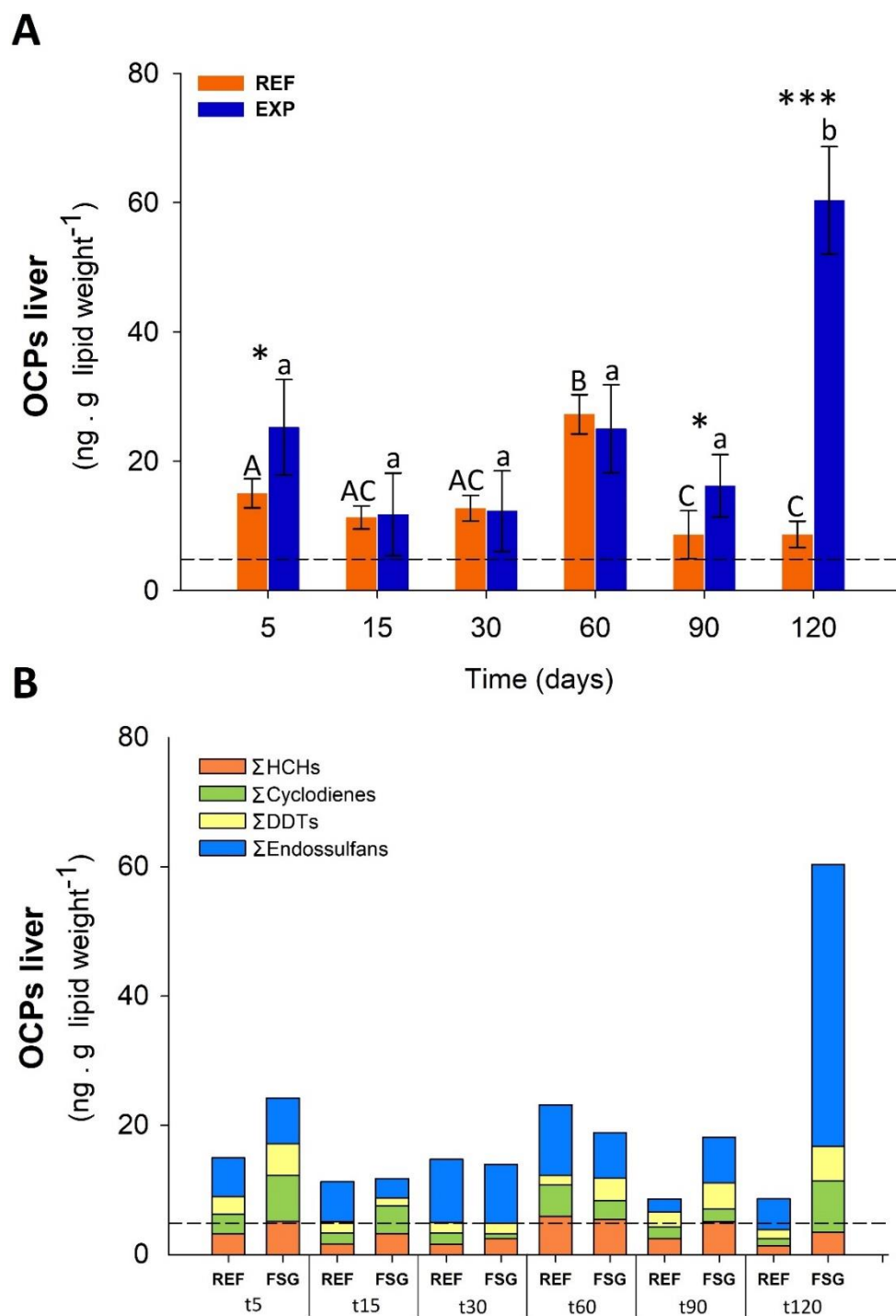


Figura 2.2: Total de organoclorados (A) no fígado de *Prochilodus lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias. As barras representam a média e as linhas verticais o desvio padrão ($n = 4$). As linhas tracejadas representam o valor basal médio para o parâmetro apresentado ($4,84 \pm 1,42$ [média \pm DP]). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos experimentais, para cada local de exposição. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo de exposição ($p < 0,05^*$; $< 0,001^{***}$). (B) Perfil de OCPs no fígado dos peixes, agrupados por classes: HCHs (α , β , γ e δ -hexaclorociclohexano); ciclodienes (aldrin, endrin, dieldrin, endrin cetona, heptacloro, heptacloro epóxido, α e γ -clordano, trans e cis-nonacloro e mirex); DDTs (diclorodifeniltricloroetano - DDT, diclorodifenilcloroetileno - DDE, diclorodifenildicloroetano, DDD e metoxicloro) e endossulfans (α -endossulfan, β -endossulfan e endossulfan sulfato).

2.3.4 Biomarcadores bioquímicos

Enzimas de biotransformação

Os resultados das enzimas de biotransformação no fígado estão apresentados na Fig. 2.3. Com relação à EROD (Fig.2.3 A), houve uma diminuição na atividade da enzima em t15, t30 e t60 nos peixes confinados em EXP em relação aos demais tempos experimentais, e significativamente menor que a atividade observada nos peixes mantidos em REF nos mesmos tempos experimentais. A atividade da GST (Fig.2.3 B) também apresentou variações ao longo do tempo em ambos os locais, mostrando uma diminuição na atividade da enzima em t30 e t60, comparado a outros tempos de exposição. Foi observado um aumento da atividade enzimática em t5 e t120 nos animais expostos a EXP em relação aos demais tempos. Quando comparados os dois locais de exposição, os níveis de atividade enzimática mostraram-se maiores em EXP em relação à REF, nos tempos t5, t30, t60 e t120.

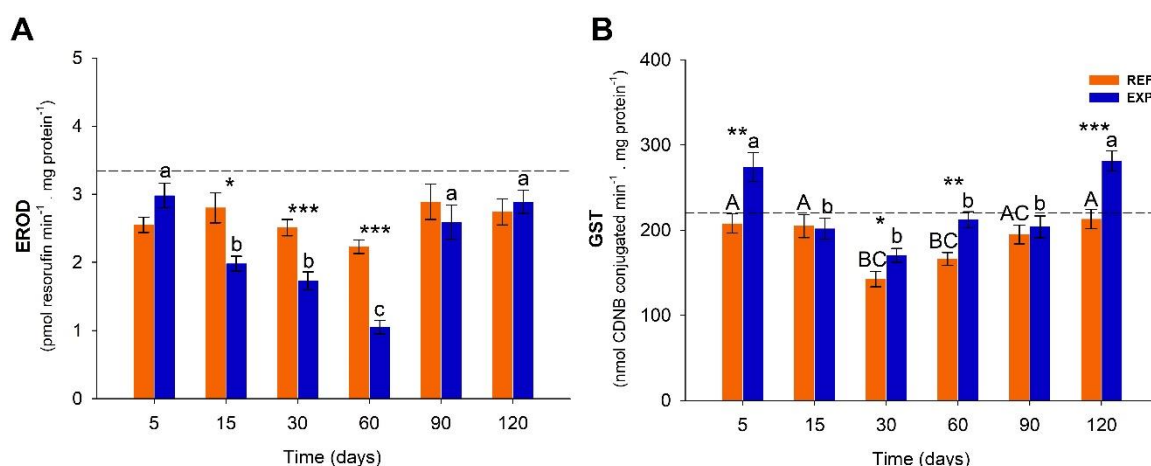


Figura 2.3: Atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase - EROD (A) e glutationa-S-transferase – GST (B) no fígado de *Prochilodus lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão (n = 10 - 15). As linhas tracejadas representam o valor basal (t0) médio para o parâmetro apresentado (EROD = 3,39 ± 0,14; GST = 219,19 ± 13,04). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os tempos experimentais, para cada local de exposição. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo de exposição (p < 0,05*; < 0,01**; < 0,001***).

Defesas antioxidantes

Com relação à atividade da SOD (Fig. 2.4 A) não houve diferenças significativas entre os tempos experimentais e entre os dois locais de exposição. A atividade da CAT (Fig. 2.4 B) mostrou-se maior nos três primeiros tempos de exposição ao local EXP em relação à t60 e t90, e maior em t5 em comparação ao nível de atividade enzimática observada nos peixes confinados em REF. A atividade da GPx (Fig. 2.4 C) manteve-se constante ao longo do tempo experimental nos peixes mantidos em REF, por outro, nos peixes mantidos em EXP, houve um aumento em t60 tanto em relação aos outros tempos como também em relação aos animais engaiolados em REF, no mesmo tempo de exposição. A atividade da GCL (Fig. 2.4 D) mostrou-se maior nos peixes mantidos em EXP nos tempos de t30 e t60 em comparação ao local de REF para os mesmos tempos. A atividade da GR (Fig. 2.4 E) mostrou-se diminuída em EXP após 5 dias de exposição, em comparação à REF, e contrariamente, em t60 um aumento na atividade da enzima foi observado em EXP em relação à REF. Os níveis de GSH (Fig. 2.4 F) mostraram-se aumentados nos peixes mantidos em EXP quando comparados à REF em diferentes tempos de exposição, especificamente em t15, t30 e t60.

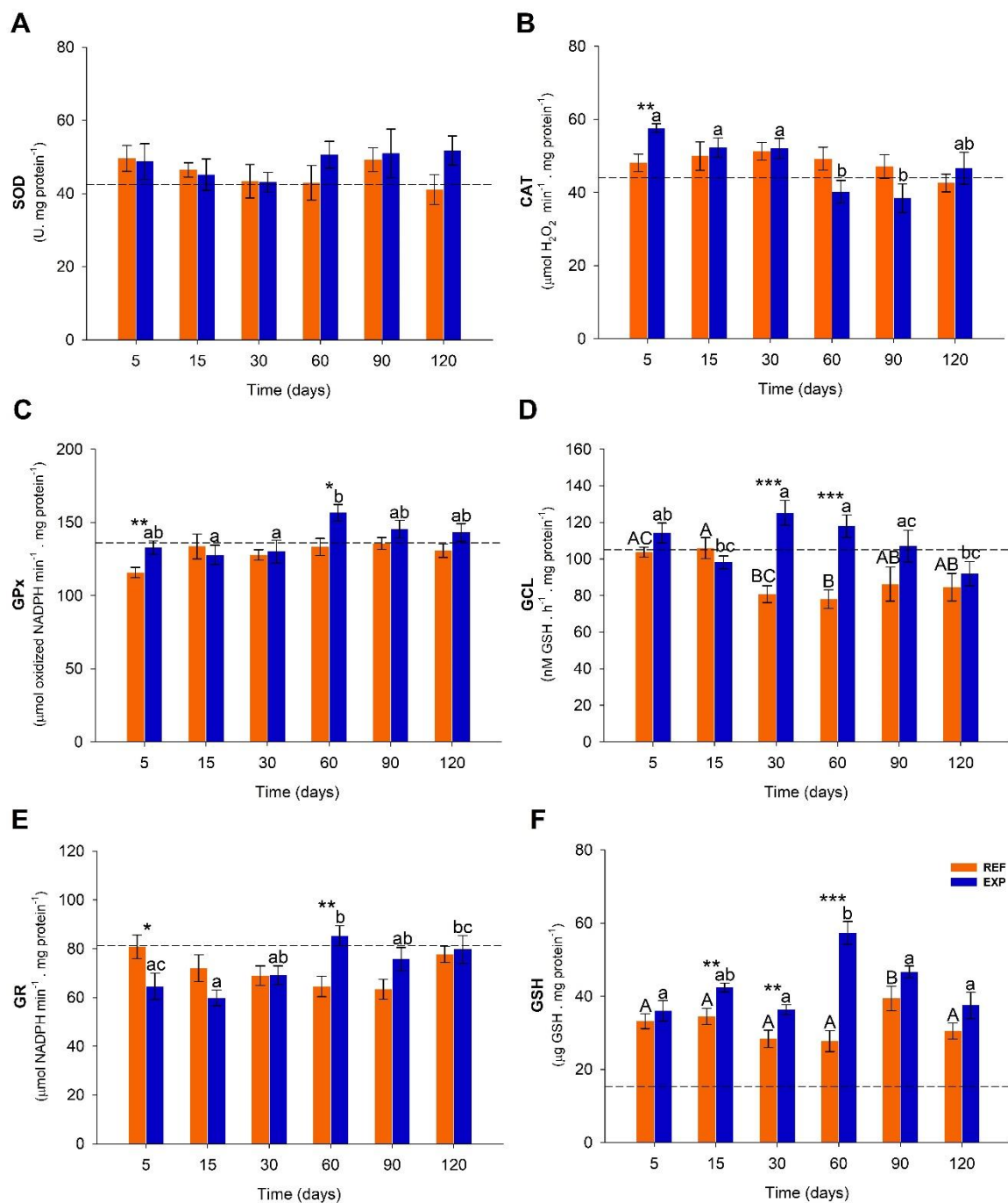


Figura 2.4: Atividade da superóxido dismutase - SOD (A), catalase – CAT (B), glutatona peroxidase – GPx (C), glutamato-cisteína ligase – GCL (D), glutatona redutase – GR (E) e concentração de glutatona – GSH (F) no fígado de *Prochilodus lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão (n = 10 - 15). As linhas tracejadas representam o valor basal médio (t0) para o parâmetro apresentado (SOD = 42,42 ± 3,70; CAT = 43,94 ± 1,35; GPx = 136,67 ± 3,69; 105,01 ± 2,79; GR = 81,21 ± 6,46; GSH = 15,39 ± 1,15). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os tempos experimentais, para cada local de exposição. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo de exposição (p < 0,05*; < 0,01**; < 0,001***).

Danos oxidativos

Concentrações mais elevadas de subprodutos da LPO (Fig.2.5 A) foram detectadas nos peixes mantidos em EXP após 5, 15, 60, 90 e 120 dias de exposição, em relação à REF, bem como o conteúdo de proteínas carboniladas (Fig.2.5 B) após 15, 60, 90 e 120 de exposição, quando comparado à REF para os mesmos tempos experimentais.

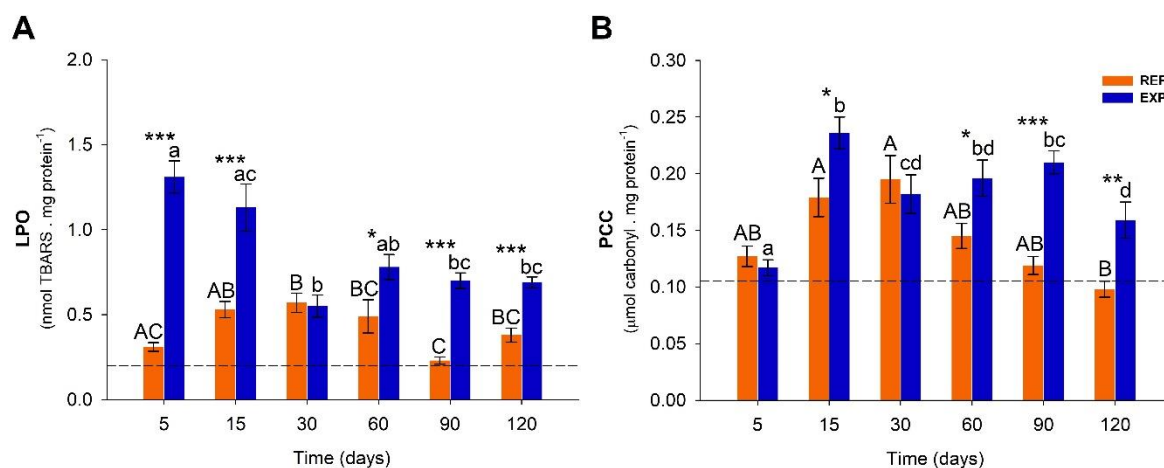


Figura 2.5: Níveis de lipoperoxidação – LPO (A) e conteúdo de proteínas carboniladas – PCC (B), no fígado de *Prochilodus lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão (n = 10 - 15). As linhas tracejadas representam o valor basal médio (t0) para o parâmetro apresentado (LPO = 0,20 ± 0,026; PCC = 0,105 ± 0,007). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os tempos experimentais, para cada local de exposição. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo de exposição (p < 0,05*; < 0,01**; < 0,001***).

2.3.5 Biomarcadores genotóxicos

Com relação as quebras no DNA evidenciadas por meio do ensaio do cometa (Fig. 2.6 A), foram observados maiores escores de danos nos eritrócitos dos peixes mantidos em EXP em todos os tempos experimentais, quando comparados àqueles do local REF. Variações nos níveis destes danos ao DNA foram constatadas ao longo do tempo de exposição nos animais mantidos em EXP, enquanto naqueles mantidos em REF estes níveis não oscilaram durante o período experimental. A frequência de MN (Fig. 2.6 B) aumentou nos animais mantidos em EXP após 90 e 120 dias de exposição, em comparação à REF, e similarmente, um aumento da frequência de AENS (Fig. 2.6 C) também foi constatado, porém, a partir do décimo quinto dia de exposição, permanecendo maior em t30, t60, t90 e t120 nos peixes mantidos no local EXP em relação à REF.

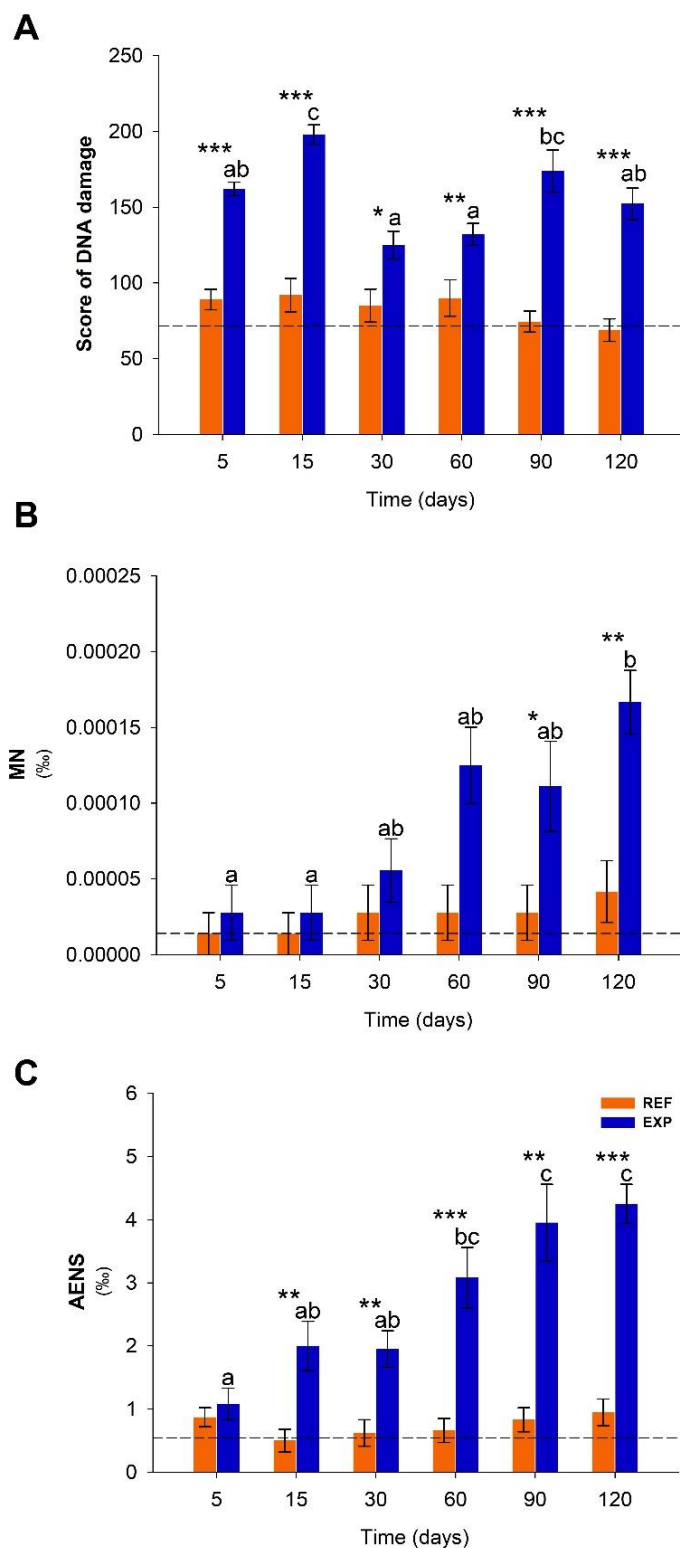


Figura 2.6: Escore de danos no DNA (A), frequência de micronúcleos – MN (B) e alterações eritrocíticas nucleares – AENS (C) em eritrócitos de *Prochilodus lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão ($n = 10$). As linhas tracejadas representam o valor basal médio (t_0) para o parâmetro apresentado (DNA dam = $71,62 \pm 7,35$; MN = $0,000013 \pm 0,000013$; AENS = $0,54 \pm 0,43$). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos experimentais, para cada local de exposição. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo de exposição ($p < 0,05^*$; $< 0,01^{**}$; $< 0,001^{***}$).

2.3.6 Histopatologia de fígado

A arquitetura hepática padrão dos animais do grupo basal está detalhada na Fig.2.7 A. O parênquima hepático mostrou-se bem homogêneo e com hepatócitos com formatos poligonais, núcleos esféricos e nucléolos evidentes e presença de sinusóides delgados em contato com os hepatócitos. As Figs.2.7 B-F mostram as principais alterações morfológicas na arquitetura hepática dos animais confinados *in situ*, principalmente no local EXP. A Tabela 2.3 apresenta a frequência de ocorrência das alterações encontradas, destacando-se: estagnação biliar, agregados de melanomacrófagos, desarranjo dos cordões hepáticos e vacuolização citoplasmática, desarranjo do contorno celular. O IAH (Fig.2.8) foi maior nos tempos de 60, 90 e 120 dias de exposição ao local EXP, em relação aos três tempos mais curtos. Um aumento significativo na ocorrência de alterações hepáticas foi observado nos animais do local EXP em t5 e t90 em relação aos animais do local REF, nos mesmos tempos de exposição. Os valores IAH dos animais mantidos em REF variaram de 18 -51 e indicam a ocorrência de danos leves a severos. Já para os animais mantidos em EXP valores de IAH acima de 51, em t60, t90 e t120, indicam a ocorrência de danos mais severos no tecido e que, portanto, podem comprometer o funcionamento normal das funções hepáticas.

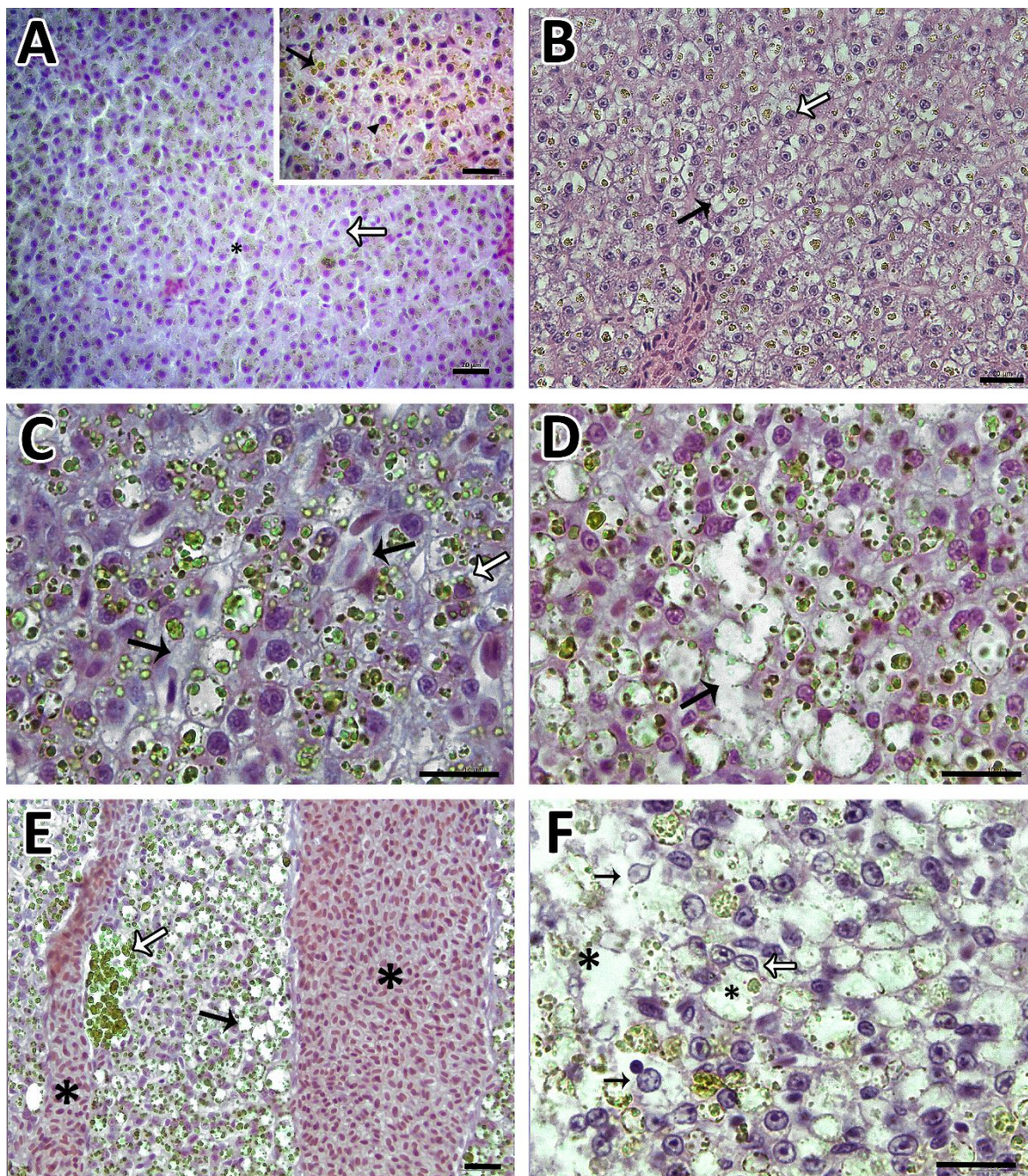


Figura 2.7: Arquitetura hepática de *Prochilodus lineatus* do grupo basal (A) indicando os hepatócitos com formato poligonal (seta branca) e núcleo esférico com presença de nucléolo (ponta de seta), sinusóides (*), e estagnação biliar (seta preta), presente em todos animais, entretanto, em diferentes intensidades. Histopatologias presentes nos animais expostos ao local EXP, indicando em (B) vacuolização citoplasmática (seta preta) e deformação do contorno nuclear (seta branca); (C) aumento do volume dos vasos (seta preta) e deformação do contorno celular (seta branca); (D) rompimento celular (seta); (E) – hiperemia (*), vacuolização citoplasmática (seta preta) que levou à deformação do contorno celular e ao desarranjo dos cordões hepáticos e agregado de melanomacrófagos (seta branca); (F) - vacuolização nuclear (seta preta), deformação do contorno nuclear (seta branca), rompimento celular (*), todos os hepatócitos nesta imagem apresentam deformação do contorno celular e degeneração citoplasmática. Também é possível observar o desarranjo dos cordões hepáticos. Escala: 20 µm. Coloração H&E.

Tabela 2.3 - Alterações histológicas em fígado de *P. lineatus* do grupo basal (t0) bem como confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias.

Alterações	Estágio	REF							EXP						
		t0	t5	t15	t30	t60	t90	t120	t5	t15	t30	t60	t90	t120	
Celulares															
Estagnação biliar	I	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
Agregados de melanomacrófagos	I	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Desarranjo dos cordões hepáticos	I	0	0+	+	++	++	++	++	0+	+	+	++	++	+++	
Deformação do contorno celular	I	0	0+	+	++	++	++	++	0+	+	+	++	++	+++	
Deformação do contorno nuclear	I	0	+	+	+	++	+	++	+	+	0+	+	++	+	
Degeneração citoplasmática	II	0	0	0+	+	+	+	+	0+	+	0+	++	++	+++	
Degeneração nuclear	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0+	0	0	0+	
Vacuolização citoplasmática	I	0	0+	0+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	
Vacuolização nuclear	II	0	0	0+	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	
Rompimento celular	II	0	0	0+	0+	+	+	+	0	0+	0+	+	++	+	
Sanguíneas															
Hiperemia	II	+	+	+	++	+	++	+	+	+	++	++	++	++	
Aumento do volume dos vasos	I	++	++	+	+	0+	+	+	+	++	++	+	0	+	

0, ausente; 0+, raro; +, pouco frequente; ++, frequente; +++, muito frequente; +++++, extremamente frequente.

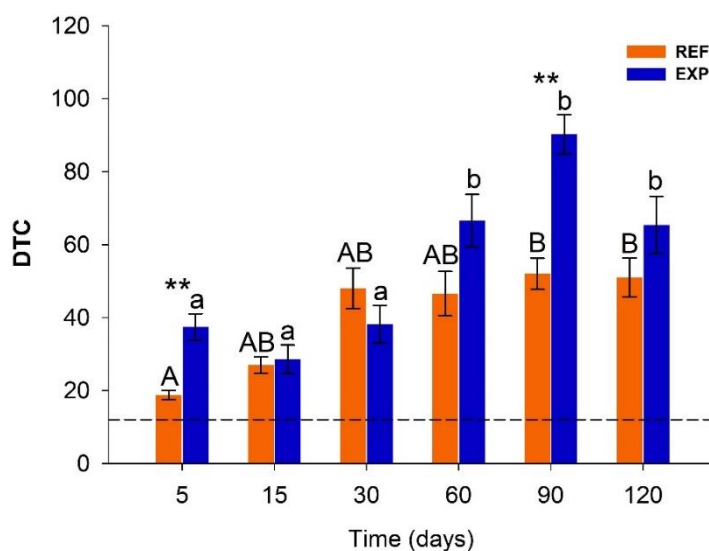


Figura 2.8: Índice de Alteração Histológica (IAH) no fígado de *Prochilodus lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão (n = 8). A linha tracejada representa o valor basal médio (t0) para o parâmetro apresentado (15,62 ± 6,00). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os tempos experimentais, para cada local de exposição. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo de exposição (p < 0,05*; < 0,01**; < 0,001***).

2.3.7 Análises integradas

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada com os diferentes biomarcadores e as concentrações de OCPs no fígado e os resultados são apresentados em um digrama de ordenação biplot (Figura 2.9). Os dois primeiros eixos da PCA (PC1 e PC2) representaram 39,1% da variância total; por outro lado, os outros eixos foram negligenciados porque não forneceram informações adicionais significativas. O primeiro eixo (horizontal) explicou 26,8% da variabilidade total, e separou as unidades amostrais do local de EXP do local REF, sendo quase todos os biomarcadores positivamente relacionados com as amostras do local EXP, e negativamente relacionados com o local REF, com exceção da EROD e da CAT. O segundo eixo (vertical) explicou 12,3% da variabilidade total e foi responsável por uma separação temporal das unidades amostrais do local EXP, onde as amostras de t5 e t120 tiveram uma relação positiva com a GST e os níveis de aldrin, HCHs e DDTs no fígado e na parte negativa as amostras dos tempos t60 e t90 foram fortemente influenciadas pela frequência de AENS, GSH, danos histológicos (DTC) e o conteúdo de PCC.

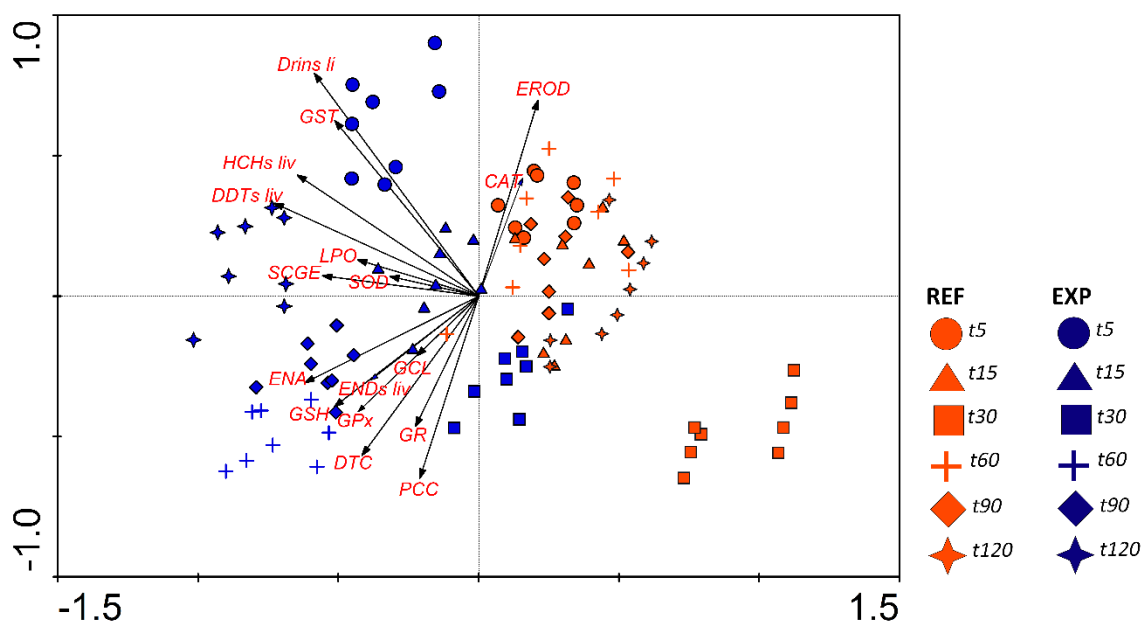


Figura 2.9: Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com as concentrações de organoclorados no fígado (liv), incluindo: hexaclorociclohexanos (HCHs liv), diclorodifeniltricloroetano e seus metabólitos (DDTs liv), endossulfans (ENDs liv) e drins (Drins liv) e diferentes biomarcadores, incluindo as enzimas 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), glutationa S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR), glutamato-cisteína ligase (GCL), danos oxidativos – lipoperoxidação (LPO), proteínas carboniladas (PCC), danos no DNA (SCGE), alterações eritrocíticas nucleares (ENA) e índice de alteração histológica (DTC) mensurados em *Prochilodus lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias.

Os resultados do índice de resposta de biomarcadores (IRB) estão apresentados na Fig.3.10. Os valores de IRB para o local REF variaram de 2,62 a 3,19 e para o local EXP variaram de 1,90 a 2,38. O estado de saúde dos animais mantidos em REF apresentou um leve decréscimo no IRB nos tempos intermediários de exposição (t30 e t60), com uma leve recuperação em t90 e t120. Por outro lado, no local EXP, em todos os tempos de exposição houve um decréscimo nos valores do índice em relação à REF, indicando um mau estado de saúde destes animais.

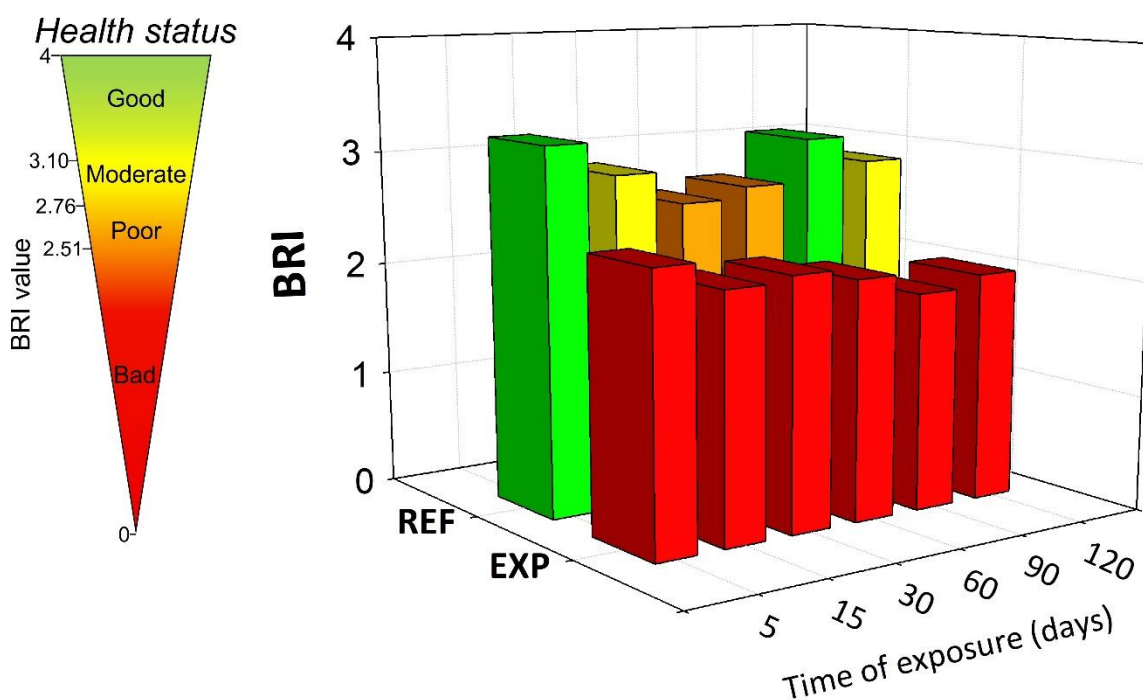


Figura 2.10: Índice de Resposta de Biomarcadores (BRI) e o respectivo estado de saúde calculado para *P. lineatus* confinados *in situ* por 120 dias no local de referência (REF) e experimental (EXP). As cores das barras indicam as seguintes categorias, conforme definido por Hagger et al. (2008): verde – nenhuma ou alterações leves a partir da resposta normal (BRI: 3,01 – 4,0); amarelo - alterações moderadas (BRI: 2,76 - 3,00); laranja – grandes alterações (valor BRI 2.51 - 2.75); vermelho - respostas severamente alteradas (BRI 0 - 2,5).

2.4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que concentrações subletais de agrotóxicos em condições de campo afetaram negativamente o estado de saúde de *P. lineatus* ao longo de 120 dias de exposição *in situ*. Diversas alterações prejudiciais foram evidenciadas nos animais confinados em ambos os locais de exposição. Entretanto, os animais provenientes

do local com níveis mais elevados de contaminantes agrícolas (EXP) apresentaram maiores níveis de danos oxidativos, genéticos e histológicos, como também apresentaram maior acúmulo de OCPs no fígado, que possivelmente está relacionado com as alterações biológicas observadas.

As variáveis limnológicas dos locais REF e EXP estavam dentro dos padrões recomendados para a biota aquática pela Resolução CONAMA 357 (2005). No entanto, os OCPs e CUPs detectados na água e sedimentos e sua presença ou acumulação no fígado de *P. lineatus* confirmaram a contaminação destes locais, em graus de intensidade diferentes. Com relação aos parâmetros físicos e químicos da água, a condutividade elétrica no local REF mostrou-se mais elevada que o local EXP em todos os tempos experimentais. Por tratar-se de um local de cultivo de peixes, o local REF possui uma maior densidade de animais em um espaço menor, e pode apresentar uma maior concentração de compostos iônicos como nitratos e fosfatos e cátions de amônio dissolvidos na água, que elevam a condutividade elétrica neste local. Por outro lado, as concentrações de oxigênio dissolvido foram menores no local REF em comparação ao local EXP, o que também pode estar relacionado à uma maior densidade de animais no local REF e, portanto, um maior consumo aeróbico, ressaltando que não foram observadas concentrações de OD críticas para peixes ($< 5 \text{ mg. L}^{-1}$). A temperatura da água foi a variável que mais oscilou ao longo do período experimental, apresentando um decréscimo gradativo ao longo do tempo, em ambos os locais, o que também já era esperado, uma vez que os experimentos foram conduzidos durante outono e transição para o inverno no hemisfério Sul, que corresponde aos meses onde a temperatura do ar sofre as maiores quedas. Estas temperaturas são naturalmente encontradas nos locais de ocorrência da espécie.

No presente trabalho foram detectados nas amostras de água alguns CUPS amplamente utilizados em práticas agrícolas ao redor do mundo. Concentrações de atrazina foram detectadas em todas as amostras de água, em ambos os locais de exposição, e sua presença na água está relacionada com o uso intensivo deste composto em culturas da região (Vieira et al., 2014; 2016; 2017), além da sua alta solubilidade em água, sendo um herbicida comumente detectado no monitoramento de solos e águas subterrâneas no Brasil (Albuquerque et al., 2016). No presente estudo, as concentrações de atrazina na água diminuíram ao longo do tempo de exposição, em ambos os locais experimentais. Este fato pode estar relacionado com a diminuição na utilização deste herbicida ao longo do período

experimental, pois sua maior utilização na região ocorre nos meses mais quentes do final do verão e início do outono (março/abril), que antecedem o plantio de culturas de inverno, como as culturas de milho. Montagner et al. (2014) analisando diferentes rios do estado de São Paulo, Brasil, verificaram que a atrazina foi o segundo composto mais detectado, numa frequência de 46% das amostras. Estes mesmos autores verificaram que o fungicida carbendazim foi o contaminante mais frequentemente detectado, pois ocorreu em 85% das águas dos rios investigadas. Concentrações de carbendazim também foram detectadas em todas as amostras do local EXP, indicando a utilização frequente deste fungicida nas lavouras da região. Similarmente, Caldas et al. (2013) investigaram os níveis de agrotóxicos em águas superficiais do Sul do Brasil e também detectaram a presença de atrazina e carbendazim.

Ao contrário da atrazina, outros agrotóxicos foram detectados no local EXP em concentrações maiores nos tempos mais longos (t90 e t120), tais como o herbicida 2,4-D e o inseticida fipronil, bastante utilizados para o controle de pragas nas culturas de milho. O fipronil foi o inseticida mais frequentemente encontrado em águas superficiais brasileiras e ocorreu em 54% das 251 amostras analisadas em concentrações de 0,05 a 26,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Albuquerque et al., 2016). Na literatura, os menores valores de critério de qualidade de água reportados para o fipronil são de 0,012 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para águas superficiais da Suíça (Moschet et al., 2014) e para atrazina são 0,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para águas superficiais da Alemanha (Moltmann, 2007), e portanto, as concentrações detectadas neste estudo, embora baixas, podem oferecer algum risco à vida aquática. No Brasil, a concentração máxima de atrazina para águas de classe I e II é de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, já o fipronil não está contemplado na legislação ambiental brasileira (CONAMA, 2005). Também é importante salientar que esses produtos são utilizados de forma intermitente em várias culturas ao longo do ano em grandes áreas ao redor dos corpos d'água locais.

Com relação a ocorrência de OCPs na água, apenas o α -HCH e o α -endossulfan foram detectados acima do limite de quantificação, embora em amostras pontuais. Estes resultados podem estar relacionados com a baixa solubilidade destes compostos na água e sua maior solubilidade em solventes orgânicos, o que os tornam mais tóxicos quando presentes nos sedimentos. Na maioria dos casos, as concentrações de α -HCH detectadas na água estão dentro do limite permissível para proteção da vida aquática (0,02 $\mu\text{g.L}^{-1}$), estabelecido pela legislação ambiental brasileira (CONAMA, 2005), com exceção da

amostra coletada em t120 no local EXP, que apresentou uma concentração de $0,07 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de α -HCH. O α -endossulfan foi detectado no local EXP, em apenas um tempo (t_5), na concentração de $0,004 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, a qual é inferior ao limite máximo permitido pela legislação (CONAMA, 2005) que é de $0,056 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Entretanto, Nogueira et al. (2012) já relataram valores que atingiram $0,94 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de endossulfan em águas superficiais brasileiras.

Por outro lado, em amostras de sedimentos de ambos locais outros compostos foram detectados, como aldrin ($0,01$ a $0,08 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), α -HCH ($0,01$ a $0,13 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), β -HCH ($0,01$ a $0,27 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), α ($0,01$ a $0,50 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) e β -endossulfan ($0,01$ a $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), p,p-DDT ($0,01$ a $0,04 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), 4,4-DDD ($0,01$ a $0,11 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), o,p-DDE ($0,01$ a $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), heptacloro ($0,01$ a $0,29 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), clorotalonil ($0,007$ a $0,11 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) e o metoxicloro ($0,002$ a $0,012 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). De maneira geral, o local EXP apresentou maiores concentrações de aldrin, β -HCH, α -endossulfan, p,p-DDT, o,p-DDE, heptacloro e metoxicloro, comparadas as concentrações detectadas no local REF. A concentração média de OCPs no local EXP ($0,78 \pm 0,11 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) foi cerca de 4x maior que a concentração encontrada no ponto REF ($0,20 \pm 0,07 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). Estes valores foram comparados com os de outros trabalhos em regiões tropicais e subtropicais. Comparando os níveis de p,p-DDT encontrados no local EXP, concentrações similares foram encontradas no Rio Densu, em Gana (Kuranchie-Mensah et al., 2012), na Baía Xinghua (Zhang et al., 2011) e no lago Poyang, na China (Lu et al., 2012), e no mar Egeu, na Turquia (Kucuksezgin e Tolga Gonul, 2012). Concentrações superiores já foram detectadas no Brasil, no Rio Jaguaripe (Oliveira et al., 2016) e na Baía de Guanabara (Souza et al., 2008). Aldrin, dieldrin, heptacloro e endossulfan também foram detectados na água e no sedimento de muitos outros ecossistemas aquáticos no Brasil (Rissato et al., 2006; Souza et al., 2008; Figueiredo et al., 2013, Vieira et al., 2016, 2017).

Entre os OCPs estudados, o α -endossulfan foi o inseticida com os níveis mais altos detectados no sedimento. Li e Macdonald (2005) estimaram que, entre os anos de 1958 e 2000, o Brasil usou 23 toneladas de α -endossulfan e nesse período ocupou a terceira posição na lista dos maiores consumidores mundiais deste inseticida. Ao longo destas décadas, o α -endossulfan foi amplamente utilizado no Brasil como um dos principais agrotóxicos na agricultura, e seu uso, comércio e manufatura foram proibidos desde 2013. Tal como outros agrotóxicos, o endossulfan pode atingir os corpos aquáticos e a mortalidade de peixes é uma consequência do seu escoamento em rios de áreas agrícolas

(Naqvi e Vaishnavi, 1993). A natureza hidrofóbica desse inseticida impede sua degradação rápida e agrava ainda mais a sua toxicidade no meio aquático (Weber et al., 2010).

As maiores concentrações de endossulfan sulfato detectadas no fígado dos peixes engaiolados no local EXP durante 120 dias refletem as maiores concentrações de endossulfan no sedimento deste local, em comparação ao local REF. Desta forma, admite-se que a contaminação subcrônica via trófica teve grande contribuição para os níveis de OCPs encontrados no fígado destes peixes detritívoros. A biotransformação do α e β - endossulfan ocorre no fígado, através da oxidação do citocromo P450 (Lee et al., 2006). Esta via metabólica conduz à formação de endossulfan sulfato, o principal produto de biotransformação de ambos os isômeros (α e β) em organismos aquáticos, e aquele que se acumula, predominantemente no fígado e nos rins, sendo considerado seu principal metabolito tóxico, uma vez que é mais estável no ambiente do que a sua forma original (Wan et al., 2005). Diversos estudos demonstram que o endossulfan atua como neurotoxina induzindo distúrbios comportamentais em peixes (Da Cuna et al., 2013). Este composto também é pró-oxidante e manifesta seus efeitos prejudicando as atividades de enzimas antioxidantes e promovendo peroxidação lipídica (Crupkin et al., 2013; Dar et al., 2015). Sabe-se também que o endossulfan interfere nas propriedades bioquímicas do plasma (Kumar et al., 2016), além de aumentar o nível de glicose no sangue em peixes (Tripathi e Verma, 2004). Também pode atuar como disruptor endócrino (Coimbra et al., 2005; Milla et al., 2011; Da Cuna et al., 2013) afetando o eixo reprodutivo (Da Cuna et al., 2013), reduzindo o desenvolvimento e a maturação dos espermatozoides e ovos, produção e armazenamento de vitelogenina (Han et al., 2011; Da Cuna et al., 2013). Há relatos que documentam efeitos transgeracionais induzidos pelo endossulfan, levando à formação de embriões deformados (Velasco-Santamaria et al., 2011), além de induzir genotoxicidade nos peixes (Pandey et al., 2006; Sharma et al., 2007; Dar et al., 2015).

Uma vez expostos a contaminantes ambientais, os peixes podem apresentar uma série de repostas bioquímicas, visando principalmente sua metabolização e prevenção de danos celulares direta ou indiretamente promovidos por estes contaminantes. Neste estudo, foram observados valores significativamente maiores na atividade da GST nos animais mantidos em EXP durante 5 e 120 dias, indicando um aumento na metabolização de compostos orgânicos via conjugação com a GSH, destacando que em t5 e t120 foram detectadas as maiores concentrações de atrazina e fipronil, respectivamente. A GST é uma

enzima pertencente à fase II de biotransformação de xenobióticos, tornando as substâncias mais hidrofílicas e mais facilmente excretadas (Van der Oost et al., 2003). Diversos autores já relataram aumento na atividade da GST em diferentes espécies de peixes expostos a agrotóxicos, alguns dos quais são utilizados na região do presente estudo, como o 2,4 D (Oruc et al., 2004); atrazina (Paulino et al., 2012), o endossulfan (Dong et al., 2013) e a mistura desses contaminantes e outros em ambientes naturais (Vieira et al., 2016, 2017).

A indução da atividade da EROD em organismos aquáticos é frequentemente utilizada como um biomarcador para monitoramento da exposição a contaminantes orgânicos, como HPAs e PCBs (Whyte et al., 2000, Van de Oost et al., 2003). Os efeitos biológicos destes poluentes orgânicos são iniciados através da ligação com o receptor intracelular aril hidrocarboneto (Van der Oost et al., 2003; Sarkar et al., 2006). Entretanto, no presente estudo, foram observadas diminuições significativas na atividade da EROD no fígado dos peixes mantidos em EXP durante 15, 30 e 60 dias, embora em t90 e t120, tenha ocorrido uma recuperação dos níveis de atividade enzimática para próximo do valor basal. Embora em EXP tenham sido detectadas as maiores concentrações de OCPs (Tabela 2.2), a diminuição da EROD pode estar relacionada aos efeitos inibitórios dos metais na atividade da enzima. Vários estudos também relataram que a inibição da EROD no fígado dos peixes estava relacionada a metais (Sorrentino et al., 2005; Sen e Semiz, 2006). O presente estudo também mostrou que as concentrações de Cu, Cr, Cd e Ni (Capítulo IV, Vieira, 2018) em sedimentos do local EXP foram maiores que as do local REF, o que pode contribuir para a diminuição da atividade da EROD após 15, 30 e 60 dias exposição. Por outro lado, o aumento da atividade da EROD nos animais mantidos no local EXP após 90 e 120 dias de exposição, em comparação com os tempos anteriores, pode indicar a indução da CYP1A em decorrência do acúmulo gradual de endossulfan, acumulado no fígado em sua forma metabolizada nos tempos mais longos de exposição (Fig 2.2). Em humanos, o endossulfan é reconhecido por induzir a atividade da CYP1A e o CYP2B (Dehn et al., 2005). Em peixes, a indução da isoforma CYP1A (atividade de EROD) pelo endossulfan foi relatada "in vivo" na fração microssomal hepática de *Oncorhynchus mykiss* 24 h após injeção intraperitoneal (Jensen et al., 1991) e em *Salmo salar* troficamente exposto durante 34 d (Glover et al., 2007). Esses resultados sugerem que a hidroxilação mediada pela CYP1A1 pode ser importante para a transformação metabólica do endossulfan em endossulfan sulfato em peixes. Assumindo, como em outras espécies de peixes, que a CYP1A1 deve ser induzida

pelo endossulfan, uma possível explicação para a indução enzimática nos últimos tempos de exposição avaliados pode estar relacionado à toxicocinética do composto e ao tempo experimental. Sob exposição trófica à sedimentos com maiores concentrações de endossulfan, tempos mais curtos de exposição podem não ter sido suficientes para permitir que o composto alcançasse concentrações efetivas no fígado de *P. lineatus* para induzir a CYP1A, o que ocorreu nos tempos mais longos.

A resposta geral observada nos biomarcadores bioquímicos em *P. lineatus* após exposição à mistura de contaminantes ambientais no local EXP, foi caracterizada por induções pontuais do sistema antioxidante enzimático e não-enzimático, até 60 dias, juntamente com o aumento dos parâmetros de estresse oxidativo no fígado em quase todos os tempos avaliados. Nos tempos menores que 90 dias houve a indução de enzimas antioxidantes, tais como a CAT e GCL, bem como um aumento no conteúdo do principal antioxidante não enzimático celular, a GSH. O efeito do estresse oxidativo foi caracterizado pelo aumento de TBARS e do conteúdo de proteínas carboniladas (PCC) em maior intensidade nos peixes confinados em EXP, em quase todos os tempos de exposição. Este padrão constitui um caso típico de dano em que os pró-oxidantes superam as defesas antioxidantes (Van der Oost et al., 2003).

A atividade da GR em fígado de *P. lineatus* após 60 dias exposição ao local EXP mostrou um aumento significativo em relação ao local REF. A GR reduz o GSSG para GSH às custas da oxidação do NADPH para NADP⁺, que é reciclado pela via da pentose fosfato. Nesta mesma situação ocorreu um aumento significativo no conteúdo de GSH e na atividade da GCL. Os níveis de GSH nos tecidos são regulados por diversas enzimas (Meister e Anderson, 1983), mas principalmente depende do balanço entre a sua taxa de síntese (pela glutamato-cisteína ligase: GCL), taxa de conjugação (pelas GSTs), taxa de oxidação (não-enzimaticamente ou pela GPx) e pela redução da GSSG à GSH (pela GR). A GCL, também conhecida como glutamil-cisteína sintetase, catalisa a primeira e limitante etapa da taxa na produção do antioxidante celular glutathiona (GSH), envolvendo a condensação dependente de ATP da cisteína e glutamato para formar o dipeptídeo gama-glutamilcisteína (γ -GC) (Franklin et al, 2008). No presente estudo, os níveis de atividade da GCL no fígado dos peixes mantidos em EXP mantiveram-se mais próximos ao valor basal e maiores que aqueles observados em REF após 30 e 60 dias de exposição, refletindo em níveis mais elevados de GSH nestes mesmos animais. Em outras palavras, pode ter havido

uma maior demanda pela síntese de GSH, o principal antioxidante celular não-enzimático, nos hepatócitos em decorrência do aumento de produção de ERO induzido pela exposição à mistura de contaminantes ambientais.

Entre os biomarcadores clássicos de estresse oxidativo, a quantificação de danos em lipídios e proteínas é frequentemente empregada para avaliar o estresse oxidativo induzido por agrotóxicos em diferentes organismos. A ocorrência de danos oxidativos nas membranas biológicas (LPO) e em proteínas (PCC) foi evidenciada em maiores níveis nos animais mantidos em EXP em quase todos os tempos experimentais, indicando um estado de desequilíbrio redox, supostamente pelo aumento na produção de ERO promovida pelos contaminantes, uma vez que os níveis de atividade dos principais antioxidantes celulares mostraram-se pouco alterados. Estudos anteriores mostraram que as concentrações de 1-2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de endossulfan também aumentaram os níveis de TBARS no fígado de *P. lineatus* (Bachetta et al., 2011) e *Jenynsia multidentata* (Ballesteros et al., 2009). Na LPO várias reações bioquímicas deletérias podem surgir a partir de poucos radicais através de uma reação em cadeia, e na carbonilação de proteínas ocorre a formação de grupos carbonila (como grupos aldeído ou cetona) que alteram a conformação protéica e tendem a torná-las mais hidrofóbicas e resistentes à hidrólise (Levine et al. 1994; e Quinlan e Gutteridge, 2000). Deste modo, o aumento da peroxidação lipídica e da carbonilação de proteínas pode resultar em diversos danos às membranas celulares, enzimas, DNA e diversas outras biomoléculas importantes na célula (Van der Oost et al., 2003). Além disso, o efeito cumulativo da peroxidação lipídica tem sido relacionado com numerosas condições patológicas, como anemia hemolítica, isquemia, etc. em vários organismos (Valavanidis et al., 2006). Desta forma, *P. lineatus* ambientalmente exposto a concentrações relativamente baixas de agrotóxicos pode estar sob risco de desenvolver várias doenças.

Além dos biomarcadores bioquímicos, biomarcadores clássicos de danos no material genético foram empregados neste estudo. Com relação às quebras na molécula de DNA, evidenciadas pelo ensaio do cometa, foi observado um aumento no escore de danos no DNA dos eritrócitos dos peixes mantidos no local EXP, em relação ao local REF, em todos os tempos experimentais analisados (Fig. 3.6 A). O ensaio do cometa é uma ferramenta abrangente que permite a avaliação da exposição a uma mistura de contaminantes genotóxicos. Já é bem documentado que diversos agrotóxicos possuem a capacidade de promover danos genéticos em células de peixes mostrando-se um

biomarcador muito sensível à exposição em condições de campo (Bony et al., 2008; Ramsdorf et al. 2012; Vieira et al., 2014, 2016, 2017). Danos no DNA já foram observados em peixes expostos em condições de laboratório à diversos agrotóxicos detectados em maiores concentrações no local EXP, incluindo a atrazina (Çavas, 2011; Santos e Martinez, 2012; Ventura et al, 2012), o endossulfan (Neuparth et al., 2006; Pandey et al., 2006, Sharma et al., 2007), o fipronil (Ghisi et al., 2011) e o carbendazim (Palanikumar et al., 2013).

Corroborando os danos no material genético observados no ensaio do cometa, um aumento na frequência de MN também foi observado nos peixes mantidos em EXP em comparação àqueles mantidos em REF durante 90 e 120 dias, e também na frequência de AENS a partir do tempo experimental de 15 dias (Fig.2.6 B-C). Também foi encontrado um aumento tempo-dependente na frequência destas alterações nos peixes do local EXP, onde níveis maiores destas alterações foram evidenciados nos tempos mais longos de exposição. Acredita-se que as anomalias morfológicas nucleares aconteçam devido a problemas com a *lâmina*, uma proteína do núcleo que confere o formato oval regular e a estabilidade nuclear (Alberts et al., 1997; Ayllon; Garcia-Vazquez, 2000). Sendo assim, estas anomalias caracterizam-se como alterações citotóxicas. Já a formação de MN nas células em divisão resulta da quebra do cromossomo devido a lesões de DNA não reparadas ou mal reparadas, ou da má segregação cromossômica devido ao mau funcionamento do fuso mitótico. Esses eventos podem ser induzidos por estresse oxidativo, exposição a substâncias clastogênicas ou aneugênicas, defeitos genéticos no ponto de controle do ciclo celular e/ou em genes de reparo do DNA e por deficiências de nutrientes necessárias como co-fatores no metabolismo do DNA e segregação cromossômica (Iarmarcovai et al., 2008). Dada a ocorrência de LPO e PCC nos animais mantidos no local e EXP, os danos detectados no material genético podem estar relacionados com estas alterações. Alguns autores, como Seriani et al. (2011), apontam que o estresse oxidativo pode ser responsável pela formação de MN e AENS, em decorrência principalmente do aumento da permeabilidade da membrana nuclear como resultado da lipoperoxidação, tornando o núcleo mais susceptível às alterações promovidas por xenobióticos. Adicionalmente, dentre as espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxil ($\cdot\text{HO}$) é o mais reativo com a molécula de DNA e reage com esta molécula pela adição de ligações duplas nas bases nitrogenadas e pela remoção de um átomo de hidrogênio, tanto do grupo metil da base timina quanto de cada uma das ligações

C-H da pentose desoxirribose (Lackner, 1998). Um aumento nos níveis de proteínas carboniladas, também observado no presente trabalho, levanta a hipótese de que a oxidação de proteínas nucleares pode levar às alterações na morfologia do núcleo. Compostos genotóxicos para peixes foram detectados, e em maiores concentrações no local EXP, tais como a atrazina (Çavas et al., 2011; Nwani et al., 2011) e o endossulfan (Neuparth et al., 2006; Pandey et al., 2006). Através da PCA, é possível observar que o aumento tempo-dependente na frequência destas alterações genéticas parece estar relacionado com a bioacumulação trófica e subcrônica do END no fígado, que é um potencial agente genotóxico para peixes (Crupkin et al., 2013).

Além dos parâmetros em nível subcelular, biomarcadores histológicos foram utilizados no presente estudo como outra ferramenta importante para avaliar lesões em órgãos alvo, os quais podem detectar a exposição aguda e/ou crônica à contaminantes ambientais (Mela et al., 2007; Oliveira Ribeiro et al., 2005; Rabitto et al., 2005). As alterações morfológicas observadas no fígado de *P. lineatus* podem estar relacionadas com alterações fisiológicas e bioquímicas observadas nestes peixes, como o grau de peroxidação lipídica. O fígado é especialmente sensível à contaminação e desempenha inúmeras funções essenciais para os organismos, que incluem o metabolismo de carboidratos, armazenamento de lipídios, síntese e oxidação de ácidos graxos e armazenamento de glicogênio, além de constituir o principal centro de desintoxicação do organismo (Shiogiri et al., 2012). Neste órgão, um aumento do IAH foi observado nos animais expostos ao local EXP após 5 dias de exposição. Entretanto, estes danos foram revertidos em t15 e t30; e após 90 dias de exposição, uma maior frequência e severidade de alterações foi observada, em relação aos animais mantidos no local REF. Adicionalmente, uma resposta temporal foi observada na frequência das alterações histológicas nos peixes mantidos no local EXP, onde os maiores valores de IAH foram observados nos tempos mais longos de exposição. Estes resultados provavelmente estão relacionados ao maior nível de contaminação observado no local EXP, uma vez que a concentração de xenobióticos no ambiente aumenta a incidência de lesões químicas no fígado (Hinton et al., 1992).

Neste estudo, as alterações histológicas mais frequentes no fígado foram as respostas inflamatórias e vacuolização citoplasmática, que constituem respostas comuns de peixes expostos a ambientes aquáticos degradados. As respostas inflamatórias observadas foram constituídas pela infiltração do tecido hepático por melanomacrófagos,

células de defesa com um papel importante na resposta imune a agentes xenobióticos, cuja função é remover, através de fagocitose, partículas estranhas derivadas da degradação celular (Oliveira Ribeiro et al., 2012). Esta infiltração de células de defesa é facilitada pela hiperemia, também frequentemente observada nestes peixes, que representa um processo de adaptação que leva ao aumento do fluxo sanguíneo no tecido hepático, facilitando o transporte de macrófagos para as regiões danificadas deste tecido e também melhorando a oxigenação destas áreas ou ainda, pode indicar um mecanismo auxiliar na desintoxicação. Assim, a hiperemia e a presença dos melanomacróforos podem ser consideradas indicadores de estresse em peixes decorrente da presença de agentes químicos (Anderson e Zeeman, 1995).

Outra alteração bastante frequente em *P. lineatus* foi a vacuolização celular. De acordo com Oliveira Ribeiro et al. (2012), a vacuolização celular é prejudicial a partir do momento em que o metabolismo celular é alterado em consequência do estresse químico. Assim, pode ocorrer o acúmulo de substâncias no citossol que interferem na função celular normal. Essas substâncias podem causar maiores danos, como necrose ou apoptose. Além disso, de acordo com os mesmos autores, a acumulação de lipídios em vesículas constitui um mecanismo de resposta celular quando na presença de agentes químicos lipofílicos, na tentativa de imobilizar essas substâncias, impedindo sua interação com os demais componentes celulares e, neste maneira, minimizar seu efeito tóxico. A presença de OCPs no fígado dos peixes do presente estudo, com destaque maior para o endossulfan corroboram estes autores, visto que estes compostos são altamente lipofílicos, sendo a grande quantidade de vacúolos nos hepatócitos de *P. lineatus* possivelmente um mecanismo de defesa do organismo à estes tóxicos. Similarmente, outros autores também observaram lesões hepáticas em diferentes organismos expostos a concentrações subletais de endossulfan (Choudhary et al.; 2003, Altinok e Capkin, 2007). Paulino et al. (2014) verificaram uma forte correlação entre os danos histológicos encontrados em diferentes órgãos dos peixes *Astyanax fasciatus* e *Pimelodus maculatus*, residentes em um reservatório tropical contaminado por metais e organoclorados, tais como o endossulfan, heptachlor e aldin/endrin, com o acúmulo destes compostos nos animais. Em conjunto, esses dados corroboram vários outros estudos que mostraram alterações patológicas no fígado de peixes expostos a diferentes compostos orgânicos e metais tóxicos (Au 2004; Rabitto et al., 2005). A indução de vacuolização em peixes foi demonstrada *in vivo* após

exposição ao γ -HCH (Braunbeck et al., 1990) e in situ em áreas contaminadas por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Landahl et al., 1990), OCPs e HPAs (Oliveira Ribeiro et al., 2005).

Outra alteração frequentemente encontrada nos peixes mantidos no local EXP principalmente nos tempos mais longos de exposição foi a deformação do contorno celular. Alterações como degeneração nuclear e celular e deformação do contorno celular podem indicar disfunções induzidas por algum agente tóxico, uma vez que áreas metabolicamente ativas do fígado ficam reduzidas, levando a uma possível redução geral nas funções desempenhadas por este órgão (Hinton e Laurén, 1990; Hinton et al., 1992; Teh et al., 1997).

O presente estudo mostra que as alterações histopatológicas no fígado também causam problemas metabólicos. A evidência para isso é a estagnação biliar presente em quase todos os peixes estudados. Esta alteração, denominada colestase, é uma manifestação de uma condição patofisiológica, atribuída à falha do metabolismo ou da excreção de pigmentos biliares. Para que a bilirrubina possa ser excretada, ela deve se solubilizar na água, o que ocorre somente por meio da conjugação com o ácido glucurônico. Então, uma possível diminuição na capacidade de ligação da bilirrubina a esse ácido pode ser a razão para a disfunção hepática (Pacheco e Santos, 2002). Entretanto, no presente estudo, a ocorrência desta alteração pode não ser diretamente associada à presença de um xenobiótico, uma vez que também foi observado nos animais do grupo basal e REF, e pode refletir algum problema nutricional resultante da alimentação dos peixes em cativeiro.

A integração de todos os biomarcadores nas análises integrativas (PCA e RDA) demonstram que os peixes mantidos no local EXP apresentaram um decréscimo no estado de saúde, como consequência dos maiores níveis de danos sub-individuais. A PCA indica uma evidente segregação dos animais mantidos em REF daqueles mantidos em EXP, nos quais a maioria das respostas de biomarcadores se relacionaram positivamente. Além disso, os níveis de OCPs no fígado também se correlacionaram com os animais mantidos no local EXP, indicando uma forte relação entre estes compostos e os danos observados nestes organismos.

O IRB demonstrou um maior comprometimento do estado de saúde dos peixes mantidos no local EXP, como consequência dos danos oxidativos, genéticos e histológicos

observados em maior grau nestes animais. Variações transitórias nas enzimas de biotransformação e estresse oxidativo foram observadas ao longo do período experimental, em ambos os locais, e não forneceram nenhum padrão claro de resposta. Quando aplicadas no IRB, estas variações foram ponderadas com peso I, e tiveram portanto, uma menor importância sobre o estado de saúde dos animais. Alterações oxidativas demonstradas através da LPO e PCC, e indiretamente através das quebras no DNA, foram mais sensíveis e observadas em maior grau nos animais mantidos em EXP de forma generalizada, em todos os tempos de exposição, não apresentando um padrão temporal definido. Estas alterações foram ponderadas com peso II para o cálculo do IRB e tiveram grande contribuição para a diminuição do estado de saúde dos animais mantidos em EXP (menores valores de IRB). Já os danos citotóxicos (MN e AENs) apresentaram uma resposta temporal evidente nos animais expostos ao local mais contaminado e também foram ponderados com peso II. Por fim, os danos histológicos apresentaram um padrão de resposta temporal e os maiores índices de lesões hepáticas foram observadas nos tempos mais longos de exposição. Por sua vez, estas alterações tiveram peso III para o cálculo do IRB, assumindo que estes danos teciduais podem comprometer o funcionamento hepático normal, e portanto, afetar o estado de saúde do animal.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo fornecem fortes evidências de que as atividades agrícolas desenvolvidas na região impactam negativamente os ambientes aquáticos locais e a fauna associada. As concentrações de contaminantes na água, sua bioacumulação no fígado dos peixes e as correlações com as alterações bioquímicas, genéticas e histológicas observadas foram adequadas para determinar a qualidade dos ambientes monitorados bem como o estado de saúde dos animais.

A espécie de peixe *P. lineatus* mostrou-se bastante sensível aos efeitos da exposição à mistura de contaminantes ambientais, e as características biológicas desta espécie, como o seu hábito alimentar detritívoro, tiveram grande contribuição para as respostas biológicas observadas. Embora outros contaminantes não detectados ou analisados no presente estudo também possam contribuir para alterações nos órgãos/tecidos dessa

espécie, os biomarcadores empregados mostraram-se ferramentas úteis de contaminação ambiental, fornecendo um status biológico definitivo de exposição. Esta abordagem experimental integrando química ambiental, biomonitoramento ativo e respostas de múltiplos biomarcadores, em diferentes níveis de organização biológica e tempos de exposição, forneceu um diagnóstico mais realista sobre os potenciais efeitos de misturas de contaminantes em cenários reais de exposição, sobre espécies de peixes tropicais. Esses conjuntos de resultados representam o primeiro estudo desta natureza realizado em ambientes dulcícolas brasileiros e pode dar suporte para gestão e estabelecimento de políticas de conservação futuras.

2.6 REFERÊNCIAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, fourth ed. Garland, New York.
- Albuquerque, A. F., Ribeiro, J. S., Kummrow, F., Nogueira, A. J. A., Montagner, C. C., & Umbuzeiro, G. A. (2016). Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 18(7), 779-787.
- Altinok, I., & Capkin, E. (2007). Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan. *Toxicologic Pathology*, 35(3), 405-410.
- Anderson, D. P., & Zeeman, M. G. (1995). Immunotoxicology in fish. *Fundamentals of aquatic toxicology*, 2, 371-404.
- Araldi, R. P., de Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sá Júnior, P. L., Nozima, B. H. N., Ito, E. T., ... & de Cassia Stocco, R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 72, 74-82.
- Ashauer, R., Boxall, A., & Brown, C. (2006). Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(7), 1899-1912.
- Au, D. W. T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine pollution bulletin*, 48(9-10), 817-834.
- Ayllon, F., & Garcia-Vazquez, E. (2001). Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(3), 221-225.
- Bacchetta, C., Cazenave, J., & Parma, M. J. (2011). Responses of biochemical markers in the fish *Prochilodus lineatus* exposed to a commercial formulation of endosulfan. *Water, Air, & Soil Pollution*, 216(1-4), 39-49.
- Ballesteros, M. L., Wunderlin, D. A., & Bistoni, M. A. (2009). Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(1), 199-205.
- Bereswill, R., Streloke, M., & Schulz, R. (2013). Current-use pesticides in stream water and suspended particles following runoff: Exposure, effects, and mitigation requirements. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(6), 1254-1263.

- Besse, J. P., Geffard, O., & Coquery, M. (2012). Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 36, 113-127.
- Beutler, E. (1975). *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. Grune & Stratton.
- Beutler, E. (1963). Improved method for determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61(5), 882-888.
- Blocksom, K. A., Walters, D. M., Jicha, T. M., Lazorchak, J. M., Angradi, T. R., & Bolgrien, D. W. (2010). Persistent organic pollutants in fish tissue in the mid-continental great rivers of the United States. *Science of the Total Environment*, 408(5), 1180-1189.
- Bonansa, R. I., Amé, M. V., & Wunderlin, D. A. (2013). Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). *Chemosphere*, 90(6), 1860-1869.
- Bonnineau, C., Moeller, A., Barata, C., Bonet, B., Proia, L., Sans-Piché, F., ... & Segner, H. (2012). Advances in the multibiomarker approach for risk assessment in aquatic ecosystems. In *Emerging and priority pollutants in rivers* (pp. 147-179). Springer Berlin Heidelberg.
- Bony, S., Gillet, C., Bouchez, A., Margoum, C., & Devaux, A. (2008). Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: field and mesocosm surveys. *Aquatic toxicology*, 89(3), 197-203.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Braunbeck, T., Gorge, G., Storch, V., & Nagel, R. (1990). Hepatic steatosis in zebra fish (*Brachydanio rerio*) induced by long-term exposure to γ -hexachlorocyclohexane. *Ecotoxicology and environmental safety*, 19(3), 355-374.
- Bundschuh, M., Goedkoop, W., & Kreuger, J. (2014). Evaluation of pesticide monitoring strategies in agricultural streams based on the toxic-unit concept—experiences from long-term measurements. *Science of the Total Environment*, 484, 84-91.
- Caldas, E. D., Coelho, R., Souza, L. C. K. R., & Silva, S. C. (1999). Organochlorine pesticides in water, sediment, and fish of Paranoá Lake of Brasilia, Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(2), 199-206.
- Caldas, S. S., Bolzan, C. M., Guilherme, J. R., Silveira, M. A. K., Escarrone, A. L. V., & Primel, E. G. (2013). Determination of pharmaceuticals, personal care products, and pesticides in surface and treated waters: method development and survey. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5855-5863.
- Camargo, M. M., & Martinez, C. B. (2006). Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental toxicology and pharmacology*, 21(1), 61-69.
- Camejo, G., Wallin, B., & Enojärvi, M. (1998). Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In *Free radical and antioxidant protocols* (pp. 377-387). Humana Press.
- Carlberg, I. N. C. E. R., & Mannervik, B. E. N. G. T. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 250(14), 5475-5480.
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123-2136.
- Carriquiriborde, P., Díaz, J., Mugni, H., Bonetto, C., & Ronco, A. E. (2007). Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere*, 68(4), 613-621.

- Carrquiriborde, P., Mirabella, P., Waichman, A., Solomon, K., Van den Brink, P. J., & Maund, S. (2014). Aquatic risk assessment of pesticides in Latin America. *Integrated environmental assessment and management*, 10(4), 539-542.
- Cavalcante, D. G. S. M., Martinez, C. B. R., & Sofia, S. H. (2008). Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 655(1), 41-46.
- Cavas, T. (2011). In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1431-1435.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M. J., Scarabotti, P. A., & Wunderlin, D. A. (2009). Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution*, 157(11), 3025-3033.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., & Parma, M. J. (2014). Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: a field caging study. *Ecological indicators*, 38, 104-112.
- Chen, W., Zhang, L., Xu, L., Wang, X., Hong, L., & Hong, H. (2002). Residue levels of HCHs, DDTs and PCBs in shellfish from coastal areas of east Xiamen Island and Minjiang Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, 45(1-12), 385-390.
- Choudhary, N., Sharma, M., Verma, P., & Joshi, S. C. (2003). Hepato and nephrotoxicity in rat exposed to endosulfan. *Journal of environmental biology*, 24(3), 305-308.
- Coimbra, A. M., Reis-Henriques, M. A., & Darras, V. M. (2005). Circulating thyroid hormone levels and iodothyronine deiodinase activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following dietary exposure to Endosulfan and Aroclor 1254. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(1), 8-14.
- CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministerio do Meio Ambiente. Resolucao conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005, 2005. [accessed in October 2017]. No. 357 de 17 de marco de 2005. Disponivel em <http://www.mma.gov.br/port/>
- Crupkin, A. C., Carrquiriborde, P., Mendieta, J., Panzeri, A. M., Ballesteros, M. L., Miglioranza, K. S., & Menone, M. L. (2013). Oxidative stress and genotoxicity in the South American cichlid, *Australoheros facetus*, after short-term sublethal exposure to endosulfan. *Pesticide biochemistry and physiology*, 105(2), 102-110.
- Da Cuña, R. H., Pandolfi, M., Genovese, G., Piazza, Y., Ansaldo, M., & Nostro, F. L. L. (2013). Endocrine disruptive potential of endosulfan on the reproductive axis of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Aquatic toxicology*, 126, 299-305.
- Dar, S. A., Yousuf, A. R., Ganai, F. A., & Bhat, F. A. (2015). Assessment of endosulfan induced genotoxicity and mutagenicity manifested by oxidative stress pathways in freshwater cyprinid fish crucian carp (*Carassius carassius* L.). *Chemosphere*, 120, 273-283.
- De Gerónimo, E., Aparicio, V. C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., & Costa, J. L. (2014). Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere*, 107, 423-431.
- Dehn, P. F., Allen-Mocherie, S., Karek, J., & Thenappan, A. (2005). Organochlorine insecticides: impacts on human HepG2 cytochrome P4501A, 2B activities and glutathione levels. *Toxicology in vitro*, 19(2), 261-273.
- Depledge, M. H., Aagaard, A., & Györkös, P. (1995). Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*, 31(1-3), 19-27.

- Dong, M., Zhu, L., Shao, B., Zhu, S., Wang, J., Xie, H., ... & Wang, F. (2013). The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicology and environmental safety*, *92*, 1-9.
- Dores, E. F., Spadotto, C. A., Weber, O. L., Dalla Villa, R., Vecchiato, A. B., & Pinto, A. A. (2015). Environmental behavior of chlorpyrifos and endosulfan in a tropical soil in central Brazil. *Journal of agricultural and food chemistry*, *64*(20), 3942-3948.
- Eggen, R. I., Behra, R., Burkhardt-Holm, P., Escher, B. I., & Schweigert, N. (2004). Peer reviewed: Challenges in ecotoxicology. *Environmental Science and Technology*, *38*(3), 58-64A.
- Eggens, M. L., & Galgani, F. (1992). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. *Marine Environmental Research*, *33*(3), 213-221.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, *7*(2), 88-95.
- Eqani, S. A. M. A. S., Malik, R. N., Cincinelli, A., Zhang, G., Mohammad, A., Qadir, A., ... & Katsoyiannis, A. (2013). Uptake of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) by river water fish: the case of River Chenab. *Science of the Total Environment*, *450*, 83-91.
- FAO. (2002). World Agriculture: towards 2015/2030. Summary report. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, Italy, 97 pp.
- Figueiredo, L., Chiavelli, L., & Costa, W. D. (2013). Determination of Concentration Levels of Organochlorine Pesticides in Water from the Mandacaru Stream in Maringá-Paraná-Brazil Employing Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Letters*, *46*(10), 1597-1606.
- Franklin, C. C., Backos, D. S., Mohar, I., White, C. C., Forman, H. J., & Kavanagh, T. J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular aspects of medicine*, *30*(1-2), 86-98.
- Ghisi, N. C., Oliveira, E. C., Guiloski, I. C., de Lima, S. B., de Assis, H. C. S., Longhi, S. J., & Prioli, A. J. (2017). Multivariate and integrative approach to analyze multiple biomarkers in ecotoxicology: A field study in Neotropical region. *Science of the Total Environment*, *609*, 1208-1218.
- Ghisi, N.C, Ramsdorf, W. A., Ferraro, M. V. M., de Almeida, M. I. M., de Oliveira Ribeiro, C. A., & Cestari, M. M. (2011). Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. *Environmental monitoring and assessment*, *180*(1-4), 589-599.
- Gilliom, R. J. (2007). Pesticides in U.S. streams and groundwater. *Environmental Science and Technology*, *41*(10), 3409 – 3414.
- Glover, C. N., Petri, D., Tollefsen, K. E., Jørum, N., Handy, R. D., & Berntssen, M. H. (2007). Assessing the sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan exposure using tissue biochemistry and histology. *Aquatic Toxicology*, *84*(3), 346-355.
- Guo, J. Y., Wu, F. C., Zhang, L., Liao, H. Q., Tang, Z., Zheng, C., & Zhang, S. (2012). Characteristics of DDTs in fish from Lake Taihu: An indicator of continual DDTs input in China. *Science of the Total Environment*, *437*, 196-199.
- Guzzella, L., Roscioli, C., Vignano, L., Saha, M., Sarkar, S. K., & Bhattacharya, A. (2005). Evaluation of the concentration of HCH, DDT, HCB, PCB and PAH in the sediments along the lower stretch of Hugli estuary, West Bengal, northeast India. *Environment International*, *31*(4), 523-534.
- Hagger, J. A., Jones, M. B., Lowe, D., Leonard, D. P., Owen, R., & Galloway, T. S. (2008). Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. *Marine Pollution Bulletin*, *56*(6), 1111-1118.

- Han, Z., Jiao, S., Kong, D., Shan, Z., & Zhang, X. (2011). Effects of β -endosulfan on the growth and reproduction of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and chemistry*, 30(11), 2525-2531.
- Harrison, R. M., Hester, R. E. (2012). Environmental Impacts of Modern Agriculture, Issues in Environmental Science. Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom, 174 pp.
- Hinton, D. E., Lauren, D. J., Holliday, T. L., & Giam, C. S. (1988, September). Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In *Preprints of Papers Presented at National Meeting, Division of Water, Air and Waste Chemistry, American Chemical Society;(USA)* (Vol. 28).
- Hinton, E.D., Baumann, P.C., Gardner, G.R., Hawkins, W.E., D., J.H., Murchelano, J.D., Okihiro, M.S. (1992). Histopathological biomarkers. In: Al, H.et (Ed.), Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, London, pp. 155-189.
- Hopkins, J., & Tudhope, G. R. (1973). Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *British Journal of Haematology*, 25(5), 563-575.
- Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R. A., & Orsiere, T. (2008). Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658(3), 215-233.
- IBGE (2014). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados agregados. (<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?Z=p&o=8&i=P&c=772>). (Accessed 15 March 2017).
- Jensen, E. G., Skaare, J. U., Egaas, E., & Goksøyr, A. (1991). Response of xenobiotic metabolizing enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to endosulfan, detected by enzyme activities and immunochemical methods. *Aquatic Toxicology*, 21(1-2), 81-91.
- Jha, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), 207-221.
- Keen, J. H., Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1976). Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183-6188.
- Klobučar, G. I., Štambuk, A., Pavlica, M., Perić, M. S., Hackenberger, B. K., & Hylland, K. (2010). Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology*, 19(1), 77.
- Konstantinou, I. K., Hela, D. G., & Albanis, T. A. (2006). The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution*, 141(3), 555-570.
- Kucuksezgin, F., & Gonul, L. T. (2012). Distribution and ecological risk of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in surficial sediments from the Eastern Aegean. *Marine pollution bulletin*, 64(11), 2549-2555.
- Kumar, N., Ambasankar, K., Krishnani, K. K., Gupta, S. K., Bhushan, S., & Minhas, P. S. (2016). Acute toxicity, biochemical and histopathological responses of endosulfan in *Chanos chanos*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 131, 79-88.
- Kuranichie-Mensah, H., Atiemo, S. M., Palm, L. M. N. D., Blankson-Arthur, S., Tutu, A. O., & Fosu, P. (2012). Determination of organochlorine pesticide residue in sediment and water from the Densu river basin, Ghana. *Chemosphere*, 86(3), 286-292.
- Lackner, R. (1998). "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In *Fish ecotoxicology* (pp. 203-224). Birkhäuser, Basel.
- Landahl, J. T., McCain, B. B., Myers, M. S., Rhodes, L. D., & Brown, D. W. (1990). Consistent associations between hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) and polycyclic aromatic hydrocarbons in bottom sediment. *Environmental Health Perspectives*, 89, 195.

- Lee, H. K., Moon, J. K., Chang, C. H., Choi, H., Park, H. W., Park, B. S., ... & Kim, J. H. (2006). Stereoselective metabolism of endosulfan by human liver microsomes and human cytochrome P450 isoforms. *Drug metabolism and disposition*, 34(7), 1090-1095.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E. (1994). [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 233, pp. 346-357). Academic Press.
- Li, Y. F., & Macdonald, R. W. (2005). Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the Arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota: a review. *Science of the total environment*, 342(1-3), 87-106.
- Lie, E., Bernhoft, A., Riget, F., Belikov, S. E., Boltunov, A. N., Derocher, A. E., ... & Skaare, J. U. (2003). Geographical distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in polar bears (*Ursus maritimus*) in the Norwegian and Russian Arctic. *Science of the Total Environment*, 306(1-3), 159-170.
- Lu, M., Zeng, D. C., Liao, Y., & Tong, B. (2012). Distribution and characterization of organochlorine pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediment from Poyang Lake, China. *Science of the Total Environment*, 433, 491-497.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 711-760.
- Mela, M., Randi, M. A. F., Ventura, D. F., Carvalho, C. E. V., Pelletier, E., & Ribeiro, C. O. (2007). Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(3), 426-435.
- Milla, S., Depiereux, S., & Kestemont, P. (2011). The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review. *Ecotoxicology*, 20(2), 305-319.
- Moltmann, J. F., Liebig, M., Knacker, T., Keller, M., Scheurer, M., & Ternes, T. (2007). Relevance of endocrine disrupting substances and pharmaceuticals in surface waters. *Report UBA-FB*, 205(24), 205.
- Montagner, C. C., Vidal, C., Acayaba, R. D., Jardim, W. F., Jardim, I. C., & Umbuzeiro, G. A. (2014). Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surface and drinking waters from the State of São Paulo (Brazil). *Analytical Methods*, 6(17), 6668-6677.
- Moreira, J. C., Peres, F., Simões, A. C., Pignati, W. A., Dores, E. D. C., Vieira, S. N., ... & Mott, T. (2012). Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. *Ciência & Saúde Coletiva*, 17, 1557-1568.
- Moreira, S. M., Moreira-Santos, M., Rendón-von Osten, J., Da Silva, E. M., Ribeiro, R., Guilhermino, L., & Soares, A. M. V. M. (2010). Ecotoxicological tools for the tropics: Sublethal assays with fish to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), 893-899.
- Moschet, C., Wittmer, I., Simovic, J., Junghans, M., Piazzoli, A., Singer, H., ... & Hollender, J. (2014). How a complete pesticide screening changes the assessment of surface water quality. *Environmental Science & Technology*, 48(10), 5423-5432.
- Mouneyrac, C., & Amiard-Triquet, C. (2013). Biomarkers of Ecological Relevance in Ecotoxicology. In *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology* (pp. 221-236). Springer, Dordrecht.
- Muhayimana, A. S., Shihua, Q., Yinghui, W., Xiangsheng, K., & Joshua, O. (2009). Distribution and sources of organochlorine pesticides (OCPs) in Karst Cave, Guilin, China. *Academia Arena*, 1(1) 47-56.
- Naqvi, S. M., & Vaishnavi, C. (1993). Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 105(3), 347-361.

- Neuparth, T., Bickham, J. W., Theodorakis, C. W., Costa, F. O., & Costa, M. H. (2006). Endosulfan-induced genotoxicity detected in the Gilthead Seabream, *Sparus aurata* L., by means of flow cytometry and micronuclei assays. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 76(2), 242-248.
- Niencheski, L. F., & Fillmann, G. (2006). Contaminantes: metais, hidrocarbonetos e organoclorados. *Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros: Aspectos Metodológicos*, 63-118.
- Nogueira, E. N., Dores, E. F., Pinto, A. A., Amorim, R. S., Ribeiro, M. L., & Lourencetti, C. (2012). Currently used pesticides in water matrices in Central-Western Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(8), 1476-1487.
- Oliveira-Ribero, C. A., Reis-Filho, H. S., & Grotzner, S. R. (2012). Técnicas e Métodos para Utilização Prática em Microscopia. São Paulo: Santos.
- Oliveira Ribeiro, C. A., Schatzmann, M., De Assis, H. S., Silva, P. H., Pelletier, E. M. I. L. E. N., & Akaishi, F. M. (2002). Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51(3), 161-167.
- Oliveira Ribeiro, C. A., Vollaire, Y., Sanchez-Chardi, A., & Roche, H. É. L. È. N. E. (2005). Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, 74(1), 53-69.
- Oliveira, A. H., Cavalcante, R. M., Duaví, W. C., Fernandes, G. M., Nascimento, R. F., Queiroz, M. E., & Mendonça, K. V. (2016). The legacy of organochlorine pesticide usage in a tropical semi-arid region (Jaguaribe River, Ceará, Brazil): Implications of the influence of sediment parameters on occurrence, distribution and fate. *Science of the Total Environment*, 542, 254-263.
- Ongley, E. D. (1996). Control of Water Pollution in Agriculture, FAO Irrigation and Drainage Paper 55. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, Italy, 101 pp.
- Oruc, E. O., Sevgiler, Y., & Uner, N. (2004). Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2, 4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 137(1), 43-51.
- Pacheco, M., & Santos, M. A. (2002). Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(3), 331-347.
- Palanikumar, L., Kumaraguru, A. K., Ramakritinan, C. M., & Anand, M. (2014). Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(3), 765-774.
- Pandey, S., Nagpure, N. S., Kumar, R., Sharma, S., Srivastava, S. K., & Verma, M. S. (2006). Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Ecotoxicology and environmental safety*, 65(1), 56-61.
- Parolini, M., Pedriali, A., & Binelli, A. (2013). Application of a biomarker response index for ranking the toxicity of five pharmaceutical and personal care products (PPCPs) to the bivalve *Dreissena polymorpha*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 64(3), 439-447.
- Paulino, M. G., Benze, T. P., Sadauskas-Henrique, H., Sakuragui, M. M., Fernandes, J. B., & Fernandes, M. N. (2014). The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. *Science of the Total Environment*, 497, 293-306.

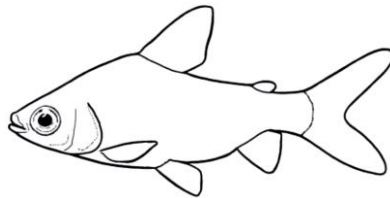
- Paulino, M. G., Souza, N. E. S., & Fernandes, M. N. (2012). Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, *80*, 6-13.
- Pérez, M. R., Rossi, A. S., Bacchetta, C., Elorriaga, Y., Carriquiriborde, P., & Cazenave, J. (2018). In situ evaluation of the toxicological impact of a wastewater effluent on the fish *Prochilodus lineatus*: biochemical and histological assessment. *Ecological Indicators*, *84*, 345-353.
- Poleksić, V., & Mitrović-Tutundžić, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Oxford: Fishing News Books, 339-352.
- Quinlan, G. J., & Gutteridge, J. M. C. (2000). Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Oxford University, New York, 257-258.
- Rabitto, I. S., Costa, J. A., De Assis, H. S., Pelletier, E., Akaishi, F. M., Anjos, A., ... & Ribeiro, C. O. (2005). Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and environmental safety*, *60*(2), 147-156.
- Ramsdorf, W. A., Vicari, T., de Almeida, M. I., Artoni, R. F., & Cestari, M. M. (2012). Handling of *Astyanax* sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. *Environmental monitoring and assessment*, *184*(10), 5841-5849.
- Rissato, S. R., Libânio, M., Giafferis, G. P., & Gerenutti, M. (2004). Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). *Química Nova*, 739-743.
- Rossi, S. C., Da Silva, M. D., Piancini, L. D. S., Ribeiro, C. A. O., Cestari, M. M., & de Assis, H. C. S. (2011). Sublethal effects of waterborne herbicides in tropical freshwater fish. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *87*(6), 603-607.
- Santos, T. G., & Martinez, C. B. (2012). Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, *89*(9), 1118-1125.
- Schlenk, D., Handy, R., Steinert, S., Depledge, M. H., & Benson, W. (2008). Biomarkers. *The toxicology of fishes*, *1*, 683-732.
- Sen, A., & Semiz, A. (2007). Effects of metals and detergents on biotransformation and detoxification enzymes of leaping mullet (*Liza saliens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *68*(3), 405-411.
- Seriani, R., Tavares Ranzani-Paiva, M. J., Silva-Souza, Â. T., & Napoleão, S. R. (2011). Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, *33*(1).
- Sharma, S., Nagpure, N. S., Kumar, R., Pandey, S., Srivastava, S. K., Singh, P. J., & Mathur, P. K. (2007). Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. *Archives of environmental contamination and toxicology*, *53*(4), 617-623.
- Shiogiri, N. S., Paulino, M. G., Carraschi, S. P., Baraldi, F. G., da Cruz, C., & Fernandes, M. N. (2012). Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *34*(2), 388-396.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, *175*(1), 184-191.
- Smiley Jr, P. C., King, K. W., & Fausey, N. R. (2014). Annual and seasonal differences in pesticide mixtures within channelized agricultural headwater streams in central Ohio. *Agriculture, ecosystems & environment*, *193*, 83-95.

- Song, S. B., Xu, Y., & Zhou, B. S. (2006). Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 65(4), 699-706.
- Sorrentino, C., Roy, N. K., Courtenay, S. C., & Wirgin, I. (2005). Co-exposure to metals modulates CYP1A mRNA inducibility in Atlantic tomcod *Microgadus tomcod* from two populations. *Aquatic toxicology*, 75(3), 238-252.
- Souza, A. S., Torres, J. P. M., Meire, R. O., Neves, R. C., Couri, M. S., & Serejo, C. S. (2008). Organochlorine pesticides (OCs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments and crabs (*Chasmagnathus granulata*, Dana, 1851) from mangroves of Guanabara Bay, Rio de Janeiro State, Brazil. *Chemosphere*, 73(1), S186-S192.
- Stanley, J., Preetah, G. (2016). *Pesticide Toxicity to Non-target Organisms*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 502 pp.
- Taylor, B. W., Flecker, A. S., & Hall, R. O. (2006). Loss of a harvested fish species disrupts carbon flow in a diverse tropical river. *Science*, 313(5788), 833-836.
- Teh, S. J., Adams, S. M., & Hinton, D. E. (1997). Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*, 37(1), 51-70.
- Thomas, M., Lazartigues, A., Banas, D., Brun-Bellut, J., & Feidt, C. (2012). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in sediments and fish from freshwater cultured fish ponds in different agricultural contexts in north-eastern France. *Ecotoxicology and environmental safety*, 77, 35-44.
- Tripathi, G., & Verma, P. (2004). Endosulfan-mediated biochemical changes in the freshwater fish *Clarias batrachus*. *Biomed Environ Sci*, 17(1), 47-56.
- Troncoso, I. C., Cazenave, J., Bacchetta, C., & de los Angeles Bistoni, M. (2012). Histopathological changes in the gills and liver of *Prochilodus lineatus* from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Fish physiology and biochemistry*, 38(3), 693-702.
- Ueda, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakamura, T., Kobayashi, J., & Sofuni, T. (1992). A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Science and Technology*, 25(11), 235-240.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64(2), 178-189.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Ventura, B.C., Angelis, D. D. F., & Marin-Morales, M. A. (2008). Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90(1), 42-51.
- Vieira, C. E. D., Almeida, M. D. S., Galindo, B. A., Pereira, L., & Martinez, C. B. D. R. (2014). Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. *Neotropical Ichthyology*, 12(1), 153-164.
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Cabrera, L. C., Primel, E. G., Fillmann, G., Bianchini, A., & dos Reis Martinez, C. B. (2017). A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Science of the Total Environment*, 586, 598-609.
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., da Costa Cabrera, L., Risso, W. E., ... & dos Reis Martinez, C. B. (2016). Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus*

- subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 542, 44-56.
- Vighi, M., & Villa, S. (2013). Ecotoxicology: the challenges for the 21st century. *Toxics*, 1(1), 18-35.
- Wan, M. T., Kuo, J. N., Buday, C., Schroeder, G., Van Aggelen, G., & Pasternak, J. (2005). Toxicity of α -, β -, (α + β)-endosulfan and their formulated and degradation products to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncophynchus mykiss*, *Oncophynchus kisutch*, and biological implications in streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(5), 1146-1154.
- Weber, J., Halsall, C. J., Muir, D., Teixeira, C., Small, J., Solomon, K., et al., & Bidleman, T. (2010). Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Science of the Total Environment*, 408(15), 2966-2984.
- White, C. C., Viernes, H., Krejsa, C. M., Botta, D., & Kavanagh, T. J. (2003). Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. *Analytical biochemistry*, 318(2), 175-180.
- Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., & Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical reviews in toxicology*, 30(4), 347-570.
- Zar, J. H. (1996). Biostatistical analysis—Prentice–Hall International. Inc., London.
- Zhang, J., Qi, S., Xing, X., Tan, L., Gong, X., Zhang, Y., & Zhang, J. (2011). Organochlorine pesticides (OCPs) in soils and sediments, southeast China: a case study in Xinghua Bay. *Marine pollution bulletin*, 62(6), 1270-1275.

Capítulo III

Manuscrito II



1 *A ser submetido ao periódico Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology &*
2 *Pharmacology*

3
4 **Efeitos de multi-estressores em peixes expostos a áreas agrícolas:**
5 **alterações no metabolismo, crescimento e performance natatória**
6

7 Carlos Eduardo Delfino Vieira^a, Paulo César Meletti, Cláudia Bueno dos Reis Martinez

8
9
10 Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid,
11 km 380, Londrina, Paraná, Brazil
12

13
14 **3.1 INTRODUÇÃO**
15

16 Perturbações da integridade e qualidade dos ecossistemas aquáticos, decorrentes
17 das mais diversas atividades humanas, estão expondo cada vez mais estes ambientes a
18 múltiplos estressores, mas a previsão de seus efeitos sobre organismos aquáticos em
19 diferentes níveis biológicos continua sendo um desafio. A resposta ao estresse é um
20 conjunto de respostas fisiológicas adaptativas de organismos submetidos a um estímulo
21 estressor percebido como perigoso, que ajuda a manter a homeostase (Selye, 1950; Barton,
22 2002). Para tanto, a ativação do sistema nervoso simpático – células cromafins e do eixo
23 hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) inicia uma cascata de alterações fisiológicas
24 desencadeadas por hormônios de estresse, catecolaminas (i.e, adrenalina e noradrenalina)
25 e corticosteróides (i.e, cortisol). Uma vez que o estímulo estressor persiste, como a
26 exposição prolongada à contaminantes químicos, e o animal não pode fugir da fonte de
27 estresse, o organismo entra em uma fase de resistência, essencialmente “adaptativa”, que
28 se caracteriza pela indução de sistemas de defesa visando a neutralização de agentes
29 tóxicos, a proteção dos constituintes celulares ou a reparação dos danos causados (Selye,
30 1950). Quando as capacidades adaptativas de defesa e resistência do organismo são
31 excedidas e a homeostase fisiológica e energética não pode ser mantida o organismo entra
32 na fase de exaustão, que pode resultar em efeitos adversos na capacidade do organismo
33 de se alimentar, crescer e se reproduzir, com conseqüente diminuição da sobrevivência e
34 aptidão (Selye, 1950; Barton, 2002).

1 Os fatores de estresse em peixes são diversos, e podem ser divididos em físicos,
2 relacionados a mudanças bruscas das condições abióticas do ambiente, tais como
3 temperatura e oxigenação, químicos, relacionados à deterioração da qualidade da água
4 como a presença de contaminantes diversos, e interações exercidas com outros
5 organismos (relações de competição, dominância e predação), além de manipulações
6 experimentais (confinamento, manipulação), considerados como estressores biológicos.
7 Neste contexto, a crescente contaminação de ecossistemas aquáticos por agrotóxicos ao
8 redor do mundo pode levar à perturbação da homeostase em populações de peixes
9 silvestres, embora os efeitos e consequências da exposição crônica à estes contaminantes
10 seja pouco investigada na literatura (Carriquiriborde et al., 2014).

11 O Brasil é um dos principais países do mundo em termos de área e produção agrícola
12 (OCDE-FAO, 2015). O crescimento agrícola brasileiro está associado a uma expansão de seu
13 território de produção, que aumentou em 34 milhões de hectares entre os anos de 1990 e
14 2012, uma das maiores expansões em termos globais durante esse período (OCDE – FAO,
15 2015). Somado a este avanço, o Brasil destaca-se como o maior consumidor mundial de
16 agroquímicos, consumindo cerca de 20% do total de agrotóxicos consumidos no mundo
17 todo e 86% do total consumido na América Latina (Albuquerque et al., 2016). Entretanto,
18 estudos sobre a ocorrência de resíduos de agrotóxicos em águas doces no Brasil ainda são
19 escassos e estão concentrados em poucos locais de amostragem (Albuquerque et al, 2016).
20 Diferentes agrotóxicos foram detectadas em águas superficiais do Sudeste e Sul do Brasil,
21 principalmente sob a forma de misturas complexas de herbicidas e inseticidas
22 organoclorados (Figueiredo et al., 2013; Paulino et al., 2014; Vieira et al., 2016. Vieira et al.,
23 2017). Além disso, os estudos ecotoxicológicos concentraram-se quase que exclusivamente
24 nos efeitos de uma única molécula enquanto trabalhos sobre os efeitos de misturas
25 complexas e, portanto, mais realistas de agrotóxicos em vertebrados aquáticos são
26 extremamente raros, o que pode levar a uma subestimação dos riscos para a vida selvagem
27 (Carriquiriborde et al., 2014).

28 Em peixes, os agrotóxicos podem induzir neurotoxicidade, dano oxidativo e
29 genotoxicidade, perturbar o sistema imune e a integridade dos órgãos (Polard et al., 2011,
30 Paulino et al., 2014; Vieira et al., 2016). O estabelecimento de sistemas de defesas
31 moleculares (por exemplo, desintoxicação, reparação, e de proteção) aumentam o custo
32 energético para a adaptação e manutenção da homeostase e pode conduzir à uma

1 compensação metabólica (Handy et al., 1999, Marchand et al., 2004). Desta forma, estes
2 estressores podem afetar seriamente a saúde da população influenciando características
3 como o crescimento e o desenvolvimento, a mobilidade, o sucesso de forrageamento e o
4 desempenho reprodutivo (Doving, 1991; Little et al., 1993; Jones e Reynolds, 1997).

5 Nexte contexto é de grande relevância avaliar como estes estressores presentes em
6 ecossistemas agrícolas tropicais podem interagir com os peixes silvestres, quais as
7 respostas fisiológicas desencadeadas por estes organismos frente a multi-estressores e
8 como estas respostas podem afetar parâmetros ecologicamente relevantes, como o
9 crescimento e capacidade de natação. O crescimento somático é um dos processos
10 biológicos mais fundamentais e necessários para a sobrevivência, permitindo que um
11 organismo aumente seu tamanho corporal e armazene energia (Arnott et al., 2006). Por
12 sua vez, o comportamento relaciona funções fisiológicas com processos ecológicos (Scott
13 e Sloman, 2004) e, portanto, é considerado de grande relevância em estudos de poluição
14 aquática (Atchison et al., 1987). O desempenho natatório é uma característica
15 determinante para a sobrevivência das espécies de peixes, porque está envolvido na
16 captura de alimentos, na prevenção de predadores e no comportamento reprodutivo
17 (Kieffer, 2010; Yan et al., 2013). A resistência natatória é a velocidade com que um peixe
18 não consegue mais manter sua posição na coluna d'água, sendo normalmente usada para
19 avaliar o desempenho constante da natação e comumente empregado na natureza durante
20 a competição por recursos limitados, como alimentos, parceiros reprodutivos e condições
21 abióticas favoráveis (Yan et al., 2013, Fu et al., 2013).

22 O curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), é um peixe de água doce
23 que tem sua distribuição nativa nas bacias dos rios Paraná-Paraguai e Paraíba do Sul,
24 América do Sul, e apresenta características biológicas e ecológicas que o torna muito
25 propício para estudos de monitoramento ambiental e avaliação de efeitos de múltiplos
26 estressores em escalas distintas de organização biológica, tais como: i) sua grande
27 abundância em corpos hídricos da região Sul e Sudeste do Brasil, podendo chegar a
28 representar de 50 a 80% da ictiomassa de um rio (Taylor et al., 2006); ii) sua ecologia
29 trófica, sendo uma espécie detritívora de fundo e que, portanto, está em contato tanto
30 com os contaminantes dissolvidos na coluna d'água quanto no sedimento, e iii) sua grande
31 sensibilidade frente à contaminantes diversos, sendo empregada com sucesso em diversos
32 estudos de monitoramento ambiental (Cazenave et al., 2009, 2014; Vieira et al., 2016,

1 Pérez et al., 2018, Lunardelli et al., 2018). Desta forma, o presente trabalho teve como
2 objetivo avaliar as respostas adaptativas ao estresse nos juvenis de curimatás expostos à
3 estressores químicos, integrando diversos *endpoints* biológicos. Para este fim, os peixes
4 foram confinados *in situ* durante 120 dias a dois locais com níveis diferentes de
5 contaminação ambiental em áreas produtivas no Sul do Brasil. A resposta ao estresse foi
6 investigada após 5, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de exposição, em nível subindividual, incluindo
7 parâmetros hematológicos, metabólicos, como os níveis de substratos energéticos e
8 reservas de energia no fígado e músculo branco, e em nível de organismo, incluindo os
9 índices somáticos (índice hepático) e condição de saúde geral do peixe (fator de condição
10 de Fulton), taxa de crescimento e resistência natatória.

11

12

13 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

14

15 3.2.1 Área de estudo

16

17 Os dois locais de confinamento dos peixes, brevemente descritos abaixo,
18 constituem-se de ambientes lacustres construídos ao longo de ribeirões localizados no
19 município de Londrina e região metropolitana, norte do estado do Paraná, Sul do Brasil,
20 distinguidos pelo grau de impacto antrópico exercido sobre os mesmos (Fig. 2.1 Cap. II),
21 sendo estes:

22 *Local de referência* (REF) (23°20'01.35" S e 51°12'31.22"W): localizado em uma
23 sequência de lagos ao longo de um pequeno afluente da microbacia do Ribeirão Cafezal,
24 que constitui a Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL),
25 sendo um local com um menor nível de perturbação antrópica, presença de uma maior
26 faixa de vegetação ciliar e, portanto, menos susceptível à entrada de contaminantes que o
27 local EXP.

28 *Local experimental* (EXP) (23°25,50.43" S e 51°20'28.84"W): constituído de um
29 grande lago construído em um afluente da bacia do Ribeirão Apertados, localizado em uma
30 região de intensa atividade rural, caracterizada pela supressão da vegetação ciliar,
31 prevalência de cultivo de monoculturas não perenes e utilização de mecanização e

1 agrotóxicos, com o risco potencial de contaminação do solo, bem como as águas
2 subterrâneas e superficiais (Vieira et al., 2016).

3

4

5 **3.2.2. Delineamento experimental**

6

7 Juvenis de *P. lineatus* (n= 1000; tamanho médio inicial = $12,94 \pm 3,98$ g; $10,57 \pm 1,16$
8 cm [média \pm DP]; aproximadamente seis meses de idade) foram fornecidos pela EPUEL. Os
9 peixes foram divididos em dois grupos: grupo de referência (REF), onde os animais (n = 500)
10 foram confinados em uma grande gaiola (2 x 2 x 1,5 m; 6000 L), constituída de flutuadores
11 de polietileno e tela de poliéster recoberta com PVC com abertura de malha de 5 mm, na
12 própria EPUEL; e grupo experimental (EXP), onde os exemplares (n= 500) foram
13 transportados para o campo em sacos plásticos contendo água e oxigênio e confinados no
14 recinto, sob as mesmas condições experimentais que o grupo REF. Anterior à introdução
15 dos peixes, um grupo de animais (n = 30) foi amostrado na própria EPUEL para
16 determinação dos valores basais de cada biomarcador (T_0). Os experimentos foram
17 conduzidos durante os meses de março a julho de 2015.

18 As gaiolas foram instaladas com algumas semanas de antecedência à introdução
19 dos peixes para que pudesse ocorrer a entrada de material particulado e sedimento dentro
20 deste compartimento e mantidas no local de maneira que a base da gaiola permanecesse
21 em contato direto com o fundo dos lagos, possibilitando aos peixes o acesso ao sedimento.
22 Adicionalmente, os animais foram alimentados três vezes por semana com ração comercial
23 (Guabi®, 36% de conteúdo proteico), de maneira equivalente em ambos os locais de
24 exposição.

25 Os peixes permaneceram confinados durante um período de 120 dias, e ao longo
26 desse período amostragens periódicas foram realizadas após 5 (t5), 15 (t15), 30 (t30), 60
27 (t60), 90 (t90) e 120 (t120) dias de exposição. Decorrido cada tempo experimental um
28 grupo de animais (n= 50) era retirado de cada local e imediatamente transportado ao
29 laboratório (em trânsito < 1 hora) em caixas plásticas, contendo água do próprio local e
30 oxigenação.

31 Durante a realização dos experimentos, parâmetros físicos e químicos da água (pH,
32 temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade) foram monitorados por meio de um

1 medidor multiparâmetros (YSI ProDSS, USA). Amostras de água superficial e sedimento
2 também foram coletadas em cada local e em cada tempo experimental, para análise de
3 metais traço, pesticidas organoclorados e agrotóxicos de uso atual (Vieira, 2018 – Capítulo
4 II e IV).

5 No laboratório, os peixes foram divididos em dois grupos: um grupo para a
6 realização dos testes comportamentais (n = 15 - 20) e outro para determinação
7 biomarcadores (n = 15 - 20), pressupondo que o exercício intenso pudesse interferir nos
8 parâmetros fisiológicos dos animais. Para a determinação dos biomarcadores os peixes
9 foram anestesiados com benzocaína (0,1 g.L⁻¹), medidos (cm) e pesados (g) e em seguida
10 mortos por secção medular. Os animais tiveram uma amostra de sangue coletada a partir
11 da veia caudal, com o auxílio de seringas heparinizadas, e com o sangue procedeu-se a
12 determinação dos parâmetros hematológicos e metabólicos. Amostras de fígado, cérebro
13 e músculo foram retiradas, armazenadas em tubos criogênicos e imediatamente
14 congelados em nitrogênio líquido e posteriormente mantidas a -80°C até o momento das
15 análises bioquímicas. Estes procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo
16 aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de
17 Londrina (Processo 10493.2014.27).

18

19

20 **3.2.3 Parâmetros hematológicos**

21

22 Uma alíquota de sangue total (50 µL) foi utilizada para a determinação do
23 hematócrito (Hct) em microcapilares de vidro heparinizados e centrifugados (1.200 g, 5
24 min), para a leitura em cartão padronizado, que determina a porcentagem de células
25 vermelhas na amostra. Outra alíquota de sangue (5 µL) total foi diluída em tampão formol
26 citrato (1:200) para a contagem do número de eritrócitos por mm³ de sangue (RBC), em
27 câmara de Neubauer ao microscópio de luz. A concentração de hemoglobina (Hb) foi
28 determinada por meio do método de cianeto de metahemoglobina, utilizando-se um kit
29 comercial (Doles, Brasil), em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido) a 540
30 nm. Após a determinação dos parâmetros hematológicos o sangue total foi centrifugado
31 (1.870 g, 10 min – MCD2000, Hsiangtai, Taiwan), para obtenção do plasma.

32

33

3.2.4 Parâmetros metabólicos

As concentrações plasmáticas de glicose e lactato foram determinadas com a utilização de kits comerciais. Para a dosagem de lactato, utilizou-se kit enzimático (Labtest Diagnóstica, Brasil) adaptado para leitura em espectrofotômetro de microplacas (Victor 3, Perkin Elmer, USA) em 550 nm. A glicemia foi analisada pela técnica da glicose oxidase (Doles, Brasil) em espectrofotômetro de microplacas (Victor 3, Perkin Elmer, USA) à 510 nm.

A concentração de glicogênio hepático e muscular foi determinado pelo método de Bidinotto et al. (1998) após adição de KOH (6N) e etanol para hidrólise e precipitação do glicogênio. O extrato aquoso final foi analisado quanto ao seu teor de açúcares redutores totais pelo método hidrolítico ácido de Dubois et al. (1956), em espectrofotômetro a 480 nm (Libra S32, Biochrom, Reino Unido). O conteúdo de glicogênio foi expresso em $\mu\text{moles de glicosil - glicose} \cdot \text{mg de tecido}^{-1}$.

3.2.5 Atividade da acetilcolinesterase

Os tecidos muscular e cerebral foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5; 1:10 p/v) e centrifugados (10.000 g, 20 min, 4° C) para a análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE), segundo método descrito por Ellman et al. (1961) e adaptado por Alves-Costa et al. (2007) para leitura em espectrofotômetro de microplacas a 415 nm. A atividade da AChE ($\text{nmol DTNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg ptn}^{-1}$) foi determinada nos tecidos através da reação do iodeto de acetilcolina (9 mM) com reagente de cor contendo ditionitrobenzoato (0,5 mM). O produto da degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE, reage com o DTNB formando nitrobenzoato, que foi mensurado espectrofotometricamente a cada 3 minutos pelo tempo total de 6 minutos. A concentração de proteínas totais para a expressão dos resultados foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976).

3.2.6 Índices somáticos e de condição

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

O índice hepatosomático (IHS) foi calculado da seguinte forma:

$$\text{IHS} = \frac{\text{peso do fígado (g)}}{\text{peso total (g)} - \text{peso do fígado (g)}} \times 100$$

O fator de condição de Fulton (FC) foi calculado a partir do peso e comprimento do animal, de acordo com a fórmula:

$$\text{FC} = \frac{\text{peso (g)}}{\text{comprimento (cm)}^3}$$

A taxa de crescimento (TC) em peso dos peixes ao longo do período experimental foi calculada pela fórmula (Kerambrun et al., 2011):

$$\text{TC} = \frac{W_1 - W_0}{t_1 - t_0} \times 100$$

onde W_1 e W_0 correspondem aos pesos corporais dos peixes nos tempos t_0 (início do experimento) e t_1 (tempo amostral). A taxa de crescimento em comprimento foi calculada utilizando a mesma fórmula.

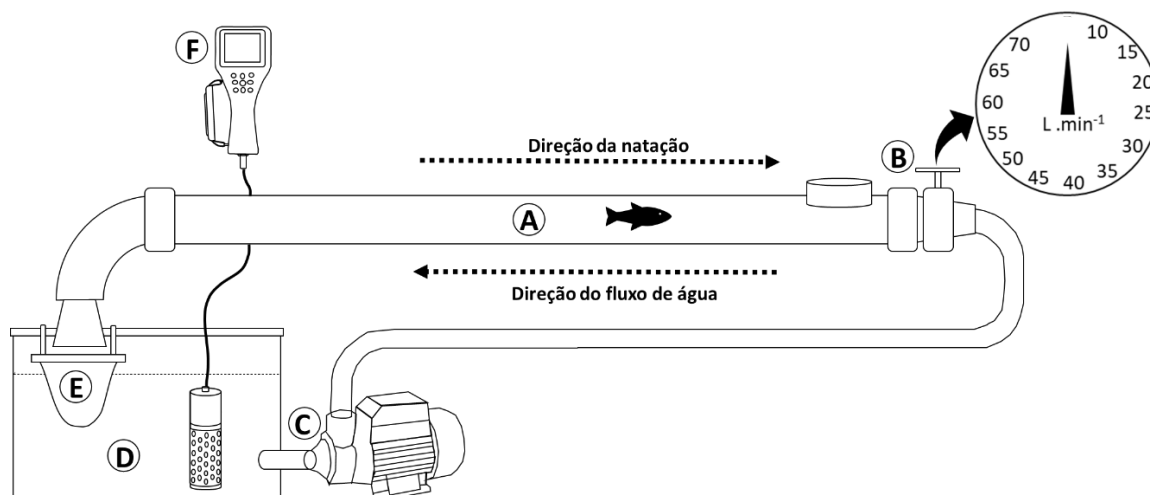
3.2.7 Resistência natatória

Para avaliação da resistência natatória foi utilizado um Dispositivo de Performance Natatória (DPN), previamente testado e padronizado para *P. lineatus* quanto ao tamanho e vazões de água suportadas pelo peixe. A estrutura do DPN é detalhada na Fig.3.1. O desempenho de natação dos peixes foi avaliado por meio da resistência natatória, que se baseia no tempo que o peixe permanece nadando, na vazão máxima suportada até ser arrastado pelo fluxo de água. Para tanto, os animais foram introduzidos na abertura da porção posterior do tubo e deixados para obter uma posição estável, e então forçados a nadar contra a corrente, inicialmente a um fluxo lento ($10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) que foi gradualmente aumentado em $5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ a cada 1 minuto transcorrido, até que os peixes ficassem fatigados e não pudessem mais resistir ao fluxo. O teste de natação foi realizado uma vez por peixe. Durante os testes, a temperatura da água foi constantemente monitorada e mantida próxima à 22°C , sendo periodicamente renovada para evitar o superaquecimento. Após os

1 testes de natação, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1 g.L⁻¹), medidos (cm)
 2 e pesados (g) e posteriormente sacrificados por secção medular. O Índice de Resistência
 3 Natatória foi calculado através da seguinte fórmula:

$$4 \quad \text{IRN} = \text{vazão acumulada} + \frac{\text{tempo (s) na última vazão suportada}}{60} \times \text{última vazão}$$

5



6

7 **Figura 3.1:** Dispositivo de Performance Natatória (DPN) padronizado para os testes de resistência
 8 natatória com *P. lineatus*. O DPN é composto por um sistema fechado, constituído de um tubo
 9 plástico de 1,0 m de comprimento e 50 mm de diâmetro interno (A), um registro para controle da
 10 vazão que mantém o fluxo regular de água na faixa de 10 a 70 L . min⁻¹ (B), uma bomba elétrica de
 11 água (C), conectada a uma caixa plástica receptora preenchida com água (D), uma rede para
 12 interceptação dos peixes após a exaustão e arrasto (E) e um medidor multiparâmetro (F) conectado
 13 ao sistema para monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água durante os testes,
 14 principalmente a temperatura e concentração de oxigênio dissolvido.

15

16

17

18 3.2.8 Análises estatísticas

19

20 Para cada um dos tempos experimentais os resultados encontrados para cada
 21 parâmetro foram comparados entre os dois grupos (REF X EXP) por meio do teste t de
 22 Student ou Mann-Whitney. Os resultados obtidos para cada local de exposição também
 23 foram comparados entre os tempos experimentais (t5 x t15 x t30 x t60 x t90 x t120) usando
 24 análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskall Wallis). As
 25 diferenças, quando indicadas, foram localizadas pelo teste de comparações múltiplas SNK
 26 (paramétrico) ou Dunn's (não paramétrico). O uso da estatística paramétrica ou não

1 paramétrica foi definido dependendo da distribuição dos dados (normalidade e
2 homogeneidade de variância). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

3 O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para verificar a correlação entre
4 o FC e o IRN de todos os peixes analisados, de ambos os locais ao longo do período de
5 exposição. Adicionalmente, os dados também foram analisados através da análise de
6 componentes principais (PCA) (Zar, 1996).

7

8

9 3.3 RESULTADOS

10

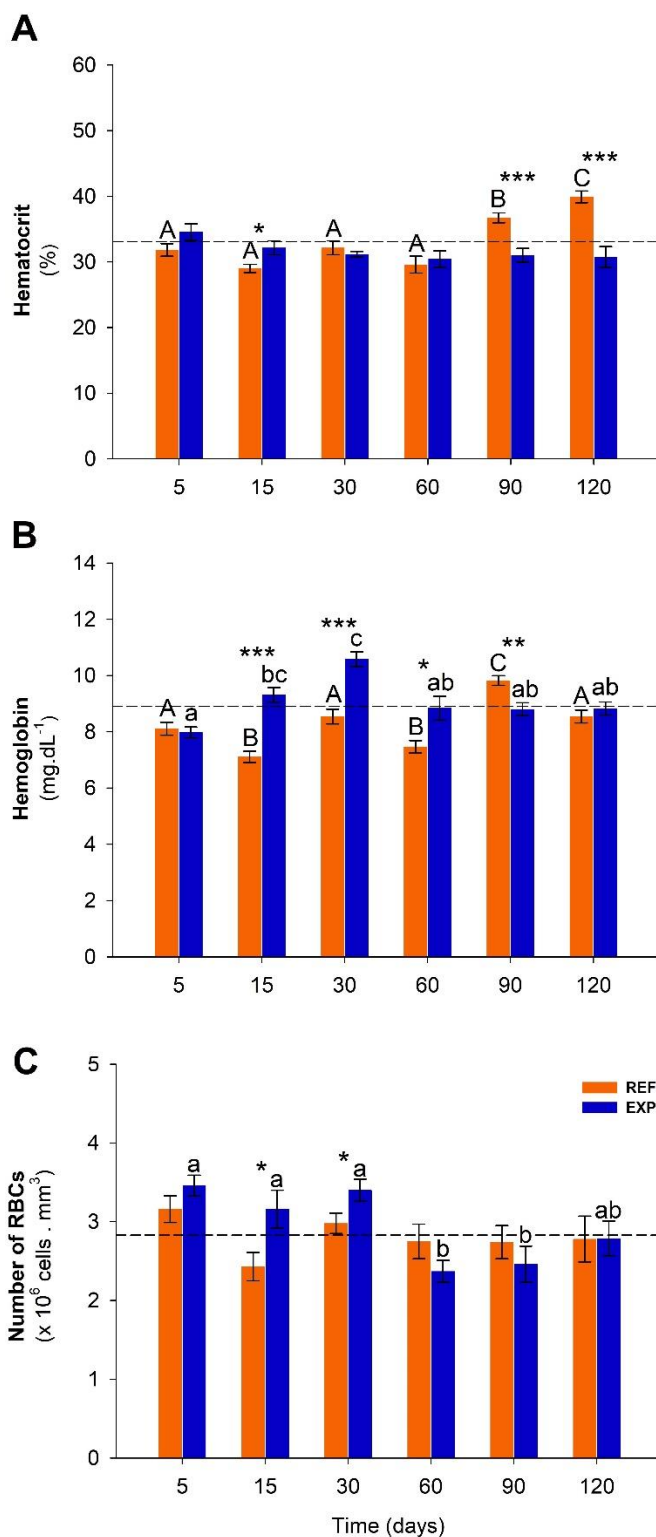
11

12 **3.3.1 Parâmetros hematológicos**

13

14

15 Os valores de hematócrito (Fig.3.2 A) mostraram-se aumentados nos peixes
16 mantidos em REF após 90 e 120 dias, em relação aos demais tempos de exposição. Em t15,
17 houve um aumento no Hct nos peixes mantidos em EXP em relação àqueles mantidos em
18 REF. As concentrações de Hb (Fig. 3.2 B) no sangue dos peixes mantidos em REF
19 apresentaram alterações transitórias ao longo do período experimental, com uma
20 diminuição em t15 e t60 e um aumento em t90 em relação aos outros tempos
21 experimentais. Variações ao longo do tempo também foram observadas nos peixes
22 mantidos em EXP, com um aumento significativo em t15 e t30, quando comparado a outros
23 tempos de exposição. Após 15, 30 e 60 dias de exposição as concentrações de Hb nos peixes
24 mantidos em EXP foram maiores quando comparados à REF. Essa situação se inverteu em
25 90 dias, quando Hb foi maior nos peixes do grupo REF. Com relação ao número de RBCs
26 (Fig. 3.2 C), os animais mantidos no local EXP em 5, 15 e 30 apresentaram um aumento no
27 número de eritrócitos com relação aos tempos mais longos de exposição e este número
28 maior de RBCs foi significativamente maior que REF em t15 e t30.



1

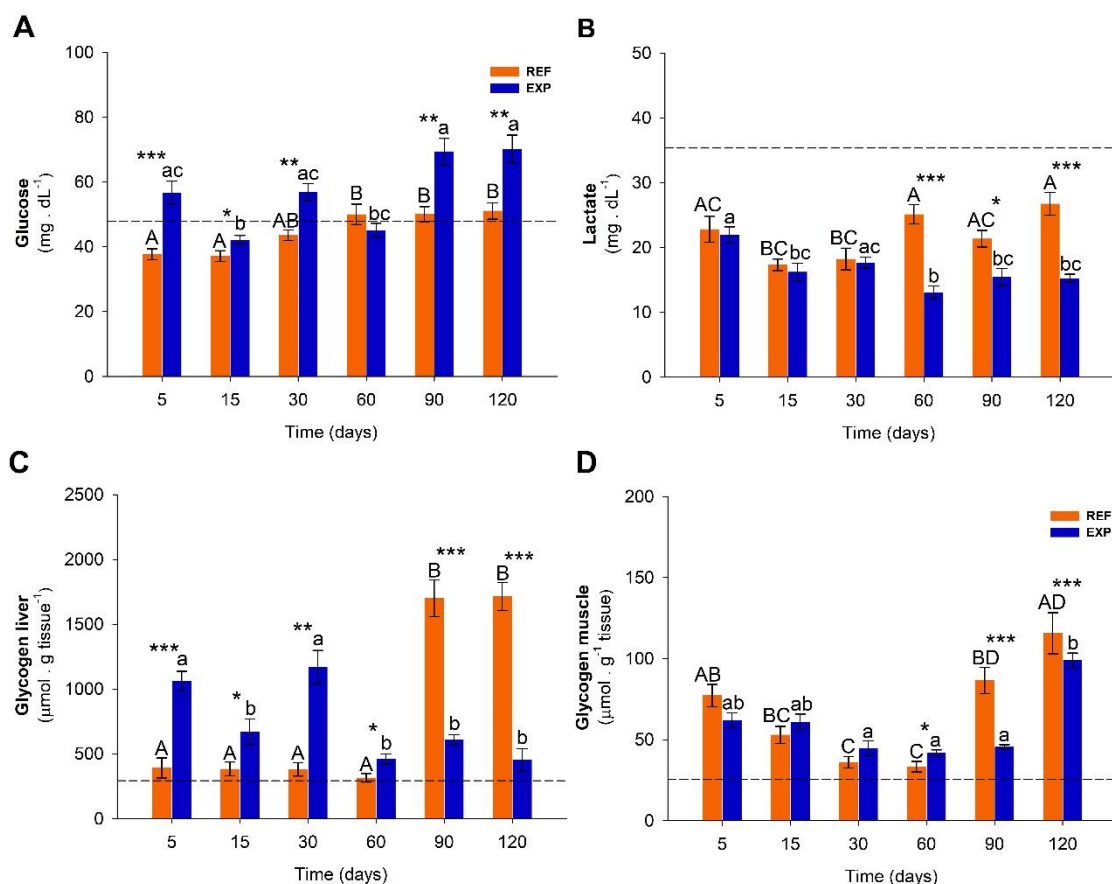
2 **Figura 3.2:** Hematócrito (A), concentração de hemoglobina (B) e número de eritrócitos (C) de
3 *Prochilodus lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120
4 dias. As linhas tracejadas representam o valor basal médio (t0) para o parâmetro apresentado (Hct =
5 33,1 ± 1,15; Hb = 8,94 ± 0,29; RBC = 2,83 ± 0,14). As barras representam a média e as linhas verticais o
6 erro padrão (n = 15 – 20). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os tempos
7 experimentais, para cada local de exposição. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos
8 para cada tempo de exposição (p < 0,05*, < 0,01**, < 0,001***).

1 3.3.2 Parâmetros metabólicos

2

3 Com relação às concentrações plasmáticas de glicose (Fig. 3.3 A), os peixes mantidos
4 em REF apresentaram uma diminuição na glicemia após 5 e 15 dias de exposição, em
5 comparação aos tempos mais longos de exposição. Em EXP, oscilações na glicemia
6 ocorreram ao longo do experimento, com uma diminuição em t15 e t60 em relação à t90 e
7 t120. Em relação aos peixes mantidos em REF, os peixes do local EXP apresentaram maiores
8 valores de glicemia após todos os períodos de exposição, com exceção de t60. Quanto
9 lactato plasmático (Fig. 3.3 B), tanto em REF quanto em EXP houve variações transitórias
10 ao longo do tempo experimental, destacando-se uma diminuição nos níveis do metabólito
11 nos peixes mantidos em REF em t15 e t30 quando comparados à t60 e t120. Nos peixes
12 mantidos em EXP houve uma diminuição do lactato em t15, t60, t90 e t120 em relação à
13 t5, sendo que as concentrações observadas em t60, t90 e t120 foram menores quando
14 comparadas àquelas dos peixes mantidos em REF, nos mesmos tempos experimentais.

15 Em relação às concentrações hepáticas de glicogênio (Fig. 3.3 C), foi possível
16 observar um padrão de resposta oposto entre os dois locais de exposição. Os peixes
17 confinados em REF mostraram um aumento nas concentrações de glicogênio em t90 e t120
18 comparado aos demais tempos de exposição, enquanto que nos peixes mantidos em EXP
19 houve uma diminuição no glicogênio hepático em t60, t90 e t120 comparado ao tempo
20 mais agudos de exposição (t5). Quando comparados os dois locais de exposição, em todos
21 os tempos, foram encontradas diferenças significativas nos níveis do carboidrato. No
22 músculo (Fig. 3.3 D), houve um aumento nas concentrações de glicogênio nos peixes
23 mantidos no local de REF em t90 e t120 em relação à t30 e t60, e essas concentrações
24 foram significativamente maiores em relação aos animais mantidos em EXP, nos mesmos
25 tempos experimentais (t90 e t120). Também foram observadas diferenças nas
26 concentrações de glicogênio muscular nos peixes confinados em EXP ao longo do tempo,
27 onde a concentração de glicogênio em t120 foi maior que t30, t60 e t90.



1

2 **Figura 3.3** - Concentrações plasmáticas de glicose (A) e lactato (B) e de glicogênio hepático
 3 (C) e muscular (D) de *P. lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e
 4 experimental (EXP) ao longo de 120 dias. As barras representam a média e as linhas
 5 verticais o erro padrão (n = 15 – 20). As linhas tracejadas representam o valor basal médio
 6 (t0) para o parâmetro apresentado (glicose = 47,87 ± 2,35; lactato = 35,38 ± 2,03; glic. fig.
 7 = 293,93 ± 39,13; gli. mus. = 25,56 ± 1,96). Letras diferentes indicam diferenças
 8 significativas (p < 0,05) entre os tempos experimentais, para cada local de exposição.
 9 Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo de exposição (p
 10 < 0,05*; < 0,01**; < 0,001***).

11

12

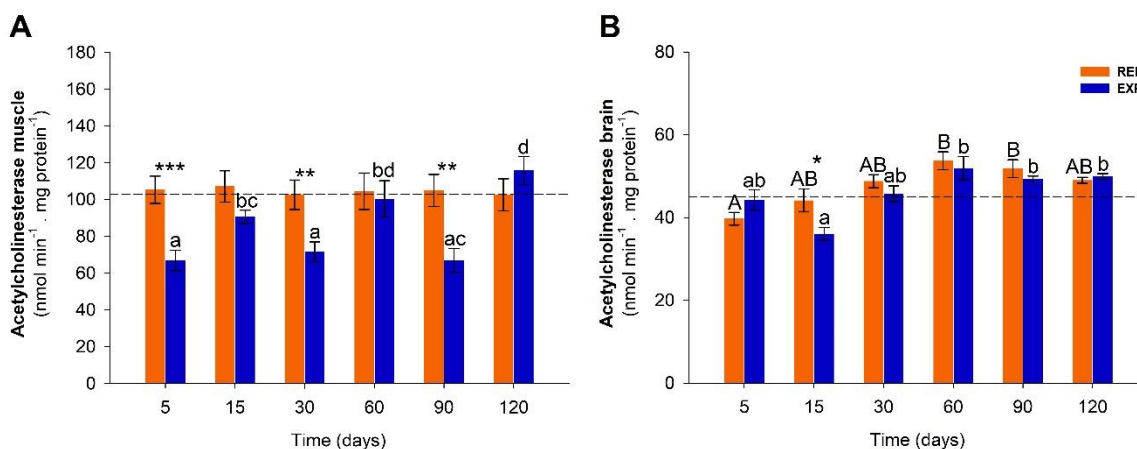
13 3.3.3 Atividade da AChE

14

15 Variações transitórias na atividade da AChE muscular (Fig.3.4 A) foram observadas
 16 nos peixes mantidos no local EXP, com valores menores observados em t5, t30 e t90 em
 17 comparação com os demais períodos de exposição, sendo estes valores significativamente
 18 menores dos níveis de atividade da enzima observadas nos peixes mantidos em REF, nos
 19 mesmos tempos de exposição. No cérebro (Fig.3.4 B), variações na atividade enzimática
 20 foram observadas tanto no local REF quanto no local EXP ao longo do tempo de exposição;

1 e após 15 dias de exposição, uma redução na atividade da AChE ocorreu nos peixes
2 mantidos em EXP em comparação à REF.

3



4

5 **Figura 3.4** - Atividade da acetilcolinesterase muscular (A) e cerebral (B) de *P. lineatus*
6 confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias.
7 As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão (n = 15 – 20). As linhas
8 tracejadas representam o valor basal médio (t0) para o parâmetro apresentado (AChE
9 musc. = 103,0 ± 4,98; AChE cer. = 45,04 ± 0,98). Letras diferentes indicam diferenças
10 significativas (p < 0,05) entre os tempos experimentais, para cada local de exposição.
11 Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo de exposição (p
12 < 0,05*; < 0,01**; < 0,001***).

13

14

15 3.3.4 Índices somáticos e taxa de crescimento

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

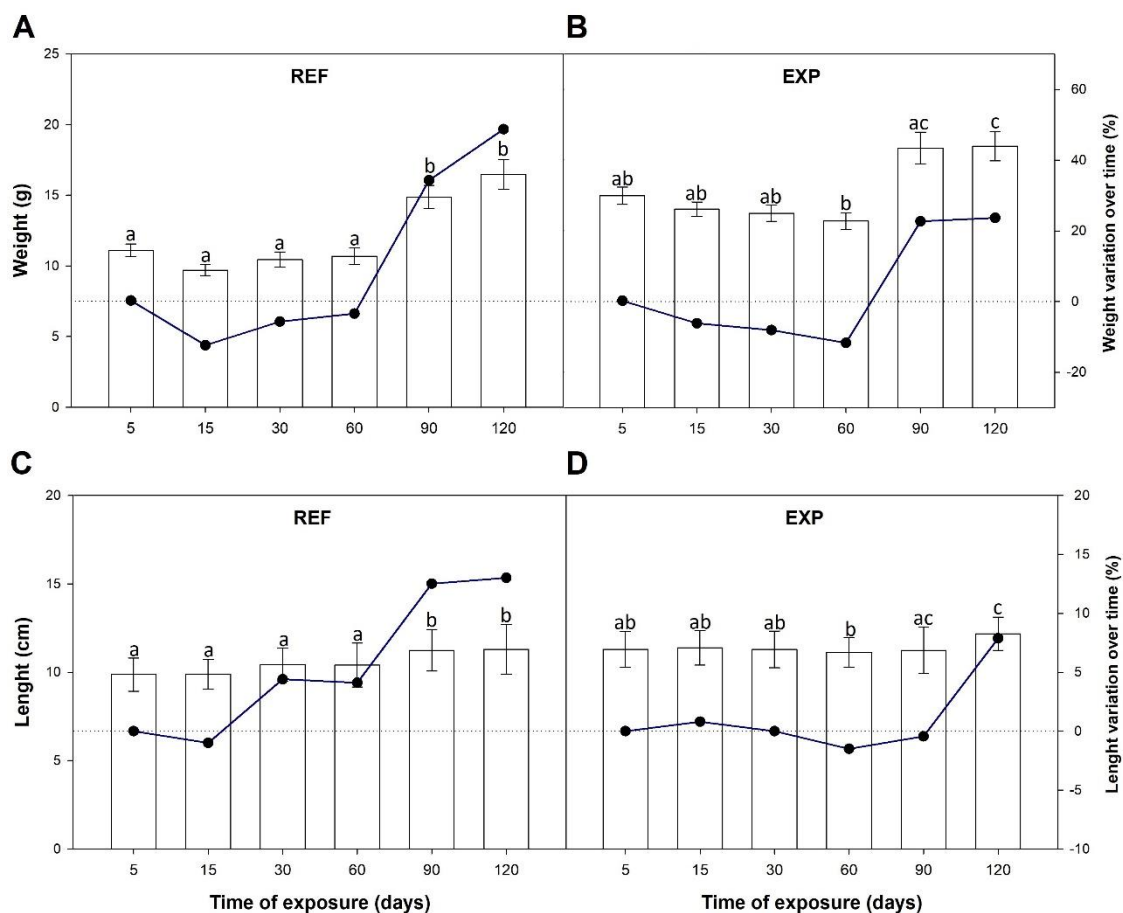
26

27

Os peixes confinados no local REF, apresentaram um peso inicial de 11,08 ± 0,44 g e um peso final de 16,47 ± 1,06 g (média ± DP) após 120 dias de exposição *in situ* (Fig. 3.5 A), o que corresponde a um incremento de 44,9% no peso somático ao longo do período experimental. Com relação ao comprimento (Fig. 3.5 C), estes animais apresentaram um tamanho inicial de 9,9 ± 0,94 cm e um comprimento final de 11,29 ± 1,4 cm, que corresponde a um crescimento de 13,4% em relação ao tamanho inicial. Por outro lado, os animais mantidos no local EXP, apresentaram um peso inicial de 14,98 ± 0,62 g e um peso final de 18,49 ± 1,03 g após 120 dias de confinamento, que corresponde a 23,5% de aumento em relação a massa inicial (Fig. 3.5 B). Com relação ao comprimento (Fig. 3.5 D), houve pouca variação ao longo do tempo experimental, partindo estes peixes de um

1 tamanho inicial de $11,29 \pm 1,26$ cm e medindo $12,18 \pm 0,94$ cm após 120 de confinamento,
 2 o que corresponde a um aumento de 7,88% em relação ao comprimento inicial.

3



4

5 **Figura 3.5** – Peso somático (A-B) e comprimento total (C-D) de *P. lineatus* confinados *in situ*
 6 no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias. As barras
 7 representam a média e as linhas verticais o desvio padrão. A linha contínua representa a
 8 variação em % na medida biométrica ao longo do tempo de exposição em relação ao
 9 tamanho inicial (linha tracejada). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p <$
 10 $0,05$) entre os tempos experimentais, para cada local de exposição. As linhas tracejadas
 11 representam o valor basal médio para o parâmetro apresentado (t0)

12

13

14

15

16

17

18

19

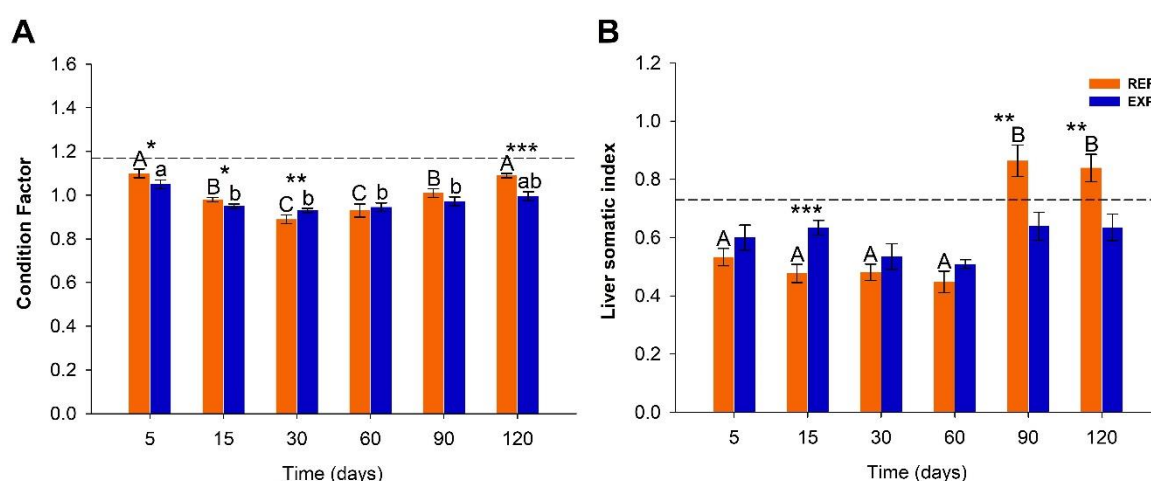
20

Com relação ao Fator de Condição de Fulton (FC) (Fig. 3.6 A), foi observada uma diminuição deste índice após 15, 30, 60 e 90 dias de exposição tanto em REF como em EXP, com relação a t5, mas em t120 houve um retorno próximo aos valores iniciais. Diferenças entre os dois locais de exposição para um mesmo tempo de exposição também foram encontradas, com uma diminuição do FC dos peixes mantidos em EXP após 5, 15 e 120 dias

1 quando comparado à REF. Entretanto, em t30 os peixes mantidos em EXP apresentaram
 2 um maior valor de FC em comparação à EXP.

3 Em relação ao Índice Hepatosomático (IHS), no local de REF foi observado um
 4 aumento no IHS em t90 e t120 em relação aos demais tempos de exposição, que resultou
 5 em valores significativamente maiores em relação a EXP, para os mesmos tempos
 6 experimentais (Fig. 3.6 B). Entretanto, após 15 dias de exposição, os peixes mantidos em
 7 EXP apresentaram um maior valor de IHS em relação aos peixes mantidos em REF.

8



9

10 **Figura 3.6** - Fator de Condição de Fulton (A) e Índice Hepatosomático (B) de *P. lineatus*
 11 confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias.
 12 As linhas tracejadas representam o valor basal médio (t0) para o parâmetro apresentado
 13 (FC = 1,14 ± 0,02; IHS = 0,73 ± 0,04). As barras representam a média e as linhas verticais o
 14 erro padrão (n = 15 – 20). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre
 15 os tempos experimentais, para cada local de exposição. Asteriscos indicam diferença
 16 significativa entre os grupos para cada tempo de exposição (p < 0,05*; < 0,01**; <
 17 0,001***).

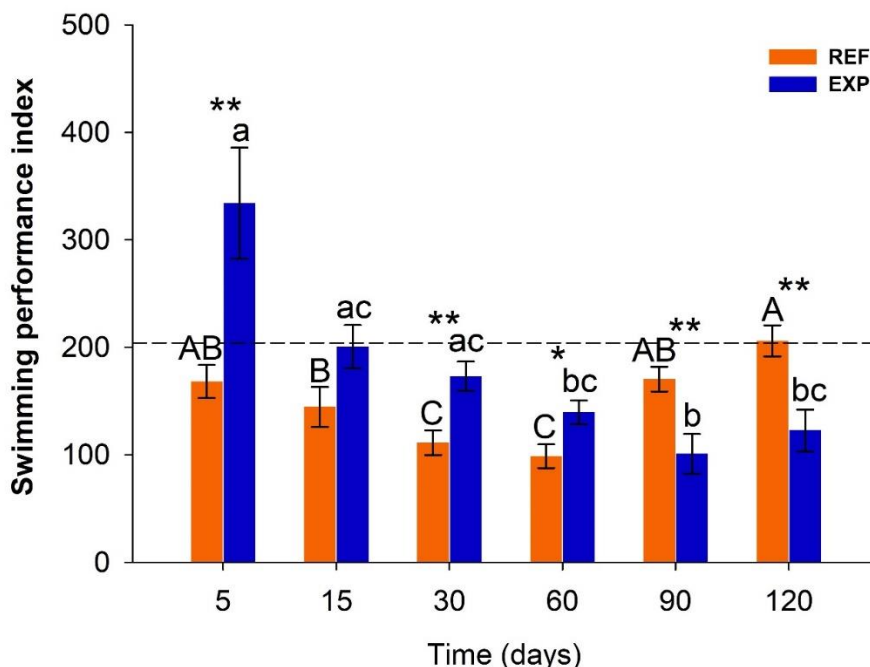
18

19 3.3.5 Resistência Natatória

20

21 Uma moderada diminuição na resistência natatória dos peixes mantidos em REF foi
 22 observada nos tempos intermediários (t30 e t60) em comparação com os outros tempos
 23 de exposição (Fig. 3.7). Em contrapartida, no local EXP, os animais apresentaram uma
 24 diminuição gradativa no IRN ao longo do tempo experimental; de maneira geral, nos
 25 tempos mais longos de exposição a resistência natatória foi menor que nos tempos iniciais.
 26 Nos tempos t5, t30 e t60, o IRN foi maior nos peixes do local EXP em comparação à REF, e

- 1 inversamente, nos tempos t90 e t120, o índice foi menor nos peixes mantidos em EXP em
2 relação à REF.



- 3
- 4 **Figura 3.7** - Índice de resistência natatória de *Prochilodus lineatus* confinados *in situ* no
5 local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias. As barras representam
6 a média e as linhas verticais o erro padrão (n = 15 – 20). A linha tracejada representa o valor
7 basal médio (t0) para o parâmetro apresentado (204,45 ± 22,69). Letras diferentes indicam
8 diferenças significativas (p < 0,05) entre os tempos experimentais, para cada local de
9 exposição. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo de
10 exposição (p < 0,05*; < 0,01**; < 0,001***).

11

12 3.3.6 Análise de componentes principais

13

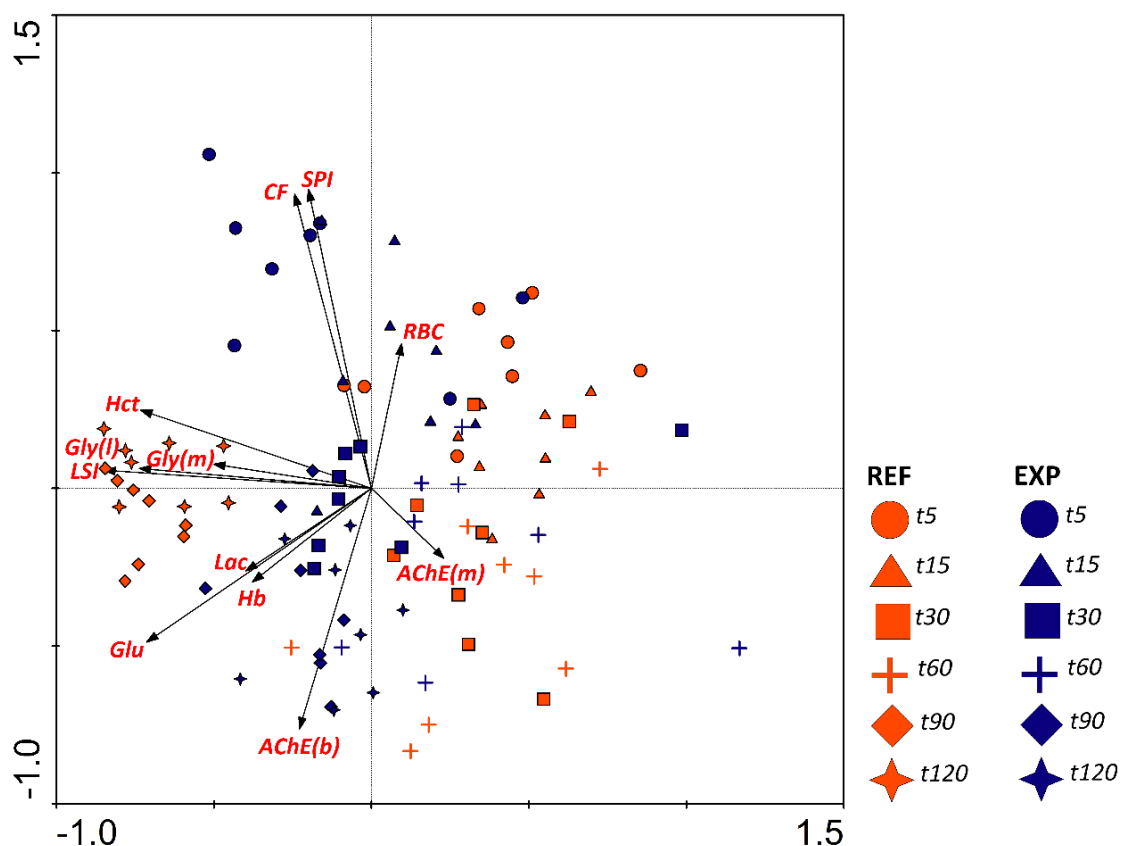
14

- 15 A análise de componentes principais foi utilizada para avaliar simultaneamente o
16 desempenho da natação e a resposta dos biomarcadores nos peixes expostos *in situ* nos
17 dois locais com níveis distintos de entrada de contaminantes e os resultados estão
18 apresentados em um biplot (Figura 3.8). Os dois primeiros eixos (PC1 e PC2) representaram
19 58,3% da variância total; por outro lado, os outros eixos foram negligenciados porque não
20 forneceram informações adicionais significativas. O primeiro eixo (horizontal) explicou
21 36,3% da variabilidade total, e separou as unidades amostrais do local de REF dos tempos
22 mais longos (t90 e t120) das demais amostras, sendo estas fortemente relacionados com a

1 concentração de glicogênio hepático e muscular, o índice hepatossomático e o
 2 hematócrito. O segundo eixo (vertical) explicou 22% da variabilidade total e foi responsável
 3 por uma separação temporal das unidades amostrais do local EXP, sendo que as variáveis
 4 mais relevantes para essa segregação foram o fator de condição e o índice de resistência
 5 natatória fortemente relacionados com os peixes do tempo mais agudo de exposição (t5)
 6 e negativamente relacionado com os indivíduos dos tempos mais longos (t90 e t120).

7 A análise de correlação de Pearson mostrou uma correlação positiva ($r^2 = 0,643$) e
 8 significativa entre o FC e a resistência natatória dos peixes (Fig. 3.9).

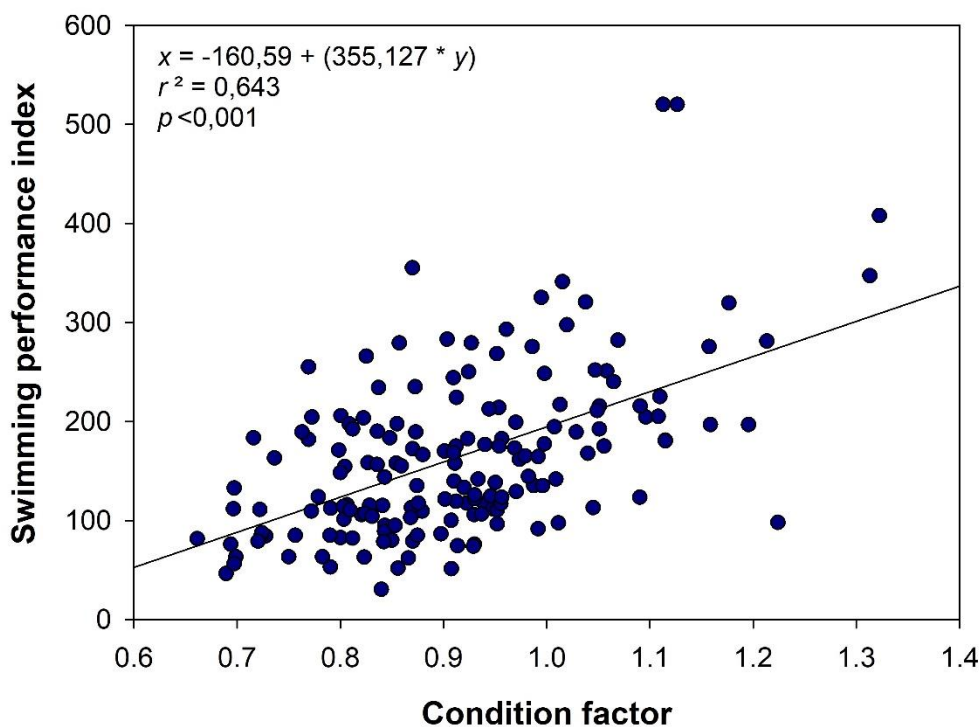
9



10

11 **Figura 3.8** – Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com os diferentes parâmetros
 12 biológicos mensurados em *Prochilodus lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e
 13 experimental (EXP) ao longo de 120 dias, incluindo: fator de condição de Fulton (CF), índice
 14 hepatossomático (LSI), glicose (Glu) e lactato plasmáticos (Lac), glicogênio hepático (Gly I) e
 15 muscular (Gly m), hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (RBC),
 16 acetilcolinestare cerebral (AChE b) e muscular (AChE m) e índice de resistência natatória (SPI).

17



1

2 **Figura 3.9** – Análise de correlação de Pearson entre o Fator de Condição (FC) e o índice de
 3 resistência natatória (IRN) em *P. lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e
 4 experimental (EXP) ao longo de 120 dias.

5

6

7

8 3.4 DISCUSSÃO

9

10 O presente estudo demonstrou que as exposições *in situ* em diferentes locais com
 11 níveis distintos de contaminação ambiental afetaram negativamente o crescimento e a
 12 resistência natatória de *P. lineatus* ao longo de 120 dias de confinamento. Diversas
 13 alterações metabólicas foram identificadas nos animais confinados em ambos os locais de
 14 exposição, entretanto, os animais provenientes do local de maior aporte de agrotóxicos
 15 (EXP) apresentaram alterações fisiológicas que podem estar diretamente relacionadas ao
 16 crescimento e a resistência natatória.

17 Com relação aos parâmetros hematológicos, os peixes engaiolados no local EXP,
 18 apresentaram um aumento na concentração de hemoglobina e no número de RBCs após
 19 15 e 30 dias de exposição, em relação aos animais mantidos no local REF. Estes resultados
 20 podem representar uma resposta aguda de estresse, caracterizada por uma fase inicial de

1 alarme que visa aumentar a eficiência no transporte de oxigênio, mediada pela ação de
2 catecolaminas, que por sua vez promovem a liberação de novas células sanguíneas para a
3 circulação devido à contração esplênica, aumentando assim os diversos parâmetros
4 hematológicos (Wendelaar Bonga, 1997).

5 Esta hipótese de uma resposta aguda de estresse nos animais do local EXP nos
6 menores tempos de exposição (t5, t15, t30) é sustentada pelos maiores níveis glicêmicos
7 em relação aos animais do local REF. A glicose é o substrato de energia primária para peixes
8 e é especialmente necessária para o cérebro e os músculos durante a situação de estresse
9 (Wendelaar Bonga, 2011). Situações estressoras para peixes, como o próprio confinamento
10 e a presença de agentes químicos na água, impõem ao animal a necessidade imediata de
11 mobilização de grandes quantidades de energia, no intuito de combater o agente estressor.
12 Esta mobilização é desencadeada pela liberação de adrenalina e cortisol na corrente
13 sanguínea, que em teleósteos são produzidos pelas células cromafins e interrenais,
14 respectivamente, localizadas no rim anterior (Wendelaar Bonga, 1997). No fígado, as
15 catecolaminas estimulam a gliconeogênese e a glicogenólise, enquanto que em adipócitos
16 estimulam a lipólise. Estas ações aumentam os níveis de glicose circulante e ácidos graxos
17 livres, respectivamente, para garantir suprimentos adequados de energia para tecidos
18 metabolicamente ativos (Wendelaar Bonga, 2011).

19 A mobilização de reservas energéticas permite aos peixes compensar o aumento da
20 demanda de energia associadas a uma situação de estresse (Wendelaar Bonga, 2011) e a
21 diminuição do glicogênio é a resposta mais comum devido à situação de estresse gerada
22 pela exposição a agrotóxicos (Begum e Vijayarghavan, 1999; Glusczak et al., 2006; Fonseca
23 et al., 2008). Portanto, seria esperado uma diminuição nos níveis de glicogênio no fígado
24 dos peixes engaiolados no local EXP, em comparação àqueles mantidos no local REF, haja
25 vista o aumento da glicemia nestes animais. No entanto, encontramos resultados
26 contraditórios, indicando um maior conteúdo de glicogênio hepático nos peixes após 5, 15,
27 30 e 60 dias de exposição no local EXP. Resultados similares aos nossos foram observados
28 por Crestani et al. (2006) que observaram níveis aumentados de glicogênio hepático em
29 *Rhamdia quelen* expostos ao herbicida clomazone por diferentes tempos. Moraes et al.
30 (2011) também observaram um aumento de glicogênio muscular em *Cyprinus carpio* após
31 7 e 30 dias de exposição aos herbicidas imazetahpyr e imazapic. Maiores níveis de
32 glicogênio hepático foram encontrados em *P. lineatus* após 15 dias de exposição *in situ* a

1 efluentes de esgoto (Pérez et al., 2018). Saravanan et al. (2011) também relataram esta
2 resposta em peixes expostos ao lindano (γ -HCH) e sugeriram que esse resultado pode
3 indicar uma resposta adaptativa de estresse ou o comprometimento de vias bioquímicas
4 envolvidas ao metabolismo dos carboidratos, promovido diretamente pelo xenobiótico. Os
5 maiores níveis de glicogênio hepático em *P. lineatus* confinado no local EXP de 5 a 60 dias
6 sugerem que esta espécie armazena o glicogênio aumentando a glicogênese no fígado,
7 suprida pelos altos níveis de glicose no sangue, sendo esta por sua vez produzida via
8 gliconeogênica, a partir de outros substratos celulares, como o lactato. Por outro lado, os
9 peixes do local EXP apresentaram uma diminuição do glicogênio hepático nos tempos mais
10 longos de exposição (t90 e t120) em comparação aos níveis encontrados nos tempos mais
11 curtos, indicando resposta adaptativas diferentes, possivelmente decorrente dos efeitos
12 do cortisol. Alguns estudos mostraram um aumento no cortisol plasmático em peixes
13 expostos aos herbicidas atrazina (Waring e Moore, 2004), glifosato (Soso et al., 2007) e
14 2,4D (McBride et al., 1981), e alguns fungicidas (Tierney et al., 2006; Hashim e Zaki, 2005),
15 indicando que os peixes estão sob estresse fisiológico. A manipulação ou confinamento,
16 exercício exaustivo e exposição tóxica, muitas vezes provocam aumentos prolongados nos
17 níveis plasmáticos de cortisol (Moon, 2011). O cortisol estimula a atividade da
18 fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), uma enzima limitante na taxa gliconeogênica, e
19 estabiliza o RNA_m da PEPCK, consequentemente reduzindo o conteúdo de glicogênio
20 hepático. O resultado final é um aumento na gliconeogênese e glicogenólise, aumentando
21 a glicemia no sangue (Moon, 2011), corroborando os resultados do presente trabalho,
22 onde *P. lineatus* confinados no local EXP apresentaram um maior índice glicêmico ao longo
23 de quase todo o período experimental em relação aos peixes mantidos no local REF. Por
24 outro lado, estes resultados podem estar relacionados ao efeito direto de alguns
25 contaminantes, como o endossulfan, uma vez que em vertebrados, o composto interfere
26 no pâncreas, apresentando toxicidade para as células beta das ilhotas de Langerhans, que
27 produz insulina necessária para reduzir os níveis glicêmicos, impedindo o fígado de
28 absorver a glicose e armazená-la na forma de glicogênio, promovendo uma resposta
29 hiperglicêmica (Kalender et al., 2004). No presente trabalho, maiores concentrações de
30 endossulfan foram detectadas no fígado destes peixes após os períodos mais prolongados
31 de exposição *in situ* (Capítulo II – Vieira, 2018).

1 Com relação as concentrações plasmática de lactato, de maneira geral observa-se
2 uma diminuição dos níveis do metabólito em todos os grupos analisados quando
3 comparados ao valor basal. Entretanto, essa diminuição foi acentuada nos animais
4 engaiolados no local EXP por tempos mais longos (t60, t90, t120). A metabolização do
5 lactato plasmático pode ocorrer no fígado (Milligan, 1996; Hemre et al., 2002; Takasusuki
6 et al., 2004; Enes et al., 2009) ou no rim (Hemre et al., 2002), onde dará origem novamente
7 à glicose pela via gliconeogênica (Hemre et al., 2002; Enes et al., 2009), graças ao aumento
8 da atividade reversível da lactato-desidrogenase (Vijayan et al., 1997). A glicose formada a
9 partir do lactato é encaminhada de volta ao sangue para suprir a demanda energética dos
10 demais tecidos. Estes resultados corroboram a hipótese que os possíveis níveis
11 aumentados de cortisol na circulação destes peixes estimularam a gliconeogênese a partir
12 de substratos como o lactato, promovendo uma resposta hiperglicêmica nestes animais,
13 nos diferentes tempos experimentais avaliados.

14 O IHS permite estimar o estado energético do fígado na medida em que está
15 correlacionado com lipídios e reservas de glicogênio (Chellappa et al., 1995; Zheng et al.,
16 2013). Os peixes podem estocar grande quantidade de gordura e glicogênio no fígado (Hoar
17 e Randall, 1971) e variações na quantidade destes metabólitos influenciam
18 significativamente no peso deste órgão, alterando assim a relação hepatossomática. No
19 presente trabalho, foi observado um boa correlação entre os valores de IHS e os níveis de
20 glicogênio quantificados no fígado, indicando que as alterações no conteúdo de glicogênio
21 afetaram o peso do órgão, e conseqüentemente o IHS.

22 A abordagem experimental empregada neste trabalho pode ter sido responsável
23 por diversas alterações fisiológicas desencadeadas nos peixes engaiolados pois pode ser
24 considerada um fator adicional de estresse, como resultado do confinamento, maior
25 densidade e competição interespecífica, devido à maior densidade de peixes nos períodos
26 iniciais de confinamento. Quando confrontamos as respostas dos diferentes parâmetros
27 avaliados com os valores basais estabelecidos para esta espécie (antes do confinamento),
28 os peixes engaiolados em ambos os locais experimentais apresentaram uma diminuição
29 progressiva no peso, que refletiu em um decréscimo no fator de condição (FC), e nas
30 concentrações plasmáticas de lactato, que como já discutido, pode indicar um aumento do
31 consumo deste metabólito no fígado para manutenção dos níveis glicêmicos basais do
32 animal. Entretanto, estas respostas generalizadas foram mais evidentes até o tempo

1 experimental de 60 dias. Após este período experimental, respostas divergentes foram
2 observadas entre os grupos REF e EXP, conduzindo a uma certa recuperação dos animais
3 mantidos em REF nos tempos mais longos de exposição, constatada pelo aumento das
4 reservas energéticas, maior taxa de crescimento, melhora na condição corporal e
5 resistência natatória, próximos aos valores basais. Já naqueles peixes mantidos no local
6 EXP, fatores de estresse adicionais presentes em todo o período de exposição, como a
7 presença de maiores concentrações de contaminantes no ambiente e no animal (Capítulo
8 II- Vieira, 2018) conduziram a uma piora progressiva no estado de saúde, possivelmente
9 em decorrência dos efeitos crônicos de concentrações de hormônios de estresse.

10 Neste contexto, a densidade de peixes dentro dos tanques parece ter sido um fator
11 limitante para todos os parâmetros avaliados, incluindo o crescimento e resistência
12 natatória. Estudos indicam que existe uma relação inversa entre densidade e crescimento
13 de peixes quando estocados em uma densidade muito alta e que o crescimento máximo
14 geralmente é obtido em uma densidade de estoque intermediária que também fornece
15 uma porcentagem de sobrevivência razoável (Chakraborty et al., 2010). A maior taxa de
16 crescimento dos peixes observada nos tempos mais prolongados de exposição pode ter
17 sido decorrente da menor densidade de animais dentro dos tanques devido a retirada
18 progressiva de animais ao longo do período experimental. Já é bem estabelecido que a
19 densidade de estocagem tem um efeito direto sobre o crescimento de peixes, e uma menor
20 densidade implica em menor competição por alimento e espaço (Braun et al., 2010;
21 Lorenzen e Enberg, 2011). Entretanto, os animais mantidos em EXP, na mesma densidade
22 que o local REF, apresentaram uma menor taxa de crescimento, cerca de 50% menor que
23 a taxa de crescimento observada nos animais engaiolados no local REF durante 120 dias.

24 Os fatores que interferem no crescimento dos peixes são diversos e relativamente
25 difíceis de serem diagnosticados, mas alguns destes podem estar relacionados com o
26 efeito direto de contaminantes ou mesmo seus efeitos indiretos, como o aumento dos
27 níveis de hormônios de estresse na circulação, principalmente o cortisol. Agrotóxicos como
28 a atrazina e o endossulfan foram detectados em maiores concentrações no local EXP
29 (Capítulo II, Vieira 2018). Em larvas de *Sciaenops ocellatus* expostas por 96h a 40 e 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$
30 de atrazina, observou-se uma diminuição significativa na taxa de crescimento, associada
31 a um aumento significativo do metabolismo basal (Alvarez et al., 2005). O aumento da
32 demanda de energia causa um aumento na degradação proteolítica para produzir energia,

1 resultando em uma diminuição da taxa de crescimento que provavelmente prolonga o
2 período larval e conseqüentemente reduz a população juvenil (Alvarez et al., 2005). A
3 diminuição da taxa de crescimento em peixes devido ao estresse promovido pelo
4 endossulfan também tem sido relatada na literatura (Sarkar e Kornar, 1997; Gray Jr. e Ostby,
5 1998; Balasubramani e Pandian, 2008; Sarma et al., 2009; Akhtar, 2012). O endossulfan foi
6 encontrado em amostras de sedimentos em ambos os locais de exposição, entretanto, em
7 EXP foram quantificadas maiores concentrações de α -endossulfan em comparação à REF, e
8 adicionalmente, foi o composto que mais se acumulou no fígado, em sua forma
9 metabolizada (endossulfan sulfato), nos animais confinados no local EXP. O cortisol
10 também pode estar relacionado com a diminuição do crescimento somático em peixes,
11 devido a inibição da produção de hormônios de crescimento produzidos pelas células da
12 pituitária e de fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGFs) produzidos pelo fígado
13 (Moon, 2011). Sob ação dos hormônios de estresse, a ingestão de alimentos e a eficiência
14 da conversão alimentar são reduzidas. Adicionalmente, o crescimento pode tornar-se
15 negativo pela atividade catabólica de níveis cronicamente elevados de cortisol, que
16 promovem a gliconeogênese a partir de proteínas musculares (Moon, 2011).

17 Embora o crescimento reduzido ou retardado seja um resultado comum da
18 exposição de peixes a agrotóxicos (Heath et al., 1997; Chaisuksant et al., 1998; Teather et
19 al., 2001), Woltering (1984) argumentou que este não é particularmente um parâmetro útil
20 em testes de toxicidade porque é menos sensível e mais inconsistente do que outros
21 parâmetros. No entanto, as menores taxas de crescimento observadas nos peixes expostos
22 à mistura complexa de poluentes no local EXP podem ter importantes implicações se
23 efeitos semelhantes manifestarem-se em populações nativas de peixes dulcícolas. Peixes
24 menores provavelmente estão susceptíveis a uma redução na capacidade competitiva
25 (Karplus et al., 2000), aumento das taxas de predação (Nilsson e Bronmark, 2000) e menor
26 sucesso reprodutivo (Kuwamura et al., 2000).

27 Outros fatores ambientais podem interferir no crescimento dos peixes em
28 condições naturais e um dos fatores de grande importância é a temperatura da água, visto
29 que estes animais são ectotermos. Ao longo do período experimental de 120 dias, a
30 temperatura da água em REF e EXP decaiu de forma gradual (Capítulo II, Vieira 2018),
31 mais de maneira similar em ambos os locais de exposição, como resultado de mudanças
32 sazonais ao longo do tempo experimental. Entretanto, a taxa de crescimento dos peixes

1 seguiu um padrão contrário à temperatura, com um crescimento significativo após 90 e
2 120 dias de confinamento, que corresponde aos períodos onde foram registradas as
3 menores temperaturas da água. Estes resultados vão em desencontro a diferentes
4 trabalhos que verificaram o aumento do crescimento em várias espécies de peixes em
5 temperaturas elevadas (Kellogg and Gift, 1983; Björnsson et al., 2001; Handeland et al.,
6 2008; Pang et al., 2016), provavelmente relacionado com o aumento da ingestão alimentar
7 e à eficiência da conversão alimentar e melhorias nas taxas de reações bioquímicas
8 (Franklin, 1998; Pelletier et al., 1993). Ao que parece, este fator não foi determinante para
9 o crescimento dos animais dentro dos tanques, reforçando a hipótese de que o efeito da
10 menor densidade parece ter tido grande influência na maior taxa de crescimento dos
11 animais nos tempos mais prolongados de exposição.

12 A condição corporal está intimamente relacionada com a saúde, qualidade ou
13 fitness de um animal (Peig e Green, 2009), e tem sido amplamente difundido como um
14 importante determinante da aptidão física. Os menores valores do fator de condição (FC)
15 encontrados no local EXP, em diferentes tempos de exposição também podem estar
16 associados à diminuição da condição nutricional e do bem-estar desses animais, indicando
17 que esses indivíduos são submetidos a um maior nível de estresse ambiental, levando a
18 aumentando das taxas catabólicas no organismo em detrimento de lipídios e proteínas
19 musculares, com conseqüente perda de peso.

20 Outro parâmetro sensível à estressores químicos, com destaque aos inseticidas
21 organofosforados e carbamatos, é a atividade da AChE, uma enzima chave no processo de
22 transmissão do impulso nervoso, sendo responsável pela hidrólise da acetilcolina em
23 acetato e colina na fenda sináptica. Diminuições transitórias na atividade da AChE muscular
24 nos peixes mantidos no local EXP foram observadas após 5, 30 e 90 dias exposição, em
25 relação ao local REF. A inibição da AChE leva ao acúmulo de acetilcolina nas fendas
26 sinápticas e causam distúrbios que levam a tremores, convulsões e até a morte (Fulton e
27 Key, 2001). Paralelamente ao efeito deletério do excesso de acetilcolina nas sinapses,
28 existe um alto custo energético que envolve diretamente as atividades fisiológicas. A
29 inibição da atividade cerebral AChE leva a uma acumulação de acetilcolina no cérebro,
30 interferindo no metabolismo energético do sistema nervoso e evitando a transmissão dos
31 impulsos nervosos, causando alterações comportamentais (Kumar et al., 2011; Mohapatra
32 et al., 2012; Clasen et al., 2014; Narra et al., 2015).

1 O comportamento dos peixes é um dos parâmetros de grande relevância ecológica,
2 e podem refletir as diversas alterações bioquímicas e fisiológicas em decorrência da
3 exposição à estressores ambientais. Os resultados do IRN, demonstraram que *P. lineatus*
4 enjaulados em EXP apresentaram um aumento proeminente na capacidade natatória após
5 5 dias de exposição, com relação àqueles mantidos no local REF. Este aumento é
6 consistente com o aumento da capacidade energética do animal, visto que os mesmos
7 animais apresentaram maiores níveis de glicose e glicogênio, substratos importantes para
8 produção de energia durante o exercício intenso. Contudo, uma resposta temporal foi
9 evidente, uma vez que os peixes expostos ao local EXP apresentaram um decréscimo
10 gradual do IRN ao longo do período de exposição, em contraste ao desempenho natatório
11 dos peixes confinados em REF, que mantiveram os valores de IRN mais próximos ao valor
12 basal. Distúrbios metabólicos, neurológicos, endócrinos e/ou sensoriais afetam o
13 comportamento dos peixes (Saglio e Trijasse 1998; Cook e Moore, 2008) e a diminuição da
14 atividade em peixes expostos à diversos agrotóxicos é relatada na literatura (Drummond
15 e Russom, 1990; Goulding et al., 2013; Little et al., 1990; Tierney et al., 2007). A capacidade
16 de natação é crucial para as espécies de peixes, determinando a sua sobrevivência no meio
17 aquático (Wolter e Arlinghaus, 2003), tendo em vista que as interações predador-presa, o
18 comportamento reprodutivo, as migrações para desova e a dispersão são de profunda
19 importância ecológica e dependem substancialmente da capacidade de locomoção dos
20 indivíduos (Kolok, 1999; Reidy et al., 2000). *P. lineatus* é um peixe migratório, que
21 frequentemente percorre distâncias entre 450 e 600 Km por ano, durante o período
22 reprodutivo (Bayley, 1973; Agostinho et al., 1993; Espinach e Delfino, 1993) e que
23 frequentemente habita áreas com um considerável hidrodinamismo. Portanto, o
24 desempenho da natação é fundamental para sua sobrevivência, incluindo sua capacidade
25 de nadar contra-corrente. Através da PCA e da análise de regressão linear, é possível
26 observar uma relação significativa entre o fator de condição (FC) e o IRN dos peixes. Os
27 animais confinados em EXP apresentaram uma menor taxa crescimento. Além disso, no
28 tempo inicial de exposição, o FC de condição destes animais foi maior que o local REF, e
29 diminuindo progressivamente, de maneira geral, ao longo do tempo de confinamento, o
30 que pode ter ocasionado diminuição da resistência natatória. O segundo eixo da PCA
31 (vertical) mostrou uma relação positiva entre o IRN e o FC nos tempos mais agudos (t5 e

1 t15) e uma relação negativa com os indivíduos dos tempos mais prolongados (t90 e t120)
2 de confinamento no local EXP.

3 Tanto o crescimento como desempenho natatório muitas vezes exibem variações
4 amplas e inconsistentes entre indivíduos da mesma espécie, e essas variações
5 possivelmente estão relacionadas ao seu metabolismo energético (Auer et al., 2015; Killen
6 et al., 2013; Kolok e Farrell, 1994). Embora algumas espécies de peixes possam não ser
7 altamente ativas em perseguir suas presas, sua capacidade de competir por alimentos
8 ainda pode estar relacionada ao desempenho da natação. Portanto, a capacidade de
9 natação é um fator crucial para o forrageamento bem-sucedido, que é um pré-requisito
10 para o crescimento, enquanto a alimentação e o crescimento fornecem a energia para a
11 natação. Portanto, os efeitos do crescimento e a natação estão intrinsicamente ligados em
12 peixes (Fry e Cox, 1970; Hammer, 1995).

13 O crescimento, a reprodução e as várias atividades de manutenção do corpo
14 (ventilação, osmorregulação, batimentos cardíacos, etc.) requerem grandes quantidades
15 de energia, provida pelos nutrientes e pelas reações catabólicas associadas (Kooijman,
16 2010). A alocação de energia para essas diferentes atividades varia ao longo da vida dos
17 organismos, de um tecido para outro, mas também de acordo com a condição do ambiente
18 em que o animal vive (Kooijman, 2010). A distribuição e a modificação das vias energéticas
19 possibilitam modular e direcionar a energia de acordo com as necessidades específicas dos
20 tecidos, mediante *tradeoffs* entre manutenção, desenvolvimento, crescimento e
21 reprodução (Kooijman, 2010). Quando os organismos estão sob estresse, a energia
22 normalmente alocada para crescimento e reprodução é investida em tolerância e
23 resistência (manutenção) (Smolders et al., 2005; McGeer et al., 2000; Rajotte e Couture,
24 2002). A longo prazo, a maior demanda de energia para manutenção da homeostase pode
25 levar a diminuição das reservas energéticas, crescimento e reprodução (Smolders et al.,
26 2005). Nesta tese, também demonstramos (Cap. II) que estes peixes apresentaram danos
27 oxidativos, genéticos e histológicos no fígado decorrentes da exposição curta e prolongada
28 à mistura de contaminantes ambientais. No contexto geral, nossos resultados indicam que
29 *P. lineatus* expostos à estressores ambientais diversos, podem ter direcionado mais energia
30 para manutenção das atividades metabólicas basais e mecanismos de defesa e reparo
31 celular, garantindo a sua sobrevivência, ao passo que menos energia tornou-se disponível

1 para o seu crescimento, mesmo com o surgimento de condições mais propícias para tal
2 (mais espaço e alimento).

3

4 3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5

6 Em conclusão, mostramos pela primeira vez que contaminações complexas e
7 realistas de agrotóxicos em baixas concentrações, podem desencadear respostas
8 adaptativas nos peixes visando a manutenção da homeostase. Porém, estes ajustes
9 fisiológicos podem não ser viáveis a longo prazo, haja vista a persistência destes múltiplos
10 estressores no ambiente e a tendência de aumento das concentrações destes xenobióticos,
11 o que pode trazer efeitos deletérios para as populações e todo o ecossistema.

12

13

14 3.5 REFERÊNCIAS

15

- 16 Agostinho, A. A., De Vazzoler, A. E. A., Gomes, L. C., & Okada, E. K. (1993). Estratificación espacial y
17 comportamiento de *Prochilodus scrofa* en distintas fases del ciclo de vida, en la planicie de
18 inundación del alto río Paraná y embalse de Itaipu, Paraná, Brasil.
- 19 Akhtar, M. S., Pal, A. K., Sahu, N. P., Ciji, A., & Gupta, S. K. (2012). Effects of dietary pyridoxine on
20 growth and biochemical responses of *Labeo rohita* fingerlings exposed to endosulfan.
21 *Pesticide biochemistry and physiology*, 103(1), 23-30.
- 22 Albuquerque, A. F., Ribeiro, J. S., Kummrow, F., Nogueira, A. J. A., Montagner, C. C., & Umbuzeiro,
23 G. A. (2016). Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environmental Science:
24 Processes & Impacts*, 18(7), 779-787.
- 25 Arnott, S. A., Chiba, S., & Conover, D. O. (2006). Evolution of intrinsic growth rate: metabolic costs
26 drive trade-offs between growth and swimming performance in *Menidia menidia*.
27 *Evolution*, 60(6), 1269-1278.
- 28 Atchison, G. J., Henry, M. G., & Sandheinrich, M. B. (1987). Effects of metals on fish behavior: a
29 review. *Environmental Biology of fishes*, 18(1), 11-25.
- 30 Auer, S. K., Salin, K., Rudolf, A. M., Anderson, G. J., & Metcalfe, N. B. (2015). The optimal
31 combination of standard metabolic rate and aerobic scope for somatic growth depends on
32 food availability. *Functional Ecology*, 29(4), 479-486.
- 33 Balasubramani, A., & Pandian, T. J. (2008). Endosulfan suppresses growth and reproduction in
34 zebrafish. *Current Science*, 94(7), 883-890.
- 35 Barton, B. A. (2002). Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes
36 in circulating corticosteroids 1. *Integrative and comparative biology*, 42(3), 517-525.
- 37 Bayley, P. B. (1973). Studies on the migratory characin, *Prochilodus platensis* Holmberg 1889,
38 (Pisces, Characoidei) in the river Pilcomayo, South America. *Journal of Fish Biology*, 5(1), 25-
39 40.

- 1 Begum, G., & Vijayaraghavan, S. (1999). Effect of Acute Exposure of the Organophosphate
2 Insecticide Rogor on Some Biochemical Aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus).
3 *Environmental research*, 80(1), 80-83.
- 4 Björnsson, B., Steinarsson, A., & Oddgeirsson, M. (2001). Optimal temperature for growth and feed
5 conversion of immature cod (*Gadus morhua* L.). *ICES Journal of Marine Science*, 58(1), 29-38.
- 6 Braun, N., de Lima, R. L., Baldisserotto, B., Dafre, A. L., & de Oliveira Nuñez, A. P. (2010). Growth,
7 biochemical and physiological responses of *Salminus brasiliensis* with different stocking
8 densities and handling. *Aquaculture*, 301(1-4), 22-30.
- 9 Calow, P. (1991). Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications.
10 *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100(1-2), 3-6.
- 11 Carriquiriborde, P., Mirabella, P., Waichman, A., Solomon, K., Van den Brink, P. J., & Maund, S.
12 (2014). Aquatic risk assessment of pesticides in Latin America. *Integrated environmental
13 assessment and management*, 10(4), 539-542.
- 14 Castelli, M. G., Rusten, M., Goksøyr, A., & Routti, H. (2014). mRNA expression of genes regulating
15 lipid metabolism in ringed seals (*Pusa hispida*) from differently polluted areas. *Aquatic
16 toxicology*, 146, 239-246.
- 17 Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M. J., Scarabotti, P. A., & Wunderlin, D. A. (2009). Multiple
18 biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality
19 of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution*, 157(11), 3025-3033.
- 20 Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., & Parma, M. J. (2014). Deleterious
21 effects of wastewater on the health status of fish: a field caging study. *Ecological indicators*,
22 38, 104-112.
- 23 Chaisuksant, Y., Yu, Q., & Connell, D. W. (1998). Effects of halobenzenes on growth rate of fish
24 (*Gambusia affinis*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 39(2), 120-130.
- 25 Chakraborty, S. B., Mazumdar, D., & Banerjee, S. (2010, June). Determination of ideal stocking
26 density for cage culture of monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in India. In
27 *Proceedings of the Zoological Society* (Vol. 63, No. 1, pp. 53-59). Springer-Verlag.
- 28 Chellappa, S., Huntingford, F. A., Strang, R. H. C., & Thomson, R. Y. (1995). Condition factor and
29 hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *Journal
30 of Fish Biology*, 47(5), 775-787.
- 31 Clasen, B., Leitemperger, J., Murussi, C., Pretto, A., Menezes, C., Dalabona, F., ... & Loro, V. L. (2014).
32 Carbofuran promotes biochemical changes in carp exposed to rice field and laboratory
33 conditions. *Ecotoxicology and environmental safety*, 101, 77-82.
- 34 Cook, M. E., & Moore, P. A. (2008). The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior
35 in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Archives of environmental contamination and toxicology*,
36 55(1), 94-102.
- 37 Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Lazzari, R., Duarte, M. F., ... & Vieira,
38 V. P. (2006). Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of
39 protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and
40 environmental safety*, 65(1), 48-55.
- 41 del Carmen Alvarez, M., & Fuiman, L. A. (2005). Environmental levels of atrazine and its degradation
42 products impair survival skills and growth of red drum larvae. *Aquatic Toxicology*, 74(3), 229-
43 241.

- 1 Døving, K. B. (1991). Assessment of animal behaviour as a method to indicate environmental
2 toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*,
3 *100*(1-2), 247-252.
- 4 Drummond, R. A., & Russom, C. L. (1990). Behavioral toxicity syndromes: A promising tool for
5 assessing toxicity mechanisms in juvenile fathead minnows. *Environmental toxicology and*
6 *chemistry*, *9*(1), 37-46.
- 7 Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., & Oliva-Teles, A. (2009). Nutritional regulation of hepatic glucose
8 metabolism in fish. *Fish physiology and biochemistry*, *35*(3), 519-539.
- 9 Espinach, R., & Delfino, A. (1993). Situación de las pesquerías de la Cuenca del Plata en Paraguay,
10 Bolivia, Argentina y Uruguay. *FAO Inf. de Pesca*, (490), 36-51.
- 11 Figueiredo, L., Chiavelli, L., & Costa, W. D. (2013). Determination of Concentration Levels of
12 Organochlorine Pesticides in Water from the Mandacaru Stream in Maringá-Paraná-Brazil
13 Employing Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Letters*, *46*(10), 1597-1606.
- 14 Fonseca, M. B., Gluszczak, L., Moraes, B. S., de Menezes, C. C., Preto, A., Tierno, M. A., ... & Loro, V.
15 L. (2008). The 2, 4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic
16 parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental*
17 *Safety*, *69*(3), 416-420.
- 18 Franklin, C. E. (1998). Studies of evolutionary temperature adaptation: muscle function and
19 locomotor performance in Antarctic fish. *Clinical and experimental pharmacology and*
20 *physiology*, *25*(9), 753-756.
- 21 Fry, F. E. J., & Cox, E. T. (1970). A relation of size to swimming speed in rainbow trout. *Journal of the*
22 *Fisheries Board of Canada*, *27*(5), 976-978.
- 23 Fu, S. J., Brauner, C. J., Cao, Z. D., Richards, J. G., Peng, J. L., Dhillon, R., & Wang, Y. X. (2011). The
24 effect of acclimation to hypoxia and sustained exercise on subsequent hypoxia tolerance
25 and swimming performance in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Experimental Biology*,
26 *214*(12), 2080-2088.
- 27 Fulton, M. H., & Key, P. B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates
28 as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental*
29 *Toxicology and Chemistry*, *20*(1), 37-45.
- 30 Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., da Fonseca, M. B., de Araújo Pedron, F., Duarte, M.
31 F., & Vieira, V. L. P. (2006). Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and
32 metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and*
33 *Environmental Safety*, *65*(2), 237-241.
- 34 Goulding, A. T., Shelley, L. K., Ross, P. S., & Kennedy, C. J. (2013). Reduction in swimming
35 performance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following sublethal exposure
36 to pyrethroid insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology &*
37 *Pharmacology*, *157*(3), 280-286.
- 38 Gray JR, L. E., & Ostby, J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and
39 morphological reproductive development: endocrine versus nonendocrine mechanisms.
40 *Toxicology and industrial health*, *14*(1-2), 159-184.
- 41 Hammer, C. (1995). Fatigue and exercise tests with fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*
42 *Part A: Physiology*, *112*(1), 1-20.
- 43 Handeland, S. O., Imsland, A. K., & Stefansson, S. O. (2008). The effect of temperature and fish size
44 on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of *Atlantic*
45 *salmon* post-smolts. *Aquaculture*, *283*(1-4), 36-42.

- 1 Handy, R. D., Sims, D. W., Giles, A., Campbell, H. A., & Musonda, M. M. (1999). Metabolic trade-off
2 between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth
3 parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to
4 copper. *Aquatic Toxicology*, 47(1), 23-41.
- 5 Hashim, E. F., & Zaki, M. S. (2005). Assessment of the hazardous effect of fungicide Dithane on
6 *Clarias lazera* (catfish) including haematological, biochemical, and immunological
7 parameters. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 13(3), 1005-1018.
- 8 Heath, A. G., Cech Jr, J. J., Brink, L., Moberg, P., & Zinkl, J. G. (1997). Physiological responses of
9 fathead minnow larvae to rice pesticides. *Ecotoxicology and environmental safety*, 37(3),
10 280-288.
- 11 Hemre, G. I., Mommsen, T. P., & Krogdahl, Å. (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on
12 growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*, 8(3), 175-194.
- 13 Hoar, W. S., & Randall, D. J. (1971). Fish physiology. vol. vi.
- 14 Jones, J. C., & Reynolds, J. D. (1997). Effects of pollution on reproductive behaviour of fishes.
15 *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7(4), 463-491.
- 16 Kalender, Y., Kalender, S., Uzunhisarcikli, M., Ogutcu, A., Açikgoz, F., & Durak, D. (2004). Effects of
17 endosulfan on B cells of Langerhans islets in rat pancreas. *Toxicology*, 200(2-3), 205-211.
- 18 Karplus, I., Popper, D., & Goldan, O. (2000). The effect of food competition and relative size of group
19 members on growth of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Fish Physiology and*
20 *Biochemistry*, 22(2), 119-123.
- 21 Kellogg, R. L., & Gift, J. J. (1983). Relationship between optimum temperatures for growth and
22 preferred temperatures for the young of four fish species. *Transactions of the American*
23 *Fisheries Society*, 112(3), 424-430.
- 24 Kieffer, J. D. (2010). Perspective—Exercise in fish: 50+ years and going strong. *Comparative*
25 *Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 156(2), 163-168.
- 26 Killen, S. S., Marras, S., Metcalfe, N. B., McKenzie, D. J., & Domenici, P. (2013). Environmental
27 stressors alter relationships between physiology and behaviour. *Trends in Ecology &*
28 *Evolution*, 28(11), 651-658.
- 29 Kolok, A. S. (1999). Interindividual variation in the prolonged locomotor performance of
30 ectothermic vertebrates: a comparison of fish and herpetofaunal methodologies and a brief
31 review of the recent fish literature. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(4),
32 700-710.
- 33 Kolok, A. S., & Farrell, A. P. (1994). Individual variation in the swimming performance and cardiac
34 performance of northern squawfish, *Ptychocheilus oregonensis*. *Physiological Zoology*, 67(3),
35 706-722.
- 36 Kooijman, S. A. L. M. (2010). *Dynamic energy budget theory for metabolic organisation*. Cambridge
37 university press.
- 38 Kumar, N., Prabhu, P. A. J., Pal, A. K., Remya, S., Aklakur, M., Rana, R. S., ... & Jadhao, S. B. (2011).
39 Anti-oxidative and immuno-hematological status of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*)
40 during acute toxicity test of endosulfan. *Pesticide biochemistry and physiology*, 99(1), 45-52.
- 41 Kuwamura, T., Karino, K., & Nakashima, Y. (2000). Male morphological characteristics and mating
42 success in a protogynous coral reef fish, *Halichoeres melanurus*. *Journal of Ethology*, 18(1),
43 17-23.

- 1 Little, E. E., Archeski, R. D., Flerov, B. A., & Kozlovskaya, V. I. (1990). Behavioral indicators of
2 sublethal toxicity in rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*,
3 *19*(3), 380-385.
- 4 Little, E. E., Fairchild, J. F., & DeLonay, A. J. (1993). Behavioral methods for assessing impacts of
5 contaminants on early life stage fishes. *American Fisheries Society Symposium Series*. *14*,
6 67-77.
- 7 Lorenzen, K., & Enberg, K. (2002). Density-dependent growth as a key mechanism in the regulation
8 of fish populations: evidence from among-population comparisons. *Proceedings of the Royal
9 Society of London B: Biological Sciences*, *269*(1486), 49-54.
- 10 Lunardelli, B., Cabral, M. T., Vieira, C. E. D., Oliveira, L. F., Risso, W. E., Meletti, P. C. & Martinez, C.
11 B. R. (2018). Chromium accumulation and biomarker responses in the Neotropical fish
12 *Prochilodus lineatus* caged in a river under the influence of tannery activities. *Ecotoxicology
13 and Environmental Safety*, *153*, 188-194
- 14 Luo, Y., & Xie, X. (2008). Effects of temperature on the specific dynamic action of the southern
15 catfish, *Silurus meridionalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular &
16 Integrative Physiology*, *149*(2), 150-156.
- 17 Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M. T., & Laroche, J. (2004). Physiological cost of
18 tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic
19 Coast. *Aquatic Toxicology*, *70*(4), 327-343.
- 20 McBride, J. R., Dye, H. M., & Donaldson, E. M. (1981). Stress response of juvenile sockeye salmon
21 (*Oncorhynchus nerka*) to the butoxyethanol ester of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Bulletin
22 of environmental contamination and toxicology*, *27*(1), 877-884.
- 23 McGeer, J. C., Szebedinszky, C., McDonald, D. G., & Wood, C. M. (2000). Effects of chronic sublethal
24 exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and
25 metabolic costs. *Aquatic Toxicology*, *50*(3), 231-243.
- 26 Milligan, C. L. (1996). Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. *Comparative
27 Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *113*(1), 51-60.
- 28 Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A. K., Kumar, K., Prasad, K. P., & Mohanta, K. N. (2012).
29 Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multispecies probiotic
30 mixture in a tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). *Pesticide biochemistry and
31 physiology*, *104*(1), 28-37.
- 32 Moon, T. W. (2011). Stress effect on growth and metabolism. *Encyclopedia of fish: fish physiology
33 from genome to environment*, *2*, 1534-1540.
- 34 Moon, T. W., & Foster, G. D. (1995). Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and
35 hormonal and environmental influences. In *Biochemistry and molecular biology of fishes* (Vol.
36 *4*, pp. 65-100). Elsevier.
- 37 Moraes, B. S., Clasen, B., Loro, V. L., Pretto, A., Toni, C., de Avila, L. A., ... & Reimche, G. B. (2011).
38 Toxicological responses of *Cyprinus carpio* after exposure to a commercial herbicide
39 containing imazethapyr and imazapic. *Ecotoxicology and environmental safety*, *74*(3), 328-
40 335.
- 41 Narra, M. R., Rajender, K., Reddy, R. R., Rao, J. V., & Begum, G. (2015). The role of vitamin C as
42 antioxidant in protection of biochemical and haematological stress induced by chlorpyrifos
43 in freshwater fish *Clarias batrachus*. *Chemosphere*, *132*, 172-178.
- 44 Nilsson, P. A., & Brönmark, C. (2000). Prey vulnerability to a gape-size limited predator: behavioural
45 and morphological impacts on northern pike piscivory. *Oikos*, *88*(3), 539-546.

- 1 OCDE – FAO (2015). Capítulo 2. Agricultura brasileira: Perspectivas e Desafios. In: Perspectivas
2 agrícolas 2015 – 2024. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en.
3 Acesso em: 02 de jan. 2018.
- 4 Pang, X., Cao, Z. D., Peng, J. L., & Fu, S. J. (2010). The effects of feeding on the swimming
5 performance and metabolic response of juvenile southern catfish, *Silurus meridionalis*,
6 acclimated at different temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A:
7 Molecular & Integrative Physiology*, 155(2), 253-258.
- 8 Pang, X., Fu, S. J., & Zhang, Y. G. (2016). Acclimation temperature alters the relationship between
9 growth and swimming performance among juvenile common carp (*Cyprinus carpio*).
10 *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 199,
11 111-119.
- 12 Paulino, M. G., Benze, T. P., Sadauskas-Henrique, H., Sakuragui, M. M., Fernandes, J. B., &
13 Fernandes, M. N. (2014). The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a
14 tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. *Science
15 of the Total Environment*, 497, 293-306.
- 16 Peig, J., & Green, A. J. (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length
17 data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos*, 118(12), 1883-1891.
- 18 Peig, J., & Green, A. J. (2010). The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current
19 methods based on mass and length. *Functional Ecology*, 24(6), 1323-1332.
- 20 Pelletier, D., Guderley, H., & Dutil, J. D. (1993). Effects of growth rate, temperature, season, and
21 body size on glycolytic enzyme activities in the white muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*).
22 *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 265(5), 477-487.
- 23 Pérez, M. R., Rossi, A. S., Bacchetta, C., Elorriaga, Y., Carriquiriborde, P., & Cazenave, J. (2018). In
24 situ evaluation of the toxicological impact of a wastewater effluent on the fish *Prochilodus
25 lineatus*: biochemical and histological assessment. *Ecological Indicators*, 84, 345-353.
- 26 Polard, T., Jean, S., Gauthier, L., Laplanche, C., Merlina, G., Sanchez-Pérez, J. M., & Pinelli, E.
27 (2011). Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west
28 France. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 126-134.
- 29 Rajotte, J. W., & Couture, P. (2002). Effects of environmental metal contamination on the condition,
30 swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca
31 flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(8), 1296-1304.
- 32 Reidy, S. P., Kerr, S. R., & Nelson, J. A. (2000). Aerobic and anaerobic swimming performance of
33 individual Atlantic cod. *Journal of Experimental Biology*, 203(2), 347-357.
- 34 Saglio, P., & Trijasse, S. (1998). Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Archives of
35 Environmental Contamination and Toxicology*, 35(3), 484-491.
- 36 Saravanan, M., Kumar, K. P., & Ramesh, M. (2011). Haematological and biochemical responses of
37 freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and
38 chronic sublethal exposure to lindane. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3), 206-
39 211.
- 40 Sarkar, U. K., & Konar, S. K. (1997). Interactions of insecticide thiodan (Endosulfan) and heavy metal
41 chromium and impact on fish and aquatic ecosystem. *Chemistry and Ecology*, 13(4), 271-278.
- 42 Sarma, K., Pal, A. K., Sahu, N. P., Ayyappan, S., & Baruah, K. (2009). Dietary high protein and vitamin
43 C mitigates endosulfan toxicity in the spotted murrel, *Channa punctatus* (Bloch, 1793).
44 *Science of the Total Environment*, 407(12), 3668-3673.

- 1 Scott, G. R., & Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish
2 behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic*
3 *toxicology*, 68(4), 369-392.
- 4 Selye, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *British medical journal*, 1(4667),
5 1383.
- 6 Smolders, R., De Boeck, G., & Blust, R. (2003). Changes in cellular energy budget as a measure of
7 whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and chemistry*,
8 22(4), 890-899.
- 9 Smolders, R., De Coen, W., & Blast, R. (2005). Integrative measures of toxicant exposure in zebra
10 fish (*Danio rerio*) at different levels of biological organization. *Techniques in Aquatic*
11 *Toxicology*, 2, 3.
- 12 Sokolova, I. M. (2013). Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate
13 the effects of multiple stressors. *Integrative and comparative biology*, 53(4), 597-608.
- 14 Solomon, K. R., Carr, J. A., Du Preez, L. H., Giesy, J. P., Kendall, R. J., Smith, E. E., & Van Der Kraak, G.
15 J. (2008). Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Critical*
16 *reviews in toxicology*, 38(9), 721-772.
- 17 Solomon, K. R., Dalhoff, K., Volz, D., & Van Der Kraak, G. (2013). Effects of herbicides on fish. In *Fish*
18 *physiology* (Vol. 33, pp. 369-409). Academic Press.
- 19 Soso, A. B., Barcellos, L. J. G., Ranzani-Paiva, M. J., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Anziliero, D., ... &
20 Finco, J. A. (2007). Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based
21 herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia*
22 *quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(3), 308-313.
- 23 Takasusuki, J., Araujo, M. R. R., & Fernandes, M. N. (2004). Effect of water pH on copper toxicity in
24 the neotropical fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodondidae). *Bulletin of environmental*
25 *contamination and toxicology*, 72(5), 1075-1082.
- 26 Taylor, B. W., Flecker, A. S., & Hall, R. O. (2006). Loss of a harvested fish species disrupts carbon
27 flow in a diverse tropical river. *Science*, 313(5788), 833-836.
- 28 Teather, K., Harris, M., Boswell, J., & Gray, M. (2001). Effects of Acrobat MZ® and Tattoo C® on
29 Japanese medaka (*Oryzias latipes*) development and adult male behavior. *Aquatic*
30 *Toxicology*, 51(4), 419-430.
- 31 Tierney, K. B., Singh, C. R., Ross, P. S., & Kennedy, C. J. (2007). Relating olfactory neurotoxicity to
32 altered olfactory-mediated behaviors in rainbow trout exposed to three currently-used
33 pesticides. *Aquatic Toxicology*, 81(1), 55-64.
- 34 Tierney, K. B., Taylor, A. L., Ross, P. S., & Kennedy, C. J. (2006). The alarm reaction of coho salmon
35 parr is impaired by the carbamate fungicide IPBC. *Aquatic toxicology*, 79(2), 149-157.
- 36 Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Cabrera, L. C., Primel, E. G., Fillmann, G., Bianchini, A., & dos Reis
37 Martinez, C. B. (2017). A comparative approach using biomarkers in feral and caged
38 Neotropical fish: implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas.
39 *Science of the Total Environment*, 586, 598-609.
- 40 Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., da Costa Cabrera, L., Risso, W. E., ... &
41 dos Reis Martinez, C. B. (2016). Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus*
42 subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil.
43 *Science of the Total Environment*, 542, 44-56.
- 44 Vijayan, M. M., Pereira, C., Grau, E. G., & Iwama, G. K. (1997). Metabolic responses associated with
45 confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology*
46 *Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 116(1), 89-95.

- 1 Waring, C. P., & Moore, A. (2004). The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in
2 fresh water and after sea water transfer. *Aquatic Toxicology*, 66(1), 93-104.
- 3 Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.
- 4 Wendelaar Bonga, S. E. (2011). Hormonal responses to stress. *Encyclopedia of fish: fish physiology*
5 *from genome to environment*, 2, 1515-1523.
- 6 Wolter, C., & Arlinghaus, R. (2003). Navigation impacts on freshwater fish assemblages: the
7 ecological relevance of swimming performance. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13(1),
8 63-89.
- 9 Woltering, D. M. (1984). The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests: a
10 critical review. *Aquatic Toxicology*, 5(1), 1-21.
- 11 Yan, G. J., He, X. K., Cao, Z. D., & Fu, S. J. (2013). An interspecific comparison between morphology
12 and swimming performance in cyprinids. *Journal of evolutionary biology*, 26(8), 1802-1815.
- 13 Zheng, J. L., Luo, Z., Liu, C. X., Chen, Q. L., Tan, X. Y., Zhu, Q. L., & Gong, Y. (2013). Differential effects
14 of acute and chronic zinc (Zn) exposure on hepatic lipid deposition and metabolism in yellow
15 catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquatic toxicology*, 132, 173-181
- 16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

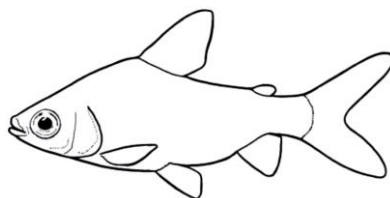
Capítulo IV

16

Manuscrito III

17

18



Efeitos na osmorregulação e morfologia branquial e renal de *Prochilodus lineatus* expostos *in situ* em áreas agrícolas no Sul do Brasil

Carlos Eduardo Delfino Vieira^a, Maria Eduarda Tesser^a, Wagner Ezequiel Risso^a, Cláudia Bueno dos Reis Martinez^a

^aDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, Londrina, Paraná, Brazil

4.1 INTRODUÇÃO

O crescimento da produção agrícola brasileira foi alavancado pela expansão das áreas de cultivo, que aumentaram em 34 milhões de hectares entre 1990 e 2012 (OCDE – FAO, 2015). Em escala global, esta foi uma das maiores expansões durante esse período (OCDE – FAO, 2015). As demandas crescentes das atividades agroindustriais levaram ao uso excessivo de fertilizantes e agrotóxicos e hoje o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, consumindo cerca de 20% do total de agrotóxicos consumidos no mundo (Albuquerque et al., 2016). Esses agrotóxicos podem entrar nos ecossistemas aquáticos, comprometendo assim a qualidade da água para a biota (Vieira et al., 2016; 2017).

Além da contaminação química por agrotóxicos, a presença de metais traço em ecossistemas aquáticos em áreas agrícolas é uma problemática relevante, uma vez que as atividades agrícolas podem aumentar as concentrações destes elementos nos corpos hídricos (Jiao et al., 2012). A aplicação de metais essenciais para estimular o crescimento das plantas, como cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn) e boro (B), é uma prática comum que visa remediar as deficiências do solo. Adicionalmente, os fertilizantes podem conter cádmio (Cd), cobalto (Co), Cu, Zn, chumbo (Pb) e níquel (Ni) como impurezas, e alguns herbicidas apresentam altos níveis de Fe, Mn, Pb e Ni (Gimeno-García et al., 1996). Assim, a aplicação histórica destes produtos em uma determinada área pode aumentar as concentrações destes elementos na água e sedimento de corpos hídricos próximos (Jiao et al., 2012).

Os peixes que habitam ambientes sob influência destas atividades agrícolas estão continuamente expostos a agrotóxicos e metais o que pode induzir mudanças bioquímicas e celulares, tornando esses animais modelos úteis para determinar a presença e ação de contaminantes ambientais (Fernandes et al., 2013; Souza-Bastos et al., 2017; Vieira et al., 2017). Uma vez biodisponíveis na água, os metais são absorvidos pelos peixes através de quatro rotas principais: água, alimento, brânquias e pele. Após absorção, o sangue os transporta para diferentes órgãos (Jabeen e Chaudhry, 2010), nos quais podem se bioacumular. A bioacumulação de metais nos peixes e a sua posterior distribuição nos órgãos é influenciada por diversos fatores, tais como sexo, idade, tamanho, ciclo reprodutivo, padrões de natação, comportamento alimentar e habitat (Zhao et al., 2012; Canli e Atli, 2003).

As brânquias dos peixes constituem um órgão multifuncional, o qual é o principal responsável pelas trocas gasosas na maioria das espécies e desempenha um papel importante na regulação osmo-iônica, equilíbrio ácido-básico e excreção de nitrogênio (Evans et al., 2005). O tecido branquial é o primeiro a entrar em contato com contaminantes na água devido à sua grande área de superfície e à pequena distância de difusão entre a água e o sangue. Alterações decorrentes da exposição a contaminantes, como a hiperplasia e hipertofia das células branquiais e fusão lamelar, ajudam a evitar que esses produtos químicos atinjam a corrente sanguínea (Cerqueira e Fernandes, 2002) e são consideradas respostas defensivas à contaminantes. Entretanto, essas mudanças reduzem a área de superfície respiratória e aumentam a distância de difusão água-sangue e podem prejudicar a trocas gasosas (Cerqueira e Fernandes, 2002, Fernandes e Mazon, 2003). Tão sensível quanto as brânquias, o rim de teleósteos é um dos primeiros órgãos afetados pela exposição à contaminantes, pois recebe a maior parte do sangue vindo dos órgãos respiratórios. A função predominante do rim posterior de teleósteos é a produção de urina, formada por mecanismos integrados de ultrafiltração, reabsorção de água e solutos e secreção (Martinez, 2017).

O mecanismo-chave da toxicidade do metais tem sido relatado com o comprometimento osmoregulatório associado à inibição de ATPases nos tecidos osmorregulatórios de peixes, como brânquia e rim (McGeer e Wood, 1998). Estes elementos podem alterar a atividade das enzimas tanto pela ligação aos seus grupos

funcionais ou pelo deslocamento do metal associado à enzima (Viarengo, 1989). As ATPases desempenham um papel fundamental no transporte de íons através da célula, mantendo assim o equilíbrio osmótico no animal (Atli e Canli, 2013), atuando na captação ativa de íons da água, ou gerando gradientes eletroquímicos favoráveis a entrada de determinados íons para o sangue. Desta forma, as ATPases, em conjunto com os parâmetros iônicos têm sido considerados como biomarcadores sensíveis utilizados para avaliação dos efeitos de metais sobre espécies de peixes.

O telóstéo dulcícola Sul-Americano *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), tem sido utilizado como modelo biológico para avaliação dos efeitos de metais, incluindo distúrbios osmorregulatórios, associados a metais como o Pb (Martinez et al., 2004; Ribeiro et al., 2014), Al (Camargo et al., 2009) e Cd (Silva e Martinez, 2014); estresse oxidativo decorrente da exposição ao Ni (Palermo et al., 2015) e ao Cu (Carvalho et al., 2015; Simonato et al., 2016) além de alterações morfológicas no tecido branquial também associadas ao Cu (Cerqueira e Fernandes, 2002). Diante deste contexto, é importante avaliar os potenciais efeitos de misturas complexas de contaminantes agrícolas, que podem conter metais traço, na osmorregulação em teleósteos, e como esses estressores químicos podem interagir no organismo promovendo efeitos celulares teciduais. Assim, com o presente trabalho objetivou-se avaliar a presença de metais em água e sedimento de ambientes aquáticos que sofrem a influência de atividades agrícolas, a bioacumulação destes elementos em diferentes órgãos de *P. lineatus* confinados *in situ* nestes locais e os potenciais efeitos da interação destes metais em parâmetros osmo-iônicos e histológicos dos peixes.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Área de estudo

Os dois locais de confinamento dos peixes, brevemente descritos abaixo, constituem-se de ambientes lacustres construídos ao longo de ribeirões localizados no município de Londrina e região metropolitana, norte do estado do Paraná, Sul do Brasil,

distinguidos pelo grau de impacto antrópico exercido sobre os mesmos (Fig. 2.1 Cap. II), sendo estes:

Local de referência (REF) (23°20'01.35" S e 51°12'31.22"W): localizado em uma sequência de lagos ao longo de um pequeno afluente da microbacia do Ribeirão Cafezal, que constitui a Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL), sendo um local com um menor nível de perturbação antrópica, presença de uma maior faixa vegetação ciliar e, portanto, menos susceptível à entrada de contaminantes que o local EXP.

Local experimental (EXP) (23°25,50.43" S e 51°20'28.84"W): constituído de um grande lago construído em um afluente da bacia do Ribeirão Apertados, localizado em uma região de intensa atividade rural, caracterizada pela supressão da vegetação ciliar, prevalência de cultivo de monoculturas não perenes e utilização de mecanização e agrotóxicos, com o risco potencial de contaminação do solo, bem como as águas subterrâneas e superficiais (Vieira et al., 2016).

4.2.2 Desenho experimental

Juvenis de *P. lineatus* (n= 1000; tamanho médio inicial = 12,94 ± 3,98 g; 10,57 ± 1,16 cm [média ± DP]; aproximadamente seis meses de idade) foram fornecidos pela EPUEL. Os peixes foram divididos em dois grupos: grupo de referência (REF), no qual os animais (n = 500) foram confinados em uma grande gaiola (2 x 2 x 1,5 m; 6000 L) constituída de flutuadores de polietileno e tela de poliéster recoberta com PVC com abertura de malha de 5 mm na própria EPUEL; e um grupo experimental (EXP), constituído por exemplares (n= 500) que foram transportados para o campo em sacos plásticos contendo água e oxigênio e confinados no local EXP, sob as mesmas condições experimentais que o grupo REF. Anterior à introdução dos peixes nas gaiolas, um grupo de animais (n = 30) foi amostrado na própria EPUEL para determinação dos valores basais de cada biomarcador (T₀). Os experimentos foram conduzidos durante os meses de março a julho de 2015.

As gaiolas foram instaladas com algumas semanas de antecedência à introdução dos peixes para que pudesse ocorrer a entrada de material particulado e sedimento dentro deste compartimento e foram mantidas no local de maneira que a base permanecesse em

contato direto com o fundo dos lagos, possibilitando aos peixes o acesso ao sedimento. Adicionalmente, os animais foram alimentados três vezes por semana com ração comercial (Guabi®, 36% de conteúdo proteico), de maneira equivalente em ambos os locais de exposição.

Os peixes permaneceram confinados durante um período de 120 dias, e ao longo desse período, amostragens periódicas foram realizadas, especificamente após 5 (t5), 15 (t15), 30 (t30), 60 (t60), 90 (t90) e 120 (t120) dias de exposição. Decorrido cada tempo experimental pré-estabelecido, um grupo de animais (n= 50) foi retirado de cada local e imediatamente transportado ao laboratório (em trânsito < 1 hora) em caixas plásticas contendo água do próprio local e oxigenação.

Durante a realização dos experimentos, parâmetros físicos e químicos da água (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade) foram monitorados por meio de um medidor multiparâmetro (YSI ProDSS, USA).

No laboratório, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1 g.L⁻¹), medidos (cm) e pesados (g) e em seguida mortos por secção medular. Em um grupo de vinte animais uma amostra de sangue foi coletada a partir da veia caudal com o auxílio de seringas heparinizadas para determinação dos íons plasmáticos. Amostras de brânquia e rim posterior (n = 10) foram retiradas e armazenadas em tubos criogênicos contendo tampão SEI e imediatamente mantidas a -80°C até o momento das análises. Outros dez animais foram mortos e tiveram as brânquias e o rim retirados para processamento histológico. Em um último grupo de peixes (n=10) amostras de fígado, brânquia, rim posterior, cérebro e músculo branco foram retiradas para determinação das concentrações de metais. Estes procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (Processo 10493.2014.27).

4.2.3 Análises de metais em água superficial, sedimento e biota

Para determinação das concentrações de Cu, Cr, Cd, Pb, Ni e Zn, amostras de água foram coletadas (n = 8/ponto), em cada tempo experimental pré-determinado, em tubos falcon (15 mL) descontaminados. Metade das amostras de água foi filtrada (tamanho de

poro de 0,45 μm) e imediatamente acidificada (HNO_3 1%) para a quantificação das concentrações de metais dissolvidos. As amostras de água restantes foram acidificadas sem filtragem para a quantificação das concentrações de metais totais. Amostras de sedimento superficial (5 – 10 cm de profundidade) foram coletadas em tubos falcon (50 mL) descontaminados, para análise dos mesmos metais. Todas as amostras foram transportadas para o laboratório sob refrigeração e processadas de acordo com as metodologias descritas a seguir. Para análises dos metais no sedimento, adicionou-se ácido clorídrico (HCl) 0,1 M em 1 g de amostra de sedimento, previamente seco a 60 °C, em seguida, as amostras foram submetidas a 2 h de agitação horizontal e filtragem (8 μm de tamanho de poro) (Mozeto, 2004).

As concentrações de metais (Cu, Cr, Cd, Pb e Ni) também foram determinadas em diferentes tecidos dos peixes (n = 10 por órgão): brânquia, fígado, rim, músculo e cérebro. Para tanto, os tecidos foram completamente secos a 60 °C e posteriormente submetidos a digestão ácida durante 48 h a 60 °C em ácido nítrico supra puro (Suprapur, Merck) 5N (1:5, w:v), de acordo com Alves e Wood (2006). Os metais foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica de chama (Zn) ou eletrotérmica (Cu, Cr, Cd, Pb e Ni), utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica equipado com um atomizador de forno de grafite (Perkin Elmer, AAnalyst 700, EUA) em comparação com soluções padrão de referência (Specsol, Brazil).

Imediatamente após as amostragens, as amostras de sangue foram centrifugadas (1870 g, 10 min – MCD2000, Hsiangtai, Taiwan), para a separação do plasma, que foi armazenado a -20° C até a as análises. As amostras de plasma foram utilizadas para análise da concentração osmótica e de sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}). A osmolalidade plasmática foi avaliada em osmômetro de congelamento (Osmomat 030, Gonotec, Alemanha). O plasma foi diluído (100x) em água deionizada para a análise dos íons Na^+ e K^+ em fotômetro de chama (DM-62, Digmed, Brasil). A concentração de Cl^- foi determinada pelo método do tiocianato de mercúrio, com auxílio de kit comercial (Labtest, Brasil), e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Victor3, PerkinElmer, USA) a 490 nM. Os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} foram quantificados a partir de amostras de plasma diluídas (50x) em óxido de lantânio (La_2O_3 – 0,1%), em EAA (AAnalyst 700, PerkinElmer, EUA), em chama, e calculadas com base em uma curva construída a partir de padrões certificados (Specsol, Brasil).

4.2.5 Atividades enzimáticas

Na⁺/K⁺-ATPase e H⁺-ATPase

Para análise da Na⁺/K⁺ATPase (NKA) e H⁺-ATPase as amostras de rim posterior e brânquias foram armazenadas em ultrafreezer (-70° C), em tubos plásticos contendo tampão SEI (Sacarose 150 mM, EDTA 10 mM, Imidazol 50 mM, pH 7,5). O tecido renal (1:10 p:v) e filamentos branquiais (1:5 p:v) foram homogeneizados com o tampão SEI contendo deoxicolato de Na⁺ (2,4 mM), centrifugados (7500 g, 15 min, 4° C) e o sobrenadante foi utilizado para a análise das enzimas, a partir de adaptações do protocolo estabelecido por Gibbs e Somero (1989). A concentração de proteínas totais foi determinada no sobrenadante para posterior diluição de modo a normalizar a concentração proteica em 1 mg.mL⁻¹. A atividade das enzimas foi mensurada através da diferença no declínio da absorbância em meio de reação (ATP 1 mM, NADH 0,2 mM, piruvato quinase 3 U.mL⁻¹, lactato desidrogenase 2 U.mL⁻¹, frutose 1,6 difosfato 0,1 mM, fosfoenol-piruvato 2 mM, pH 9,0), contendo Netilmaleimida (NEM - 2 mM, inibidor da H⁺-ATPase), ouabaína (2 mM, inibidor da NKA), ou sem inibidores (atividade total das ATPases) em decorrência da quebra de ATP e consequente formação de ADP. A absorbância das amostras, em quadruplicata, foi medida a cada minuto durante 15 minutos (340 nm – Victor3, PerkinElmer, USA), e a atividade ATPásica em cada condição foi determinada através da seguinte fórmula: $\{(inclinação \cdot coeficiente \text{ de extinção} / ([proteína] \cdot diluição) \cdot tempo / 1000)\}^{-1}$. A atividade da NKA foi calculada pela diferença dos meios contendo ou não ouabaína, e da H⁺-ATPase, pela diferença dos meios com e sem NEM, e expressas em $\mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Anidrase carb\u00f4nica

A atividade da anidrase carb\u00f4nica no tecido renal e nos filamentos branquiais foi determinada segundo Vitale et al. (1999). Para tanto, os tecidos foram homogeneizados (1:10 p:v) em tamp\u00e3o (manitol 225 mM, sacarose 75 mM, tris-base 10 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,4) e centrifugados (7500 g, 15 min, 4° C). Para an\u00e1lise da atividade da anidrase carb\u00f4nica foi adicionado ao sobrenadante \u00e1gua saturada com CO₂. A atividade catal\u00edtica da

enzima foi quantificada pela variação do pH, determinada durante 20 s, utilizando-se um pHmetro de bancada (Jenway 3510, EUA). A inclinação da reta gerada pela queda do pH ao longo do tempo forneceu a taxa de reação catalisada (TC) e a taxa de reação não catalisada (TNC) foi obtida pela leitura do pH na ausência de amostra, substituindo-se amostra por tampão. A partir dessas duas medidas a atividade da anidrase carbônica (AC) foi calculada pela fórmula: $AC = [TC/TNC - 1].mg\ ptn^{-1}$.

Concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas nos tecidos homogeneizados, para a normalização das amostras de NKA e H⁺-ATPase, e para o cálculo da AC, foi determinada segundo método descrito pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação de proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. A curva de calibração foi feita com albumina de soro bovino (BSA) e a absorbância lida em espectrofotômetro a 595 nm.

4.2.6 Análises histológicas

Para as análises histológicas o segundo arco branquial (n = 8) e o rim posterior (n = 8) foram separados no momento da amostragem, fixados em Bouin (4 – 5 h) e conservados em álcool 70%. Posteriormente os tecidos foram processados segundo protocolo histológico de rotina: desidratação alcoólica seriada, diafanização em xilol e inclusão em parafina a 60°C. Os blocos foram cortados com 5 µm de espessura em micrótomo rotativo semiautomatizado (Leica Biosystems, RM2245) para montagem das lâminas, que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Zeiss, Primo Star, Alemanha) com uma câmera acoplada (Zeiss, AxioCamERc 5S, Alemanha) e um sistema computacional de análise e captura de imagens (Zeiss, AxioVision 4.8, Alemanha). A avaliação semi-quantitativa das alterações histológicas branquiais e renais baseou-se na severidade de cada lesão, segundo critério estabelecido por Poleksic e Mitrovic-Tutundžic (1994), fornecendo o Índice de Alteração Histológica (IAH). A análise avalia progressivamente o grau de comprometimento da funcionalidade do órgão da

seguinte forma: alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do tecido; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis. Para o cálculo do IAH de cada animal utilizou-se a seguinte fórmula: $IAH = 10^0 \Sigma I + 10^1 \Sigma II + 10^2 \Sigma III$, de modo que I, II e III correspondem ao número de alterações de estágio I, II e III, respectivamente. A classificação do prejuízo funcional do tecido foi estabelecida segundo o valor obtido para o IAH da seguinte forma: 0 a 10 – funcionamento normal do órgão; 11 a 20 – danos de leves a moderados; 21 a 50 – danos de moderados a severos; 51 a 100 – danos muito severos; > 100 – danos irreparáveis.

4.2.7 Análises estatísticas

Para cada um dos tempos experimentais (t5, t15, t30, t60, t90 e t120) os resultados encontrados de cada parâmetro para os grupos REF e EXP foram comparados entre si usando o teste *t* de *Student* ou *Mann-Whitney*. Os resultados obtidos para cada local de exposição (REF e EXP) também foram comparados entre si nos diferentes tempos experimentais usando análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskall Wallis). As diferenças, quando indicadas, foram localizadas pelo teste de comparações múltiplas SNK (paramétrico) ou Dunn's (não paramétrico). O uso da estatística paramétrica ou não paramétrica foi definido dependendo da distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Concentrações de metais na água e sedimentos

Dos metais analisados (Tabela 4.1), o Cr foi mais abundante na água, tanto no local REF quanto EXP, seguido pelo Ni e Cu, embora estas concentrações estejam abaixo da concentração máxima permitida pela legislação brasileira (Brasil, 2005) para proteção da biota em águas continentais. No ponto EXP, mais susceptível à entrada de contaminantes de origem agrícola, foram detectadas maiores concentrações de Cd e Pb na água, em comparação com o ponto REF.

Ao longo do período de exposição, observa-se um aumento nas concentrações de Cd e Pb na água, em ambos os locais de exposição, que pode ser um efeito do maior aporte destes elementos traço para os corpos d'água em decorrência do aumento das chuvas (dados não mostrados) nos tempos mais longos de exposição. Entretanto, para outros metais como o Ni, o aumento no volume de água nestes ambientes em decorrência das chuvas parece ter promovido um efeito de diluição.

Os níveis de grande parte dos metais analisados nos sedimentos do local EXP foram superiores àqueles encontrados em REF, destacando-se o Cu, Cr e o Ni. Nos sedimentos, os níveis de metais não sofreram variações relevantes ao longo do tempo experimental.

Tabela 4.1 – Concentrações de metais (média ± EP; n=4) total (T) e dissolvido (D) na água ($\mu\text{g. L}^{-1}$) e sedimentos (S) ($\mu\text{g. Kg}^{-1}$ peso seco) ao longo do tempo de exposição in situ de *P. lineatus* em dois locais: referência (REF) e experimental (EXP), em áreas agrícolas do Sul do Brasil.

Metal	Local	Tempo de exposição (dias)						Média	
		5	15	30	60	90	120		
Cu	REF	T	3.13 ± 0.03	3.32 ± 0.02	4.18 ± 0.79	4.62 ± 1.27	6.22 ± 2.26	3.16 ± 0.47	4.11
		D	0.48 ± 0.08	1.31 ± 0.06	0.84 ± 0.13	1.24 ± 0.26	1.83 ± 0.54	0.52 ± 0.09	1.04
		S	38.12 ± 0.38	42.95 ± 0.10	35.61 ± 2.81	42.80 ± 1.37	45.11 ± 0.23	37.18 ± 0.26	40.30
	EXP	T	1.09 ± 0.13	1.38 ± 0.10	1.36 ± 0.27	1.34 ± 0.18	2.33 ± 0.53	1.73 ± 0.99	1.54
		D	1.09 ± 0.63	0.94 ± 0.24	0.93 ± 0.26	1.20 ± 0.093	1.18 ± 0.18	0.99 ± 0.22	1.06
		S	68.02 ± 0.53	73.52 ± 1.98	29.95 ± 0.60	57.27 ± 0.67	73.00 ± 0.56	60.63 ± 0.37	60.39
Cr	REF	T	23.02 ± 1.69	24.4 ± 0.90	23.71 ± 0.71	25.22 ± 3.32	23.53 ± 0.13	15.02 ± 0.82	22.48
		D	22.31 ± 0.09	20.64 ± 1.41	20.37 ± 0.60	22.69 ± 0.96	20.40 ± 0.20	14.92 ± 1.37	20.22
		S	2.12 ± 0.22	1.63 ± 0.11	0.86 ± 0.21	1.46 ± 0.04	1.20 ± 0.05	0.95 ± 0.03	1.37
	EXP	T	22.71 ± 0.83	21.24 ± 2.06	21.52 ± 0.68	21.56 ± 0.58	22.11 ± 0.46	18.86 ± 5.96	21.33
		D	20.62 ± 1.19	20.45 ± 0.79	20.39 ± 1.78	21.69 ± 1.34	20.80 ± 1.07	17.86 ± 4.36	20.30
		S	3.08 ± 0.03	3.16 ± 0.19	1.54 ± 0.04	3.66 ± 0.10	4.11 ± 0.03	3.81 ± 0.01	3.23
Cd	REF	T	0.028 ± 0.017	0.02	0.043 ± 0.036	0.080 ± 0.043	0.110 ± 0.024	0.160 ± 0.062	0.07
		D	0.019 ± 0.012	0.012 ± 0.006	0.021 ± 0.009	0.027 ± 0.017	0.074 ± 0.015	0.143 ± 0.072	0.05
		S	0.019 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.022 ± 0.001	0.025 ± 0.001	0.022 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.02
	EXP	T	0.078 ± 0.078	0.021	0.066 ± 0.053	0.088 ± 0.077	0.156 ± 0.008	0.247 ± 0.09	0.11
		D	0.055 ± 0.018	0.014 ± 0.012	0.028 ± 0.011	0.054 ± 0.035	0.146 ± 0.036	0.125 ± 0.097	0.05
		S	0.044 ± 0.002	0.037 ± 0.001	0.0037 ± 0.001	0.031 ± 0.001	0.027 ± 0.001	0.033 ± 0.001	0.03
Pb	REF	T	1.45 ± 0.68	1.19 ± 0.32	1.83 ± 0.79	3.11 ± 1.31	3.53 ± 1.31	4.54 ± 1.39	2.61
		D	1.26 ± 0.61	0.97 ± 0.20	1.11 ± 0.39	1.67 ± 0.25	2.81 ± 0.64	2.36 ± 1.46	1.70
		S	1.92 ± 0.08	1.61 ± 0.068	1.71 ± 0.039	2.11 ± 0.03	2.20 ± 0.042	1.44 ± 0.001	1.83
	EXP	T	2.41 ± 1.25	1.88 ± 0.74	1.34 ± 0.34	2.79 ± 0.21	4.39 ± 1.43	5.09 ± 1.97	2.98
		D	2.26 ± 1.25	1.26 ± 0.43	1.24 ± 0.53	2.70 ± 0.13	3.92 ± 1.09	3.89 ± 1.57	2.55
		S	2.02 ± 0.12	2.26 ± 0.012	2.00 ± 0.041	2.31 ± 0.16	2.26 ± 0.009	2.59 ± 0.16	2.24
Ni	REF	T	4.38 ± 0.26	3.78 ± 0.33	4.26 ± 0.14	4.55 ± 1.35	3.97 ± 0.35	0.47 ± 0.17	3.57
		D	3.54 ± 0.33	3.48 ± 0.38	3.25 ± 0.39	4.03 ± 0.91	3.70 ± 0.68	0.19 ± 0.09	3.03
		S	0.34 ± 0.003	0.322 ± 0.002	0.312 ± 0.009	0.389 ± 0.006	0.358 ± 0.009	0.271 ± 0.002	0.33
	EXP	T	4.26 ± 1.02	2.72 ± 0.55	3.06 ± 0.25	3.20 ± 0.33	4.08 ± 0.44	0.55 ± 0.19	2.98
		D	3.60 ± 0.11	2.75 ± 0.13	2.83 ± 0.37	3.09 ± 0.38	3.02 ± 0.16	nd	2.55
		S	0.643 ± 0.001	0.720 ± 0.005	0.677 ± 0.002	0.766 ± 0.017	0.721 ± 0.001	0.823 ± 0.007	0.73
Zn	REF	T	0.033 ± 0.011	0.043 ± 0.007	0.041 ± 0.014	0.054 ± 0.037	0.039 ± 0.007	0.031 ± 0.011	0.04
		D	0.026 ± 0.016	0.033 ± 0.005	0.035 ± 0.003	0.022 ± 0.009	0.018 ± 0.002	0.025 ± 0.007	0.03
		S	0.009 ± 0.0003	0.008 ± 0.0001	0.004 ± 0.0002	0.012 ± 0.0004	0.010 ± 0.0005	0.009 ± 0.0005	0.01
	EXP	T	0.050 ± 0.005	0.051 ± 0.015	0.032 ± 0.002	0.046 ± 0.022	0.037 ± 0.022	0.053 ± 0.034	0.04
		D	0.044 ± 0.005	0.047 ± 0.005	0.033 ± 0.009	0.0213 ± 0.006	0.027 ± 0.010	0.041 ± 0.009	0.07
		S	0.014 ± 0.0004	0.014 ± 0.0001	0.009 ± 0.0003	0.013 ± 0.0004	0.015 ± 0.0002	0.015 ± 0.0008	0.01

nd = não detectado

4.3.2 Caracterização de metais nos tecidos

As concentrações médias da somatória dos metais Cu, Cr, Cd, Pb e Ni quantificados nos diferentes tecidos de *P. lineatus*, ao longo de 120 dias de exposição *in situ* estão resumidas na Figura 4.1. A brânquia foi o único órgão que acumulou uma maior quantidade de metais, quando comparadas as duas situações de exposição. Houve um aumento 27% na quantidade total de metais neste órgão nos animais confinados em EXP em relação àqueles confinados em REF. As concentrações de metais nos diferentes órgãos seguiram a ordem: fígado > cérebro > rim > músculo = brânquia. A Figura 4.2 representa a proporção relativa de cada um dos metais analisados, para cada órgão e condição experimental. Em todos os órgãos, o Cu foi o metal mais abundante e sua proporção aumentou na brânquia dos peixes mantidos em EXP, em relação à REF, enquanto nos outros tecidos manteve-se similar, comparando os locais de exposição. A proporção dos demais metais variou entre diferentes órgãos analisados, mas de maneira geral o Cr foi o segundo metal mais abundante, seguido do Pb e do Ni.

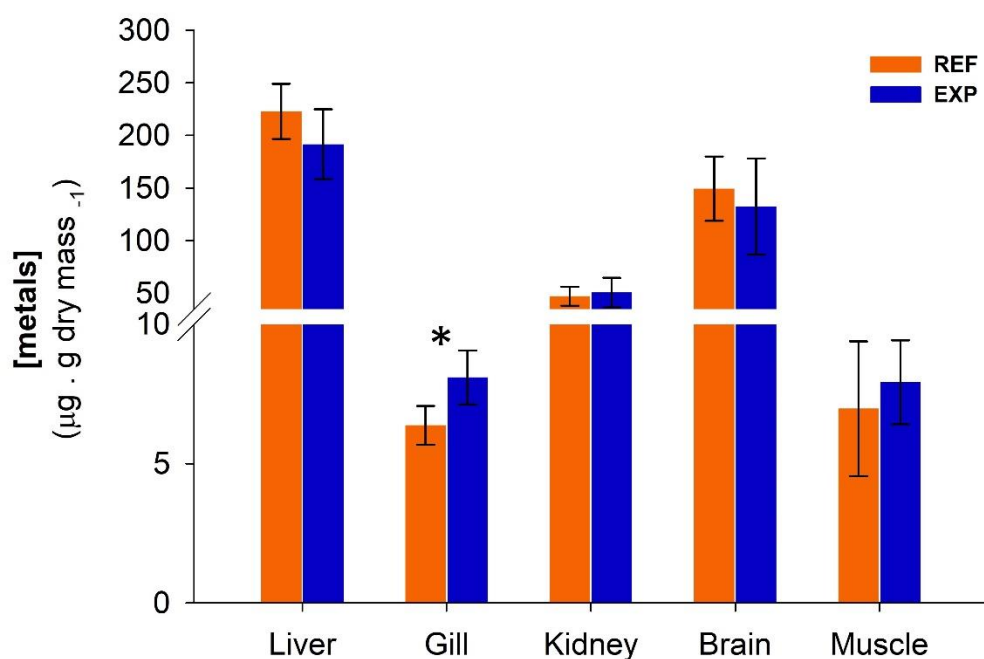


Figura 4.1 – Níveis de metais (Σ Cu, Cr, Cd, Pb e Ni) no fígado, brânquias, rim, cérebro e músculo de *P. lineatus* expostos *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias. As barras representam a média e as linhas verticais o desvio padrão. Asterisco indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

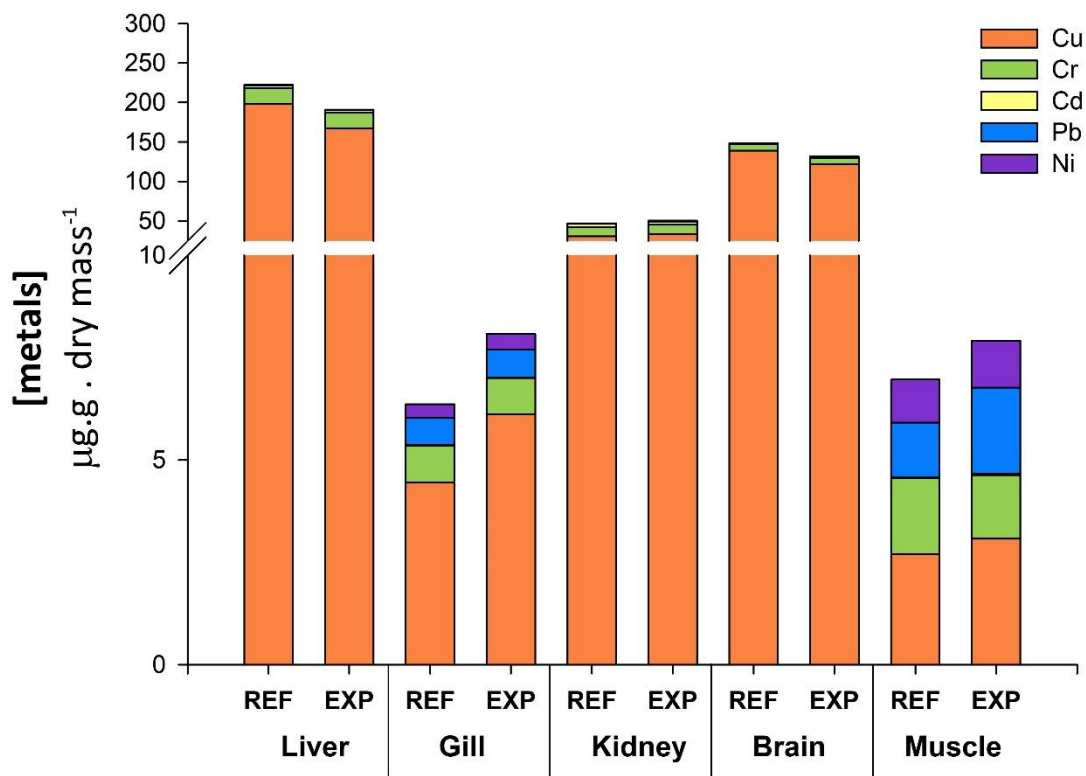


Figura 4.2: Proporção relativa dos metais Cu, Cr, Cd, Pb e Ni no fígado, brânquia, rim, cérebro e músculo de *P. lineatus* expostos *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias.

4.3.3 Parâmetros osmoiológicos

As concentrações plasmáticas de Na^+ (Fig. 4.3 A) apresentaram um mesmo padrão temporal de variação em ambas as condições experimentais, de modo que, após 90 dias de exposição foi observada uma hipernatremia nos peixes confinados no local REF e EXP em relação as tempos mais curtos de confinamento. Em t_{60} , as concentrações de Na^+ nos peixes mantidos em EXP foram menores em relação aqueles mantidos em REF. Variações transitórias temporais também foram observadas para as concentrações K^+ (Fig. 4.3 B), em ambas as condições de confinamento. Com relação as concentrações de Cl^- (Fig. 4.3 C), pequenas variações temporais também foram observadas em ambas as condições experimentais, entretanto, não foram observadas alterações significativas entre as concentrações deste íon comparando as duas condições em cada tempo experimental. As concentrações de Ca^{2+} (Fig. 4.3 D) também apresentaram variações temporais em ambas

as condições. Entretanto, repostas opostas foram observadas ao longo do tempo. Os peixes mantidos no local EXP apresentaram uma hipercalcemia em t5 e t15 e uma hipocalcemia em t90 e t120, em relação aos animais confinados em REF. Outro íon que apresentou variações ao longo do período experimental foi o Mg^{2+} (Fig. 4.3 E). Os peixes confinados em EXP apresentaram maiores concentrações de Mg^{2+} em t5, t90 e t120 em relação aos peixes mantidos em REF. Apesar das variações temporais nas concentrações iônicas, a osmolalidade plasmática (Fig. 4.3 F) não apresentou variações nos peixes mantidos no local REF ao longo de 120 dias. Por outro lado, juvenis de *P. lineatus* engaiolados em EXP apresentaram valores de osmolalidade reduzidos em t15 e t60, em comparação à REF.

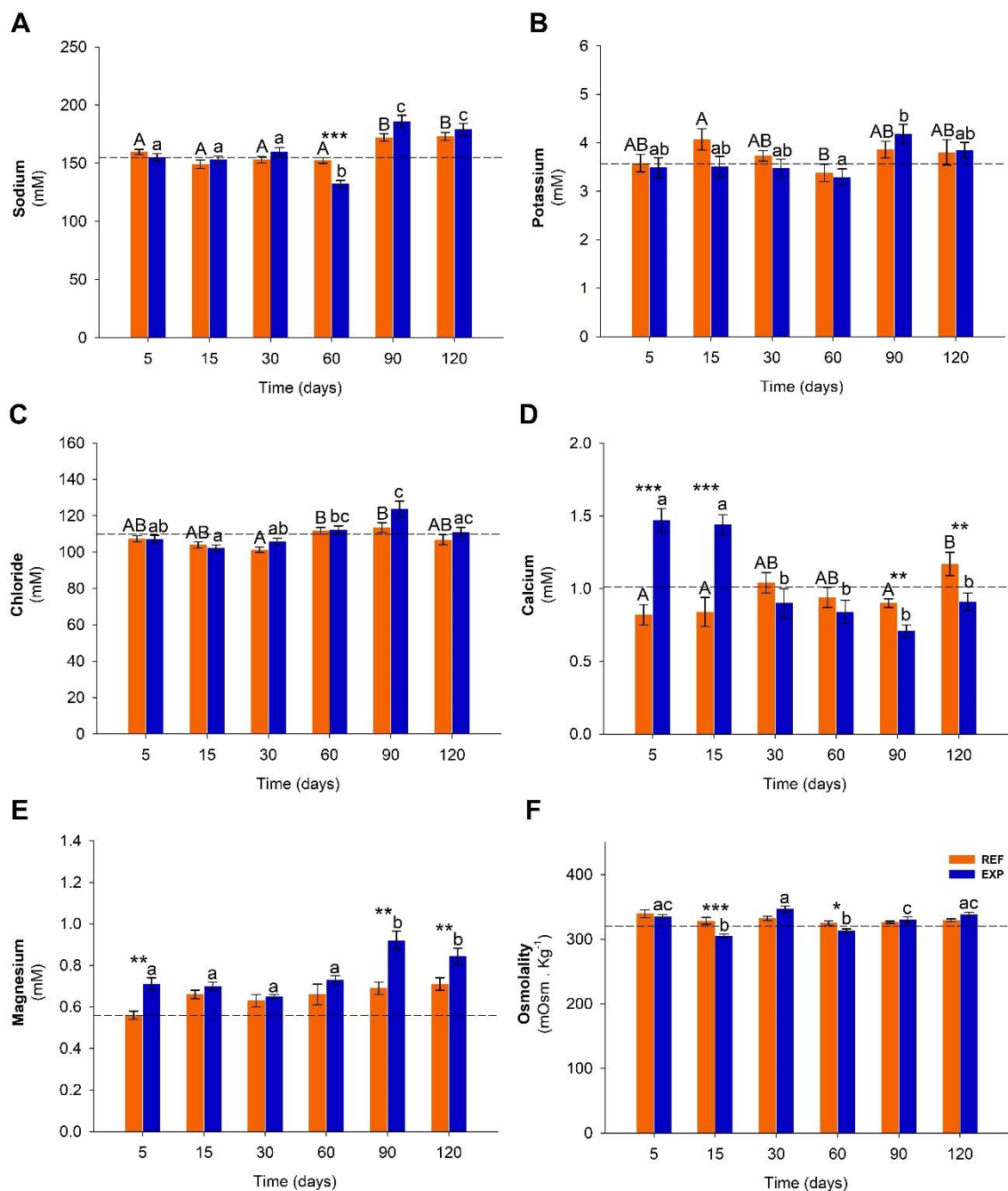


Figura 4.3. Parâmetros osmoiônicos no plasma de *P. lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias. Concentração de sódio (A), potássio (B), cloreto (C), cálcio (D), magnésio (E) e osmolalidade (F). As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão (n = 10 - 15). As linhas tracejadas representam o valor basal médio (t₀) para o parâmetro apresentado (Na⁺ = 154,76 ± 3,16; K⁺ = 3,59 ± 0,20; Cl⁻ = 109,93 ± 1,89; Mg²⁺ = 0,56 ± 0,02; Ca²⁺ = 1,01 ± 0,05). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os tempos experimentais, para cada local de exposição. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo de exposição (p < 0,05*; < 0,01**; < 0,001***).

4.3.4 Enzimas envolvidas na osmorregulação

As enzimas branquiais e renais apresentaram variações em suas atividades ao longo dos tempos experimentais, principalmente nos animais confinados em EXP. Adicionalmente, a análise entre os locais (REF x EXP), em um mesmo tempo experimental, apontou a ocorrência de diferenças relevantes de quase todas as enzimas analisadas. Nas brânquias, houve uma diminuição da atividade da NKA (Fig. 4.4 A) nos animais mantidos em EXP após 120 dias de exposição, com relação à t5 e t15 e com o local REF para o mesmo tempo experimental. O contrário foi observado no rim, onde um aumento na atividade da NKA (Fig. 4.4. B) foi observado nos peixes mantidos em EXP em t60 e t120, em comparação aos demais tempos e ao local REF, nos mesmos períodos. Uma diminuição da HA branquial (Fig. 4.4 C) também foi encontrada nos animais do local EXP em relação àqueles confinados em REF após 30 dias de exposição. Por outro lado, assim como a NKA, a atividade da HA renal (Fig. 4.4 D) também se mostrou aumentada nos peixes mantidos em EXP nos tempos mais longos de exposição (t60, t90 e t120), tanto em relação aos tempos anteriores, como em comparação aos animais do local REF. Variações na AC não foram observadas nos animais mantidos em REF ao longo do tempo de exposição. Já os animais expostos ao local EXP, apresentaram um aumento da AC branquial (Fig. 4.4 E) em t120, em relação à t5, t60 e t90, e ao local REF, no mesmo tempo experimental. No rim, a AC (Fig. 4.4 F) mostrou-se diminuída nos animais mantidos em EXP em relação à REF, após 30 dias de exposição.

4.3.5 Análises histológicas

A análise histológica de brânquias de *P. lineatus* do grupo basal mostrou a estrutura normal deste órgão, com um grande número de filamentos alinhados sustentados por estruturas cartilaginosas, uma grande população de células indiferenciadas na região interior e células achatadas, denominadas células pavimentosas (CPV) recobrando o exterior, e a presença de células mucosas e células ricas em mitocôndrias (CRM) distribuídas espaçadamente ao longo do filamento. Diversas lamelas secundárias partem

bilateralmente de cada filamento, formadas por CPV achatadas e de núcleo ovalado, que são unidas e sustentadas por células pilares, formando canais de circulação sanguínea. Estes canais apresentam tamanho relativamente constante, por onde circulam as células sanguíneas (Fig. 4.5 A).

Não houve diferença entre os tipos de alterações encontradas entre cada situação experimental (REF e EXP). As principais histopatologias branquiais estão representadas na Fig. 4.5 B – F. Entre as alterações epiteliais, as mais frequentemente observadas foram desarranjo lamelar, seguido de hipertrofia e hiperplasia das células epiteliais caracterizada pela proliferação das células do filamento resultando em fusão de parte das lamelas ou de várias lamelas (Tabela 4.2). As alterações mais frequentemente observadas nos vasos sanguíneos nos animais foi a dilatação do canal marginal, seguida pela congestão vascular, caracterizada pela presença simultânea de um grande número de células sanguíneas no canal marginal, além de aneurismas e dilatação do seio sanguíneo lamelar (Tabela 4.2). Além destas alterações, a presença de parasitas entre as lamelas foi frequente. Alterações de estágio III, em que o comprometimento do funcionamento normal do órgão é irreversível, não foram observadas. Os valores do IAH para as brânquias de *P. lineatus* confinados no local REF variaram de 6,16 a 17,5 (Fig. 4.7. A), mas a maior parte dos peixes do grupo REF (t5, t15, t30 e t90) apresentaram o valor médio de IAH menor do que 10, o que indica um funcionamento normal do órgão. Já os peixes mantidos no local EXP apresentaram valores de IAH entre 8,50 a 18,2, e a maior parte deles (t5, t15, t30, t90 e t120) IAH > 10, indicando a ocorrência de danos leves a moderados, que podem representar algum prejuízo funcional para o órgão. Diferença significativa no IAH entre os grupos experimentais foi observada apenas em t15 e os peixes mantidos em EXP apresentaram uma maior incidência de alterações na morfologia branquial em relação à REF.

O rim de *P. lineatus* apresenta as mesmas características descritas para a maioria dos teleósteos. Possui porção anterior e posterior bem definidas, sendo que a porção posterior, que foi estudada nesse trabalho, caracteriza-se por uma grande quantidade de corpúsculos renais (constituídos por glomérulo repleto de capilares sanguíneos e a cápsula de Bowman) e de túbulos renais (proximais, distais e ducto coletor) como mostram as fotomicrografias reunidas na Fig. 4.6 A-F. As principais alterações tubulares encontradas no rim de *P. lineatus* (Tabela 4.3) foram degeneração granular e hialina, oclusão da luz tubular

e material no interior do túbulo, seguido de regeneração nuclear e rompimento celular. Já a alteração glomerular mais frequente foi a redução do espaço de Bowman. Agregados de melanomacrófagos foram frequentemente observados em todos os grupos, com maior frequência nos animais confinados em EXP. No presente trabalho não foram encontradas alterações de estágio III no rim de *P. lineatus*. O valor médio de IAH encontrado para o rim (Fig. 4.7 B) nos animais mantidos em REF variou de 18,6 a 35,33 e nos animais mantidos em EXP variou de 33,2 a 40,66. De maneira geral, o IAH para o rim mostrou valores maiores que os encontrados para a brânquia, e não houve variação temporal nesse parâmetro nos peixes mantidos em EXP. Apenas em t5 o IAH dos animais confinados em EXP foi significativamente diferente do local REF.

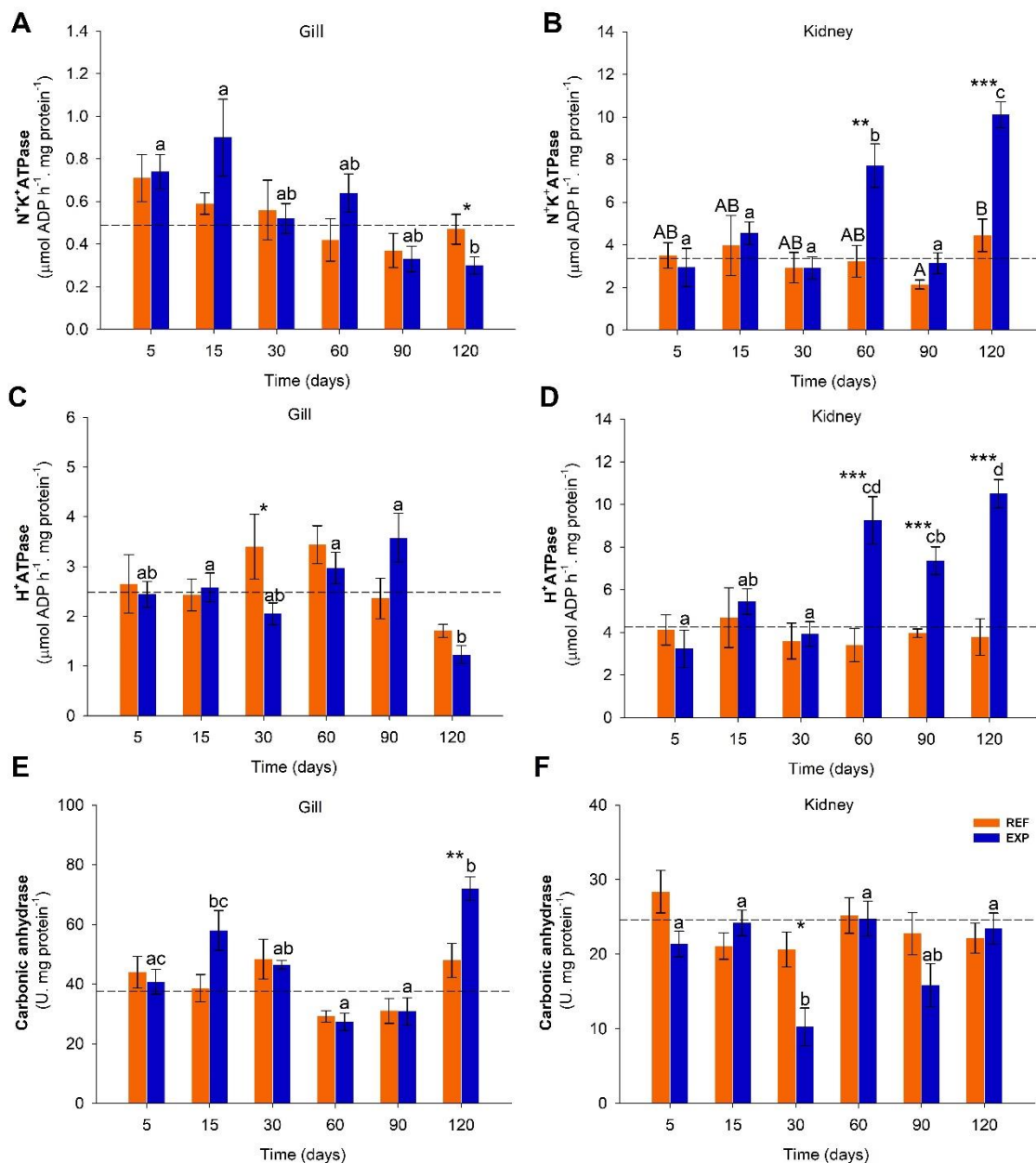


Figura 4.4. Atividade das enzimas Na^+K^+ ATPase (NKA) em brânquias (A) e rim posterior (B), H^+ ATPase (HA) branquial (C) e renal (D) e anidrase carbônica (AC) branquial (E) e renal (F) de *P. lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão ($n = 8 - 10$). As linhas tracejadas representam o valor basal médio (t0) para o parâmetro apresentado (NKA br = $0,49 \pm 0,18$; NKA rim = $3,48 \pm 1,19$; HA br = $2,57 \pm 0,85$; HA rim = $4,08 \pm 1,85$; AC br = $38,52 \pm 10,21$; AC rim = $24,61 \pm 4,28$). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos experimentais, para cada local de exposição. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo de exposição ($p < 0,05^*$; $< 0,01^{**}$; $< 0,001^{***}$).

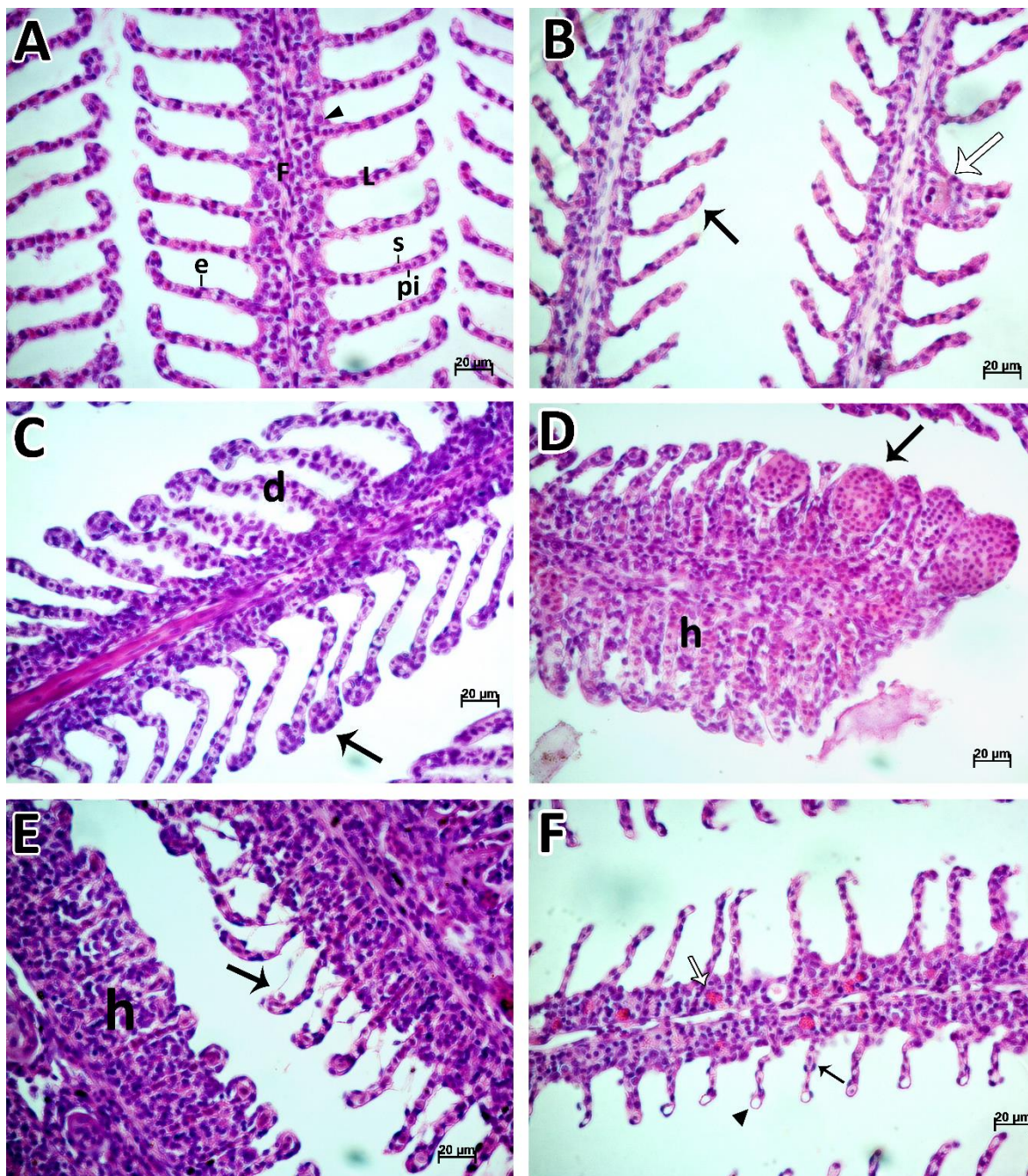


Figura 4.5: Histopatologia em brânquias de *Prochilodus lineatus* confinados *in situ* em locais com diferentes níveis de contaminação ambiental, em áreas agrícolas do Sul do Brasil. (A) – Estrutura branquial normal de um animal obtido no local de referência, indicando suas respectivas estruturas: F = filamento, L = lamela secundária, e = célula epitelial pavimentosa, s = seio sanguíneo lamelar, pi = célula pilar, ponta de seta = célula rica em mitocôndrias (CRM) (B) – Hipertrofia do epitélio lamelar (seta fechada) e parasita entre as lamelas secundárias (seta aberta). (C) – Congestão vascular (seta) e desarranjo lamelar (d). (D) – Aneurismas (seta) e hiperplasia (h). (E) – Hiperplasia das células epiteliais (h) e descolamento epitelial (seta). (F) – Hiperplasia das células mucosas (seta aberta), dilatação do canal marginal (ponta da seta) e aumento do volume do seio sanguíneo lamelar (seta fechada). Barra de escala: 20 µm. Coloração: H&E.

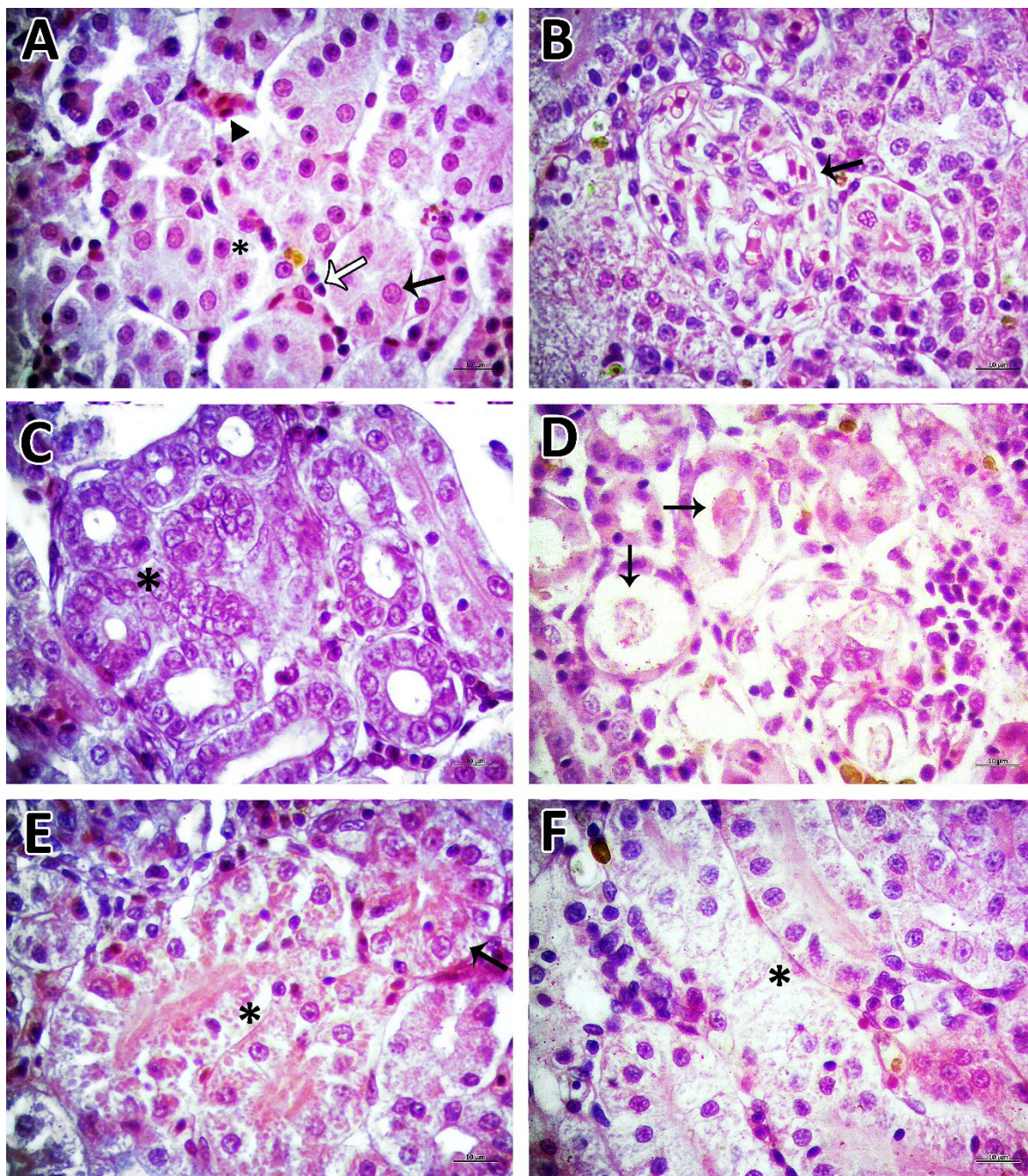


Figura 4.6: Histopatologia em rim posterior de *Prochilodus lineatus* expostos in situ em locais com diferentes níveis de contaminação ambiental, em áreas agrícolas do Sul do Brasil. (A) – Arquitetura renal normal, indicando suas respectivas estruturas: * célula epitelial do túbulo contorcido distal, seta escura: núcleo da célula epitelial do túbulo contorcido distal, seta clara: células do tecido hematopoiético, ponta da seta: hemácias. (B) Redução do espaço de Bowman (seta). (C) Túbulos em regeneração (*). (D) Material no interior do túbulo (setas). (E) - Degeneração hialina (*), degeneração granular (seta). (F) Rompimento celular (*). Barra de escala = 20 µm. Coloração: H&E.

Tabela 4.2. Alterações histológicas em brânquias de *P. lineatus* do grupo basal (t0) bem como confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias.

Alterações	Estágio	REF							EXP					
		T0	5	15	30	60	90	120	5	15	30	60	90	120
Alterações epiteliais														
Hipertrofia epitelial	I	+	+	0+	0+	0	0	0+	++	0+	0+	0+	0+	0+
Descolamento epitelial	I	0+	0+	0	0+	0+	+	0+	+	0+	0	0+	0	0+
Hiperplasia de células epiteliais	I	0+	0+	+	0+	0	0+	0+	0+	+	0+	0+	0+	0+
Fusão de parte das lamelas	I	0+	0+	+	0+	0	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0
Fusão de várias lamelas	I	0+	0+	0+	0	0	0+	0+	0+	+	0	0	0+	0+
Desarranjo lamelar	I	++	++	+	+	++	++	++	+++	++	++	++ +	++	++
Hiperplasia de células mucosas	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0+	0
Alterações sanguíneas														
Dilatação do canal marginal	I	0+	+	+	++	++	++	++	+	+	++	++ +	++	+++
Dilatação do seio sanguíneo lamelar	I	0	0	0+	0	0+	0	0	0+	0+	0+	0+	0+	0
Congestão vascular	I	+	0+	0+	0	+	0+	+	0+	0+	+	0+	+	++
Aneurisma lamelar	II	0	0+	0+	0+	0+	0+	+	0+	0+	0+	0	0+	+
Hemorragia	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Outras alterações														
Presença de parasitas	I	+	+	+	0	0	0+	0	0+	+	0+	0+	0+	0+

0, ausente; 0+, raro; +, pouco frequente; ++, frequente; +++, muito frequente; +++++, extremamente frequente.

Tabela 4.3. Alterações histológicas em rim posterior de *P. lineatus* do grupo basal (t0) bem como confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias.

Alterações	Estágio	REF							EXP					
		T0	5	15	30	60	90	120	5	15	30	60	90	120
Alterações tubulares														
Degeneração granular	I	0	+	0+	0+	+	++	++	++	+	+	++	++	++
Degeneração hialina	I	0	0	0	0	0	++	0+	+	0	0+	0+	++	+
Oclusão da luz tubular	II	0+	+	0	0+	+	+	0+	+	0	+	+	+	+
Material no interior do túbulo	II	0+	0	+	+	0+	0+	+	+	++	0+	+	+	+
Túbulos em regeneração	I	0	0+	0+	0+	+	+	+++	+	0+	0	0+	0	+
Aumento do volume nuclear	I	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0
Vacuolização nuclear	II	0	0	0	0	0	0	0+	0	0	0	0	0	0
Rompimento celular	II	0	0	0	0+	0	0+	+	+	0+	0+	0+	+	0+
Alterações glomerulares														
Redução do espaço de Bowman	II	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	++	+
Outras alterações														
Agregado de melanomacrófagos	I	+	++	++	++	+	++	+++	++	++	++	++	++	+++

0, ausente; 0+, raro; +, pouco frequente; ++, frequente; +++, muito frequente; +++, extremamente frequente.

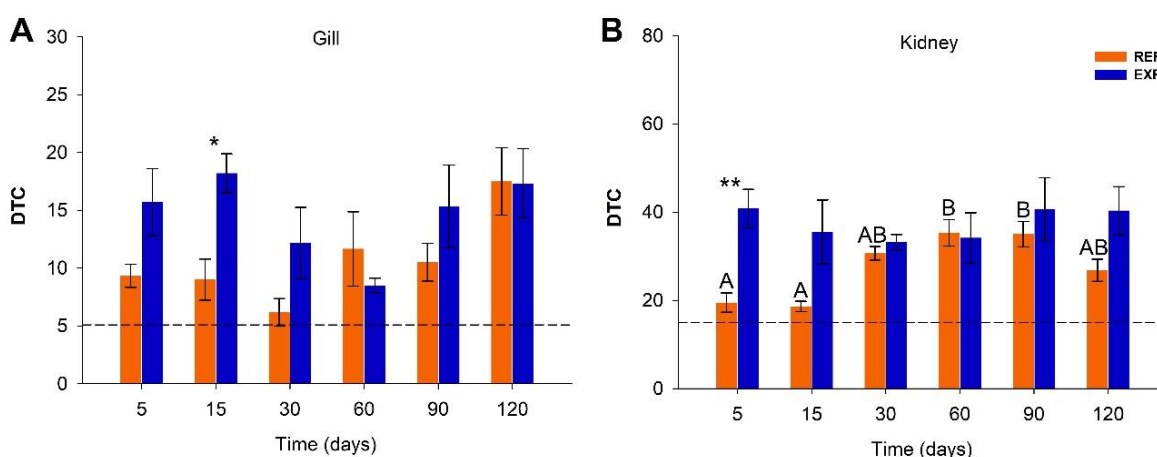


Figura 4.7- Índice de alteração histológica (IAH) em brânquias (A) e rim posterior (B) de *P. lineatus* confinados *in situ* no local de referência (REF) e experimental (EXP) ao longo de 120 dias. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão (n = 8). As linhas tracejadas representam o valor basal médio (t0) para o parâmetro apresentado (IAH br = 5,16 ± 0,83; IAH rim = 6,66 ± 2,72). Letras diferentes indicam diferenças

significativas ($p < 0,05$) entre os tempos experimentais, para cada local de exposição. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo de exposição ($p < 0,05^*$; $< 0,01^{**}$; $< 0,001^{***}$).

4.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, as concentrações de metais na água mostraram-se relativamente baixas, em concentrações inferiores às estabelecidas pela resolução CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005) para águas continentais, determinadas como limites para proteção da vida aquática. O metal que apresentou as maiores concentrações na água foi o Cr, em comparação com os demais metais, mas apesar dos seus níveis mais elevados, as concentrações detectadas encontram-se abaixo do limite de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$, recomendado pela legislação ambiental brasileira para águas de classe II. Fatores climáticos podem afetar fortemente a entrada, biodisponibilidade e bioacumulação de metais (Beltrame et al., 2010; Kerambrun et al., 2013). O presente trabalho desenvolveu-se durante o período de março (outono) a julho (inverno), que compreende as estações mais secas do ano nesta região. No entanto, o mês de julho foi atipicamente o mais chuvoso de todo o período experimental, com precipitação mensal de 345,9 mm, de acordo com os dados do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR (dados não apresentados), que pode ter promovido um efeito de diluição de alguns metais na água como o Cr e o Ni, ao passo que o aporte de outros metais como o Cd e o Pb pode ter ocorrido.

Por outro lado, o sedimento de ambos os locais de exposição apresentou concentrações de metais mais elevadas que as da água, como já era esperado, uma vez que o sedimento atua como reservatório de contaminantes que podem persistir no meio aquático durante décadas. Entretanto, mudanças no sedimento e na química da água permitem que esses contaminantes persistentes entrem na cadeia alimentar e, assim, nos tecidos animais, como nos tecidos dos peixes (Kirby, 2001). De maneira geral as concentrações de Cu, Cr, Cd, Ni e Zn foram maiores no sedimento coletado no local EXP em relação aqueles provenientes do local REF. O local EXP apresenta uma forte atividade agrícola e as impurezas de fertilizantes e agrotóxicos representam sua principal fonte de metais. Malhat (2011) destaca que as práticas agrícolas constituem uma das mais importantes fontes não pontuais de poluentes metálicos. A redução da vegetação ripária

no local EXP também pode ser um fator agravante, pois facilita *runoffs* de contaminantes para o ambiente aquático.

No presente trabalho, as maiores concentrações dos principais metais detectados (Cu, Cr e Cd) foram observadas no fígado, seguido pelo cérebro e rim e as menores concentrações encontradas no músculo e brânquias. Diversos trabalhos, com diferentes espécies de peixes, documentam que as maiores concentrações de metais ocorrem no fígado devido à sua grande produção de metalotioneínas (MT), que podem efetivamente se ligar aos metais. A indução de MT no fígado de peixes expostos ao Cu, Cd e Zn é um efeito descrito na literatura (Al-Yousuf et al., 2000; Canli e Atli 2003; Dural et al., 2007; Heidary et al., 2012; Mortazavi e Sharifian 2012; El-Moselhy et al. 2014). Além disso, o fígado é um órgão de acumulação contínua, biotransformação e desintoxicação e a resposta a poluentes ambientais é mais rápida (Jarić et al., 2011; Weber et al. 2013; Ghisi et al., 2016). Os músculos têm a menor capacidade de bioacumular metais, embora Al-Yousuf et al. (2000) descobriram que geralmente a acumulação de metais na pele é menor comparado com os músculos.

As brânquias foram o segundo órgão que apresentou as menores concentrações dos metais analisados neste trabalho, possivelmente em decorrência das baixas concentrações de metais dissolvidos na água nos locais de exposição destes peixes. Apesar das baixas concentrações de metais encontradas nas brânquias, estas constituem uma importante rota de troca de íons metálicos ou adsorção de metais a partir da água, ou seja, representam um dos caminhos críticos para a entrada de metais em peixes, pois possuem uma grande área de superfície que facilita a rápida difusão de metais tóxicos (Canli e Atli, 2003; Dural et al. 2007; El-Moselhy et al. 2014) e desta forma, constituem um órgão vulnerável aos efeitos de metais, mesmo estes não sendo acumulados neste órgão. Em outras palavras, as brânquias são o local de captação de íons a partir da água, onde as concentrações de metais aumentam especialmente no início da exposição, antes do metal entrar e ser transportado para outras partes do organismo (Dural et al., 2007). Entretanto, as brânquias de *P. lineatus* mantidos no local EXP acumularam níveis maiores de Cu ao longo dos 120 dias de exposição *in situ* em comparação aos peixes confinados em REF e, portanto, contribuíram de forma significativa para as diferenças observadas no nível total de metais entre os peixes EXP e REF. O cobre é um elemento importante para os peixes

devido às suas interações com proteínas e enzimas para síntese de hemoglobina. No entanto, também pode ter efeitos tóxicos em altas concentrações (Grosell, 2012; Wood, 2012). Seu uso extensivo para o controle de pragas agrícolas (Wei e Yang 2015, Carvalho et al., 2015) e as maiores concentrações detectadas no sedimento dos locais de exposição explica parcialmente sua ocorrência nos tecidos de peixes analisados. O fígado dos curimbas apresentou níveis elevados de Cu, comparado a outros metais e outros tecidos. Como já levantado, o Cu é um dos metais mais abundantes em práticas agrícolas ao redor do mundo (Jiao et al., 2012), e suas concentrações mais elevadas, em relação aos outros metais no sedimento dos locais investigados, contribuem com estes resultados, além é claro, das características intrínsecas do fígado, já discutidas anteriormente.

O segundo metal mais abundante nos diferentes tecidos de *P. lineatus* foi o Cr, que é um elemento essencial que desempenha um papel crítico no metabolismo da glicose, afetando os peixes em altas concentrações (Velma, 2009; Krishna et al., 2014). Este metal pode reduzir a expectativa de vida e impactar negativamente o crescimento e a reprodução dos peixes (Outridge e Scheuhammer 1993). O cromo está presente em vários fertilizantes agrícolas (Watanabe, 1984), e sua presença nos tecidos dos peixes é provavelmente devido ao uso intenso de agrotóxicos e fertilizantes na área ao redor dos corpos hídricos da região.

Outros metais foram detectados em níveis bem menores nos diferentes órgãos, como o Ni, o Pb e o Cd. O Ni é um micronutriente essencial para a maioria dos organismos aquáticos; porém, em altas concentrações, pode ser prejudicial devido a seus efeitos mutagênicos e genotóxicos (Bielmyer et al., 2013; Palermo et al., 2015). O músculo apresentou as maiores concentrações de Ni em relação aos outros órgãos, em contraste com outros trabalhos que demonstram que o tecido muscular foi o que menos acumulou o metal (Vinodhini e Narayanan, 2008; Malik et al., 2010; Palermo et al., 2015). Estas divergências podem estar relacionadas com o tempo de exposição dos animais, que foram maiores no presente trabalho, e a toxicocinética deste metal em *P. lineatus*, indicando a possível mobilização do Ni para o tecido muscular em tempos mais prolongados de exposição. A proporção de Pb encontrada na brânquia e no músculo de *P. lineatus* também foi maior do que nos outros tecidos e também pode ser decorrente da absorção via epitélio branquial e da toxicocinética do metal. Um aumento temporal nas concentrações de Pb na água, em maior proporção no local EXP, pode estar relacionado com as maiores concentrações deste metal nas brânquias, já que esta encontra-se em contato direto com

a água. Lombardi et al. (2010) estudando *P. lineatus* residentes de áreas contaminadas, encontraram concentrações elevadas de Pb nas brânquias, demonstrando que, mesmo após exposição crônica, a superfície branquial permanece alvo do metal. O Pb também é altamente tóxico para peixes e não tem papel biológico conhecido, podendo danificar órgãos, promover efeitos carcinogênicos (Kosanovic et al., 2007; Velusamy et al., 2014), além de afetar a osmorregulação de peixes dulcícolas (Rogers e Wood, 2004; Alves e Wood, 2006; Patel et al., 2006; Ribeiro et al., 2014). Em teleósteos dulcícolas expostos ao Cd dissolvido na água o acúmulo ocorre inicialmente nas brânquias, enquanto a exposição crônica resulta em maior acúmulo nos órgãos de detoxificação como fígado e o rim (Brown et al., 1986; Cinier et al., 1999; Hollis et al., 2001), assim como constatado neste trabalho, no qual os peixes apresentaram as maiores concentrações de Cd no rim e no fígado. O Cd não tem papel biológico conhecido e é considerado um dos metais mais tóxicos mesmo em níveis baixos, podendo causar danos ao material genético de peixes (Ahmed et al., 2010; Pereira et al., 2016). Por ter uma maior toxicidade, o Cd apresenta maiores riscos ecológicos do que outros metais (Fu et al. 2009; Effendi et al., 2016).

As comparações das concentrações dos metais detectados nos diferentes órgãos de *P. lineatus* neste trabalho com outros dados da literatura são bastante difíceis, pois a bioacumulação de metais nos organismos aquáticos é altamente dependente da espécie e é afetada pelas características físico-químicas do ambiente que influenciam a biodisponibilidade e, portanto, a acumulação resultante (Peakall e Burger 2003). O acúmulo de metais é resultado da diferença entre as taxas de absorção e eliminação dos elementos (Cinier et al., 1999). Adicionalmente, a distribuição dos metais entre os diferentes órgãos do peixe também é difícil de prever. Sekhar et al. (2003) relataram níveis mais altos de Cd, Cu, Pb e Zn em brânquias de três diferentes espécies de peixes do que os valores encontrados no fígado. Ao contrário, os níveis de Cd, Cu e Pb no fígado foram maiores do que nas brânquias de várias espécies de peixes de profundidade (Mormède e Davies, 2001). Em outras espécies detritívoras, as brânquias apresentaram valores mais baixos de Cu que o fígado (Fernandes et al., 2007). Lombardi et al. (2010) também observaram níveis superiores de Cd e Cu no fígado de *P. lineatus*, em relação aos observados nas brânquias. Nossos resultados reforçam o argumento de que o fígado dos curimbas representa um local de armazenamento para vários metais, e as concentrações podem, portanto, refletir um histórico de exposição de longo prazo (Schmitt et al., 2007).

Por outro lado, o acúmulo de metais em brânquias ao longo do tempo de exposição pode refletir as concentrações atuais dos metais biodisponíveis na fase aquosa (Frag et al., 1998).

Apesar das maiores concentrações de metais encontradas no local EXP, os peixes confinados por 120 dias nestes locais não apresentaram uma maior bioacumulação em relação aos animais confinados em REF, com exceção das brânquias. Um dos fatores que pode estar relacionados com este resultado é o aumento do tamanho dos peixes ao longo do período experimental (Capítulo IV- Vieira, 2018), que promoveria um efeito inverso na acumulação destes metais no organismo (Gašpić et al., 2002; Ndimele et al., 2009). Uma relação inversa entre os níveis de metais e o peso corporal foi observada em *O. niloticus* e pode ser decorrente da alta taxa metabólica e mecanismos de neutralização de metais tóxicos desenvolvidos em peixes (Gašpić et al., 2002). Além disso, se a taxa de crescimento de um organismo exceder a taxa de acumulação do metal, o nível de metais no organismo variará inversamente com o peso e a idade, mesmo se a concentração geral de metal estiver aumentando (Gašpić et al., 2002). Nussey et al. (2000) verificaram que a bioacumulação de Cr, Mn, Ni e Pb diminui conforme o aumento em tamanho do peixe *Labeo umbratus*. Widianarko et al. (2000) investigaram a relação entre as concentrações de Pb, Zn, Cu e o tamanho do peixe *Poecilia reticulata* e encontraram uma diminuição nas concentrações de Pb com o aumento do tamanho destes animais. Os mesmos autores indicam que as concentrações de Cu e Zn são reguladas e mantidas em certa concentração dentro do organismo. Similarmente, Liang et al. (1999) estudaram as concentrações de Zn, Cu, Cd, Pb e Ni em várias espécies de peixes em sistemas de policultivo e verificaram também que as concentrações de metais, com poucas exceções, foram negativamente correlacionadas com o tamanho e sugeriram que o metabolismo dos metais em peixes desempenha um papel importante na bioacumulação destes nos tecidos corpóreos. Portanto, os resultados deste estudo também podem levar a hipótese de que as concentrações de metais nos dois locais de exposição estão em níveis suficientemente baixos de modo que os peixes puderam controlar seus níveis teciduais ao longo do crescimento. No entanto, a diluição das concentrações de metais nos tecidos devido ao crescimento e/ou redução da atividade metabólica em indivíduos em crescimento pode não ser observada se as concentrações de metal na água forem superiores à capacidade de diluição. Neste caso, continua a ocorrer acumulação de metais e podem ser observadas

relações positivas entre o tamanho do animal e as concentrações de metal nos tecidos. No presente trabalho, a brânquia dos peixes mantidos em EXP apresentou um aumento na concentração total de metais, com grande contribuição do Cu, ao longo do tempo experimental e estes resultados podem estar relacionados com o aumento da área de superfície de absorção a partir da água e com as altas concentrações de Cu no local experimental, especialmente no sedimento que pode eventualmente liberar mais Cu para fase aquosa.

As brânquias constituem uma superfície de contato direto do peixe com o meio, e a exposição a contaminantes ambientais faz com que as mesmas também funcionem como um local de absorção de contaminantes (Cerqueira e Fernandes, 2002; Martinez et al., 2004; Evans et al., 2005; Camargo e Martinez, 2006; Crafford e Avenant-Oldewage, 2010). Metais, assim como outros poluentes ambientais, são bastante estudados pela capacidade que os mesmos têm de afetar as brânquias (Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Evans et al., 2005). A exposição a xenobióticos leva a prejuízos na absorção de íons, por exemplo por aumento na permeabilidade branquial (Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Cerqueira e Fernandes, 2002; Martinez et al., 2004; Camargo e Martinez, 2006). O aumento da permeabilidade branquial pode ser a causa da incapacidade de absorção de sais ou do ganho excessivo de água (Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Evans et al., 2005), que resultou na redução na osmolalidade nos peixes confinados no local EXP após 15 e 60 dias, possivelmente relacionada com a diminuição do Na^+ neste último tempo de exposição. Adicionalmente, os metais podem interferir nas enzimas branquiais envolvidas na absorção de íons, como por exemplo, a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, reduzindo a concentração de sódio no plasma (Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Cerqueira e Fernandes, 2002; Martinez et al., 2004; Camargo e Martinez, 2006; Parvez et al., 2006). Entretanto, a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nestes animais mostrou-se inalterada após 60 dias de confinamento. Assim, a diminuição do Na^+ pode estar relacionada com um aumento da permeabilidade iônica do epitélio branquial, resultando em um efluxo de íons por vias paracelulares, como um efeito de metais sobre a instabilidade das junções oclusivas do epitélio branquial (Rogers et al., 2005; Mager et al., 2012).

Alterações nas concentrações plasmáticas de Ca^{2+} e Mg^{2+} e na osmolalidade em *P. lineatus* confinados no local EXP, em diferentes tempos de exposição, podem ter relação com os maiores níveis de metais na brânquia e no sedimento deste local e com as respostas

de estresse adaptativas. Um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de Ca^{2+} foi observado nos peixes confinados no local EXP, após 5 e 15 dias, indicando uma regulação deste íon no animal. A homeostase do Ca^{2+} em teleósteos dulcícolas ocorre, em parte, através da aquisição do Ca^{2+} do ambiente circundante. De particular importância é o movimento transbranquial de Ca^{2+} que é um fenômeno bem estudado e que se acredita ocorrer principalmente em todas as células ricas em mitocôndrias (CRM) de brânquias de peixes (Marshall 2002, Evans et al., 2005). As taxas de influxo de Ca^{2+} demonstraram alterações como resultado de várias perturbações ambientais, sendo a aclimação de peixes a águas pobres em cálcio um estímulo particularmente efetivo (Perry e Wood 1985, McCormick et al., 1992). A diminuição das concentrações de Ca^{2+} no ambiente aumenta a abundância de CRM (Perry e Wood 1985, McCormick et al., 1992), uma resposta que parece ser pelo menos parcialmente mediada por níveis elevados de cortisol circulante (Perry e Wood, 1985). Menores concentrações de Ca^{2+} possivelmente são encontradas no local EXP, em comparação à REF, refletindo nos menores valores de dureza da água determinadas neste local (Cap.II – Vieira, 2018). Em REF, a dureza média da água ao longo do tempo experimental foi de $43,54 \pm 1,94 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, enquanto em EXP, o valor médio foi $36,51 \pm 1,20 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$. Kelly e Wood (2008) verificaram o papel hipercalcêmico do cortisol em epitélio branquial de truta arco-íris e verificaram que o hormônio estimula a absorção ativa de Ca^{2+} pelas CRM e pelas células pavimentosas. Desta forma, a hipercalcemia observada em *P. lineatus* pode ser decorrente da aclimação destes peixes em água com uma menor concentração de Ca^{2+} em tempos curtos de exposição. Adicionalmente, respostas secundárias de estresse, como o aumento dos parâmetros sanguíneos e hiperglicemia, também foram observados em *P. lineatus* confinados no local EXP (Cap. III – Vieira, 2018) nestes mesmos tempos de exposição, que podem indicar um aumento do nível de cortisol na circulação. Em contrapartida, nos tempos mais prolongados de exposição foi observado uma resposta hipocalcêmica nos peixes mantidos no local EXP. Os maiores níveis de metais encontrados na brânquia de *P. lineatus* confinados no local EXP após 120 dias de exposição, em destaque para o Cu e Pb, podem ter relação com a hipocalcemia e podem estar relacionados com a redução da absorção de cálcio, como um efeito dos metais na enzima $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$. Metais podem alterar a $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ através da ligação com seus grupamentos funcionais ou pelo deslocamento dos metais constitutivos associados à enzima (Viarengo, 1989). Geralmente a exposição de peixes a metais causa redução da atividade ATPásica,

porém, aumentos de atividade podem ser observados em alguns casos, possivelmente como resultado de mecanismos adaptativos (Atli e Canli, 2007; Adiele et al., 2012). Em peixes, o Pb promove redução da Ca^+ ATPase (Rogers e Wood, 2004; Atli e Canli, 2007), assim como o Cd (Verbost et al., 1988, Silva e Martinez, 2014), cujas evidências apontam a inibição da Ca^{2+} ATPase basolateral branquial e consequente hipocalcemia como um dos principais efeitos tóxicos do metal em peixes de água doce (Verbost et al., 1988). Wong e Wong, 2000, demonstraram que a exposição aguda de *Oreochromis mossambicus* ao Cd causaram decréscimos na atividade da Ca^{2+} ATPase e também alterações morfológicas nas CRM. Efeitos semelhantes foram observados em *P. lineatus* expostos por 24 e 96 h ao Cd, com a diminuição da atividade da enzima em ambos os tempos de exposição, com consequente hipocalcemia (Silva e Martinez, 2014). Portanto, a diminuição das concentrações plasmáticas de Ca^{2+} nos peixes expostos ao local EXP, nos tempos mais prolongados de exposição, pode ser decorrente dos maiores níveis de metais encontrados neste ambiente, como o Pb e o Cd, e com o aumento temporal nas suas concentrações ao longo do período experimental.

Por outro lado, o Mg^+ apresentou uma resposta contrária ao Ca^+ , que pode representar um mecanismo compensatório. Um aumento nas concentrações de Mg^+ foram observadas nos peixes mantidos em EXP após 5, 90 e 120 dias de exposição em comparação aos peixes confinados no local REF. Em teleósteos dulcícolas, a maior parte do Mg^{2+} circulante é absorvida pela via alimentar (Flik et al., 1993; Bijvelds et al., 1998; Bucking e Wood, 2007) e sua concentração no plasma é baixa, sendo sua eliminação evitada através da urina por um eficiente sistema de reabsorção tubular (Bijvelds et al., 1998). Entretanto, alguns metais podem interferir na reabsorção tubular de Mg^{2+} , da mesma forma que ocorre com outros íons (Patel et al., 2006). Em *O. niloticus* expostos ao Cu ocorreu um aumento da Mg^{2+} -ATPase renal (Kulac et al., 2013), enquanto Rogers et al. (2003) se depararam com aumentos significativos das concentrações de Mg^{2+} plasmáticos em *O. mykiss* expostas ao Pb por períodos entre 72 e 120 h. A elevação de Mg^{2+} relatada neste último trabalho coincidiu com a hipocalcemia, dando indícios de que exista uma relação de contrabalanço na regulação destes dois cátions divalentes, embora esteja claro que a absorção destes íons ocorra por vias diferentes (Marshall, 2002). Da mesma forma, o aumento da concentração plasmática de Mg^{2+} em *P. lineatus* expostos ao local EXP nos tempos mais prolongados de exposição coincidiu com a redução de Ca^{2+} nestes mesmos tempos. Além disso, sabe-se que

além da via alimentar o Mg^{2+} pode ser absorvido ativamente nas brânquias através de processos ainda não totalmente elucidados (Bijvelds et al., 1998; Marshall, 2002), permitindo supor que esteja ocorrendo uma hiperregulação do Mg^{2+} para contrabalancear a hipocalcemia. Adicionalmente, a atividade da Mg^{2+} -ATPase das brânquias e do rim de *O. niloticus* aumentou após exposição ao Cu (Atli e Canli, 2011a), levando também a hipótese que frente aos diferentes metais, entre eles o Cu, os peixes expostos também sejam capazes de promover tal resposta.

Com relação às enzimas envolvidas na osmorregulação, na brânquia dos peixes confinados no local EXP foi observado uma diminuição da NKA no tempo mais prolongado de exposição, em comparação a tempos mais curtos, e a atividade enzimática também foi menor em comparação ao local REF, após 120 dias de confinamento. Por outro lado, neste mesmo tempo experimental foi observado um aumento da atividade da anidrase carbônica (AC). A NKA é responsável pela geração do gradiente eletroquímico que favorece a entrada de Na^+ pela membrana apical, e a redução de sua atividade deve resultar em alterações na concentração deste íon (Ahern e Morris, 1999; Rogers et al., 2003, 2005; Ribeiro et al., 2014). A inibição desta enzima é um efeito também verificado para o Cu, Zn, Cr, Ag e Cd nas brânquias de *O. niloticus* (Atli e Canli, 2011 a,b) e para o Pb (Ribeiro et al., 2014), Cd (Silva e Martinez, 2014) e Cu (Cerqueira e Fernandes, 2002) em *P. lineatus*, mostrando um marcante efeito dos metais sobre esta enzima. A redução provocada por metais na atividade de ATPases, como NKA, está associada com a interação do contaminante com grupamentos funcionais como carboxil (Ong e Lee, 1980) e sulfidril (Castro-González e Méndez-Armenta, 2008), impedindo a ligação da molécula de ATP ao sítio catalítico da enzima. Por outro lado, os maiores níveis de atividade da NKA observados nos menores tempos de exposição (t5 e t15), em comparação aos tempos mais prolongados e ao nível basal, podem indicar um efeito agudo do aumento do cortisol plasmático em *P. lineatus*, já que este hormônio tem grande importância para a manutenção do equilíbrio hidromineral (Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost, 2003; Evans et al., 2005). Este hormônio aumenta a atividade e expressão da NKA, garantindo os níveis de sódio plasmático (Mommensen et al., 1999; Cerqueira e Fernandes, 2002; Evans et al., 2005; Mancera e McCormick, 2007), corroborando o aumento da calcemia nestes animais.

Diversos poluentes naturais e xenobióticos como, por exemplo, amônia (ArasHisar et al., 2004); metais como Pb (Martinez et al., 2004); Cu e Zn (Cerqueira e Fernandes, 2002),

geram em peixes um quadro de desequilíbrio respiratório, que resulta em acidose metabólica (Henry et al., 1996; Randall e Brauner, 1998; Henry e Swenson, 2000; Georgalis et al., 2006 a,b). A AC é uma enzima abundantemente presente nas brânquias dos peixes e, de extrema importância para processos respiratórios e de equilíbrio ácido-básico. Esses processos são dependentes da reação reversível de hidratação do CO_2 , realizada por essa enzima, a qual produz e fornece prótons (H^+) e bicarbonato (HCO_3^-) utilizados por trocadores de cátions e ânions (Randall e Brauner, 1998; Henry e Swenson, 2000; Evans et al., 2005; Perry e Gilmour, 2006). Essa ativação da AC em vários tecidos em quadros de desequilíbrio respiratório colabora para a prevenção da acidose (Henry, 1996; Randall e Brauner, 1998; Henry e Swenson, 2000). O aumento da AC Em *P. lineatus* confinados *in situ* no local EXP após 120 dias pode estar relacionado com a prevenção da acidose gerada por contaminantes diversos, tais como os metais Cu e Pb.

Outra função primordial exercida pelas brânquias é a manutenção do equilíbrio ácido-base através da extrusão de H^+ (Evans et al., 2005; Marshall e Grosell, 2006). A eliminação de prótons pelas brânquias pode gerar uma mudança no pH do microambiente da região apical das células (Perry e Gilmour, 2006), favorecendo a entrada de Na^+ (Perry e Fryer, 1997; Hirose et al., 2003; Evans et al., 2005). Esta eliminação ocorre via H^+ -ATPases (HA) ou trocadores Na^+/H^+ localizados na membrana apical de todas as células branquiais (Hirose et al., 2003). A redução da HA branquial foi observada nos peixes confinados no local EXP após 30 dias de exposição, entretanto, sem consequências osmo-iônicas imediatas para o animal, uma vez que a hiponatremia foi observada apenas em t60.

Por outro lado, as respostas enzimáticas observadas no rim, são opostas às da brânquia e poderiam compensar os possíveis desajustes osmorregulatórios em virtude das alterações enzimáticas neste órgão. Ao lado das brânquias, o rim posterior desempenha papel importante na hiperregulação iônica e equilíbrio ácido-base em teleosteos de água doce (Perry et al., 2003; Gilmour e Perry, 2009, Martinez, 2017). Um aumento da NKA foi observada nos peixes confinados em EXP, após 60 e 90 dias de exposição em comparação aos outros tempos e aos animais mantidos no local REF. A atividade da HA também aumentou no rim destes peixes após 60, 90 e 120 dias de confinamento. A presença da HA na membrana apical das células com borda em escova dos túbulos proximais (Perry e Fryer, 1997) desempenha um papel importante para a manutenção do equilíbrio ácido-base, junto com as brânquias. Em condições normais, a regulação ácido-base é exercida

prioritariamente pelas brânquias através da excreção de H^+ , com o rim exercendo um papel auxiliar, reabsorvendo o HCO_3^- que é filtrado pelo glomérulo (Perry et al., 2003; Gilmour e Perry, 2009). Entretanto, situações que propiciem desajustes no pH sanguíneo proporcionam uma maior expressão da H^+ -ATPase renal, sugerindo seu envolvimento com a recaptação do HCO_3^- (Perry e Fryer, 1997; Perry et al., 2003). Além disso, a redução da atividade da AC renal em 30 dias de confinamento de *P. lineatus* e a tendência de diminuição em t60 pode causar um prejuízo da regulação ácido-base impedindo a reabsorção tubular deste ânion. Desta forma, a ativação da HA viria contribuir para a compensar esta perda (Perry e Gilmour, 2006) e o prejuízo na regulação ácido-base. O aumento da atividade da NKA no rim, nos tempos mais prolongados de exposição pode ter sido um mecanismo compensatório à redução desta enzima nas brânquias, garantindo uma maior reabsorção de Na^+ , visto que a principal força motriz para a reabsorção tubular de Na^+ está na presença da NKA na membrana basolateral das células dos túbulos renais (Marshall e Grosell, 2006; Martinez, 2017). Nos tempos mais prolongados de exposição, não foram observadas alterações na natremia e tampouco na osmolalidade em *P. lineatus*, indicando uma possível regulação renal.

Em *P. lineatus* expostos *in situ* no local EXP também foram observados danos histológicos na brânquia e nos rins após 15 e 5 dias de exposição, respectivamente. Nas brânquias dos peixes confinados em EXP foram observadas as maiores frequências de hipertrofia epitelial, descolamento epitelial e desarranjo lamelar, comparado aos peixes mantidos em REF. O fato de estar diretamente em contato com a água e com os contaminantes nela presentes pode levar as brânquias a apresentarem alguns sistemas de defesa, a fim de que a distância de difusão entre os xenobióticos e o sangue seja aumentada (Suiçmez et al., 2006). Algumas vezes, essas defesas representam “maladaptações”, dificultando a passagem de oxigênio e íons importantes, podendo ocasionar desequilíbrio osmo-iônico e desequilíbrio ácido-básico (Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Martinez et al., 2004; Evans et al., 2005). Neste trabalho verificou-se que baixas concentrações de contaminantes dissolvidos na água foram capazes de dar início a um processo de anomalias morfológicas no epitélio branquial de *P. lineatus* nos tempos mais curtos de exposição ao local EXP, visto que os animais apresentaram um tendência de aumento no IAH em 5 dias de exposição e um aumento significativo após 15 dias de confinamento. Os valores de IAH se apresentaram abaixo de níveis considerados danosos

à saúde do animal, indicando que as funções branquiais neste estágio não sofreram prejuízos inerentes.

Alterações morfológicas branquiais são inespecíficas, e desta forma, os danos histológicos neste órgão podem ser decorrentes da exposição a outros contaminantes presentes na água, como agrotóxicos de uso atual e organoclorados (Capítulo III – Vieira, 2018). Alguns herbicidas como a atrazina (Neškovic et al., 1993; Alazemi et al., 1996, Paulino et al., 2012a, 2012b) e o 2, 4-D (Neškovic et al., 2008) promoveram alterações morfológicas em brânquias de peixes. Além disso, por serem respostas comuns a uma grande classe de contaminantes, incluindo metais e organoclorados alterações branquiais foram previamente relatados para peixes provenientes de ambientes poluídos (Fernandes et al., 2013; Souza et al., 2013, Paulino et al., 2014; Ghisi et al., 2016; Pérez et al., 2018; Santana et al., 2018).

Em 15 dias de confinamento no local EXP, os peixes apresentaram um aumento significativo no IAH e as alterações mais frequentes foram dessaranjo lamelar, hiperplasia das células epiteliais resultando em fusão de várias lamelas. Este conjunto de alterações está entre as mais frequentemente reportadas para teleósteos dulcícolas expostos a contaminantes (Mallat, 1985). Como já descrito, estas alterações são consideradas respostas de defesa que aumentam a distância entre o sangue do peixe e a água, de forma a reduzir a absorção do contaminante pelo animal (Mallat, 1985; Hinton e Laurén, 1990; Fernandes e Mazon, 2003). Entretanto esse processo aumenta também aumenta a distância de difusão dos gases respiratórios (Fernandes e Mazon, 2003), podendo gerar um desequilíbrio ácido-básico. Neste mesmo tempo experimental, uma tendência no aumento da atividade da AC e NKA também foi observada nestes peixes, que pode indicar uma tentativa de regulação da acidose metabólica em decorrência do aumento da distância de difusão dos gases.

Assim como as brânquias, o rim de teleósteos é um dos primeiros órgãos afetados no caso de exposição a contaminantes, e, portanto, as lesões renais podem ser boas indicadores de poluição ambiental (Cengiz, 2006). Entre as alterações renais mais frequentemente relatadas em peixes expostos à contaminantes estão a degeneração tubular, do tipo granular e hialina, e alterações corpusculares, como dilatação dos capilares e redução do espaço de Bowman (Takashima e Hibiya, 1995). Estas foram as alterações mais frequentes observadas no rim de *P. lineatus* confinados no local EXP, e responsáveis

pelo aumento do IAH nestes animais após 5 dias de confinamento. A degeneração granular pode ser identificada pela hipertrofia das células tubulares e presença de grânulos pequenos no citoplasma, que fica com aspecto de rede (Hinton e Laurén, 1990). Essa alteração representa um estágio inicial do processo degenerativo, que pode progredir para a degeneração hialina, que se caracteriza pela presença de grânulos maiores e eosinófilos dentro das células (Hinton e Laurén, 1990). Tais grânulos podem ser formados dentro das próprias células ou ainda resultarem da reabsorção de excessos de proteína plasmática perdidos pela urina, indicando danos no glomérulo (Hinton e Laurén, 1990; Takashima e Hibiya, 1995).

Outras alterações frequentemente observadas no rim de *P. lineatus*, em maior intensidade nos animais confinados no local EXP, foram a redução do espaço de Bowman, material no interior do túbulo e oclusão da luz tubular. O acúmulo de certos materiais no lúmen dos túbulos proximais ou distais pode levar à oclusão da luz tubular, assim como o aumento no volume das células epiteliais pode resultar na redução do lúmen levando ao estreitamento da luz tubular (Takashima e Hibiya, 1995). Estes tipos de alterações prejudicam a passagem do filtrado, além de comprometer o processo de reabsorção e secreção tubular (Hinton e Laurén, 1990). Estas alterações também foram observadas em peixes da espécie *Barbatula barbatula* coletados em dois ribeirões impactados com agrotóxicos e metais pesados (Schwaiger et al., 1997). A presença de contaminantes no sangue pode levar a algumas mudanças patológicas na cápsula de Bowman, como proliferação anormal das células epiteliais e o espessamento da lâmina basal, levando a redução do espaço de Bowman (Hinton e Laurén, 1990). Esta alteração foi encontrada em *P. lineatus* expostos a concentrações subletais de triclorfon (Veiga et al., 2002), em *Salmo trutta* e *B. barbatula* confinados *in situ* em ribeirões contaminados com agrotóxicos, PCBs, HPAs e metais (Gernhofer et al., 2001).

Assim como as alterações branquiais, alterações renais podem ser decorrentes da exposição a vários contaminantes, indicando que estas lesões também não são específicas a um determinado tipo de estressor. A exposição à metais causa frequentemente distúrbios tubulares e glomerulares como os descritos por Thophon et al. (2003) para *Lates calcarifer* exposta ao Cd, enquanto Handy e Penrice (1993) encontraram principalmente inchaço nas células da cápsula de Bowman e melanomacrófagos no rim de *Salmo trutta* e *O. mossambicus* expostas ao cloreto de mercúrio. A exposição a organoclorados também

promoveu alterações renais em peixes, como em *Labeo rohita* expostos ao hexaclorociclohexano (Das e Mukherjee, 2000), *Mugil sp.*, *C. carpio* e *Barbus sp.* expostos ao lindano (Ortiz et al. 2003); assim como a exposição a piretróides (Cengiz, 2006; Velmurugan et al, 2007).

Apesar das diferentes histopatologias encontradas no rim de *P. lineatus*, os valores de IAH em ambas as situações de confinamento demonstraram a ocorrência de danos moderados a severos, mas que ainda podem ser revertidos. Alterações de estágio III, como necrose não foram observadas nestes animais, o que indica que as funções renais não foram comprometidas, e o órgão parece ter tido um importante papel na manutenção do equilíbrio osmo-iônico a longo prazo, tendo em vista as respostas adaptativas das ATPases renais.

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que o confinamento *in situ* de *P. lineatus* em um ambiente com maior nível de contaminantes, incluindo os metais, promoveu desajustes osmorregulatórios pontuais. Entretanto, em tempos mais prolongados de exposição os animais desenvolveram estratégias visando a manutenção das concentrações iônicas e osmolalidade, possivelmente por meio da indução de enzimas renais. Os baixos níveis de metais presentes no ambiente parecem não ter sido suficientes para promover um acúmulo expressivo nos diferentes tecidos de *P. lineatus*, e as alterações histológicas apresentaram respostas significativas apenas em tempos mais curtos de exposição, e não foram consideradas de grande prejuízo à saúde dos animais. Entretanto, exposições mais prolongadas a misturas complexas de metais e outros contaminantes em ambientes de água doce sobre influência de atividades agrícolas podem levar à ocorrência de danos morfológicos mais severos em órgãos-alvo de peixes, bem como desequilíbrios osmo-iônicos, superando a capacidade do organismo em restabelecer a homeostase.

4.6 REFERÊNCIAS

- Adiele, R. C., Stevens, D., & Kamunde, C. (2012). Differential inhibition of electron transport chain enzyme complexes by cadmium and calcium in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic mitochondria. *Toxicological Sciences*, 127(1), 110-119.
- Ahern, M. D., & Morris, S. (1998). Accumulation of lead and its effects on Na⁺ balance in the freshwater crayfish *Cherax destructor*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 281(4), 270-279.
- Ahmed, M. K., Parvin, E., Arif, M., Akter, M. S., Khan, M. S., & Islam, M. M. (2010). Measurements of genotoxic potential of cadmium in different tissues of fresh water climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch), using the comet assay. *Environmental toxicology and pharmacology*, 30(1), 80-84.
- Alazemi, B. M., Lewis, J. W., & Andrews, E. B. (1996). Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Environmental Technology*, 17(3), 225-238.
- Albuquerque, A. F., Ribeiro, J. S., Kummrow, F., Nogueira, A. J. A., Montagner, C. C., & Umbuzeiro, G. A. (2016). Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 18(7), 779-787.
- Alves, L. C., & Wood, C. M. (2006). The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquatic toxicology*, 78(3), 217-232.
- Al-Yousuf, M. H., El-Shahawi, M. S., & Al-Ghais, S. M. (2000). Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. *Science of the total environment*, 256(2-3), 87-94.
- ArasHisar, Ş., Hisar, O., Yanık, T., & Aras, S. M. (2004). Inhibitory effects of ammonia and urea on gill carbonic anhydrase enzyme activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17(3), 125-128.
- Atli, G., & Canli, M. (2011). Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology*, 20(8), 1861-1869.
- Atli, G., & Canli, M. (2013). Metals (Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺) affect ATPase activity in the gill, kidney, and muscle of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures. *Environmental toxicology*, 28(12), 707-717.
- Beltrame, M. O., De Marco, S. G., & Marcovecchio, J. E. (2010). Influences of sex, habitat, and seasonality on heavy-metal concentrations in the burrowing crab (*Neohelice granulata*) from a coastal lagoon in Argentina. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 58(3), 746-756.
- Bielmyer, G. K., DeCarlo, C., Morris, C., & Carrigan, T. (2013). The influence of salinity on acute nickel toxicity to the two euryhaline fish species, *Fundulus heteroclitus* and

- Kryptolebias marmoratus*. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(6), 1354-1359.
- Bijvelds, M. J., Velden, J. A., Kolar, Z. I., & Flik, G. (1998). Magnesium transport in freshwater teleosts. *Journal of Experimental Biology*, 201(13), 1981-1990.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brasil, 2005. Resolution No. 357/2005. CONAMA, Environmental National Council. [http://http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459](http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459).
- Brown, M. W., Thomas, D. G., Shurben, D., Solbe, J. F., Kay, J., & Cryer, A. (1986). A comparison of the differential accumulation of cadmium in the tissues of three species of freshwater fish, *Salmo gairdneri*, *Rutilus rutilus* and *Noemacheilus barbatulus*. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, 84(2), 213-217.
- Bucking, C., & Wood, C. M. (2007). Gastrointestinal transport of Ca^{2+} and Mg^{2+} during the digestion of a single meal in the freshwater rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology B*, 177(3), 349-360.
- Camargo, M. M., Fernandes, M. N., & Martinez, C. B. (2009). How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, 94(1), 40-46.
- Camargo, M. M., & Martinez, C. B. (2006). Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental toxicology and pharmacology*, 21(1), 61-69.
- Camargo, M. M., & Martinez, C. B. (2007). Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical ichthyology*, 5(3), 327-336.
- Canli, M., & Atli, G. (2003). The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental pollution*, 121(1), 129-136.
- Capkin, E., Altinok, I., & Karahan, S. (2006). Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. *Chemosphere*, 64(10), 1793-1800.
- Capkin, E., Birincioglu, S., & Altinok, I. (2009). Histopathological changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to sublethal composite nitrogen fertilizers. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(7), 1999-2004.
- Carvalho, C.S., Bernusso, V. A., & Fernandes, M. N. (2015). Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). *Aquatic Toxicology*, 167, 220-227.
- Castro-González, M. I., & Méndez-Armenta, M. (2008). Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environmental toxicology and pharmacology*, 26(3), 263-271.

- Cengiz, E. I. (2006). Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22(2), 200-204.
- Cerqueira, C. C., & Fernandes, M. N. (2002). Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52(2), 83-91.
- Cinier, C.C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., & Bouvet, Y. (1999). Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122(3), 345-352.
- Crafford, D., & Avenant-Oldewage, A. (2010). Bioaccumulation of non-essential trace metals in tissues and organs of *Clarias gariepinus* (sharptooth catfish) from the Vaal River system—strontium, aluminium, lead and nickel. *Water Sa*, 36(5).
- Das, B. K., & Mukherjee, S. C. (2000). A histopathological study of carp (*Labeo rohita*) exposed to hexachlorocyclohexane. *Veterinarski Arhiv*, 70(4), 169-180.
- Dural, M., Göksu, M. Z. L., & Özak, A. A. (2007). Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food chemistry*, 102(1), 415-421.
- Effendi, H., Kawaroe, M., & Lestari, D. F. (2016). Ecological risk assessment of heavy metal pollution in surface sediment of Mahakam Delta, East Kalimantan. *Procedia Environmental Sciences*, 33, 574-582.
- El-Moselhy, K. M., Othman, A. I., El-Azem, H. A., & El-Metwally, M. E. A. (2014). Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(2), 97-105.
- Evans, D. H. (1987). The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 71, 47.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85(1), 97-177.
- Farag, A. M., Woodward, D. F., Goldstein, J. N., Brumbaugh, W., & Meyer, J. S. (1998). Concentrations of metals associated with mining waste in sediments, biofilm, benthic macroinvertebrates, and fish from the Coeur d'Alene River Basin, Idaho. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34(2), 119-127.
- Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., & Salgado, M. A. (2007). Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz–Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and environmental safety*, 66(3), 426-431.
- Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Rocha, E., & Salgado, M. A. (2008). Monitoring pollution in Esmoriz–Paramos lagoon, Portugal: Liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. *Environmental monitoring and assessment*, 145(1-3), 315-322.

- Fernandes, M.N., Mazon, A.F. (2003). Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Adaptations*. Science Publishers, Enfield, pp. 203–231.
- Fernandes, M. N., Paulino, M. G., Sakuragui, M. M., Ramos, C. A., Pereira, C. D. S., & Sadauskas-Henrique, H. (2013). Organochlorines and metals induce changes in the mitochondria-rich cells of fish gills: an integrative field study involving chemical, biochemical and morphological analyses. *Aquatic toxicology*, *126*, 180-190.
- Flik, G., Van Der Velden, J. A., Dechering, K. J., Verbost, P. M., Schoenmakers, T. J., Kolar, Z. I., & Bonga, S. E. W. (1993). Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: a review. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, *265*(4), 356-365.
- Fu, C., Guo, J., Pan, J., Qi, J., & Zhou, W. (2009). Potential ecological risk assessment of heavy metal pollution in sediments of the Yangtze River within the Wanzhou Section, China. *Biological trace element research*, *129*(1-3), 270-277.
- Gašpić, Z. K., Zvonarić, T., Vrgoč, N., Odžak, N., & Barić, A. (2002). Cadmium and lead in selected tissues of two commercially important fish species from the Adriatic Sea. *Water Research*, *36*(20), 5023-5028.
- Georgalis, T., Gilmour, K. M., Yorston, J., & Perry, S. F. (2006). Roles of cytosolic and membrane-bound carbonic anhydrase in renal control of acid-base balance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *291*(2), F407-F421.
- Georgalis, T., Perry, S. F., & Gilmour, K. M. (2006). The role of branchial carbonic anhydrase in acid-base regulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, *209*(3), 518-530.
- Gernhöfer, M., Pawert, M., Schramm, M., Müller, E., & Triebkorn, R. (2001). Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, *8*(3-4), 241-260.
- Ghisi, N. C., Oliveira, E. C., Mota, T. F. M., Vanzetto, G. V., Roque, A. A., Godinho, J. P., ... & Prioli, A. J. (2016). Integrated biomarker response in catfish *Hypostomus ancistroides* by multivariate analysis in the Pirapó River, southern Brazil. *Chemosphere*, *161*, 69-79.
- Gibbs, A. L. L. E. N., & Somero, G. N. (1989). Pressure adaptation of Na^+/K^+ -ATPase in gills of marine teleosts. *Journal of Experimental Biology*, *143*(1), 475-492.
- Gilmour, K. M., & Perry, S. F. (2009). Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. *Journal of Experimental Biology*, *212*(11), 1647-1661.
- Gimeno-García, E., Andreu, V., & Boluda, R. (1996). Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environmental pollution*, *92*(1), 19-25.

- Grosell, M. (2012). Copper. In: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.). *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals—Fish Physiology*. Elsevier, San Diego, CA, pp. 54–135.
- Handy, R. D., & Penrice, W. S. (1993). The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 106(3), 717-724.
- Heidary, S., Imanpour Namin, J., & Monsefrad, F. (2012). Bioaccumulation of heavy metals Cu, Zn, and Hg in muscles and liver of the stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) in the Caspian Sea and their correlation with growth parameters. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11(2), 325-337.
- Henry, R. P. (1996). Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annual review of physiology*, 58(1), 523-538.
- Henry, R. P., & Swenson, E. R. (2000). The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Respiration physiology*, 121(1), 1-12.
- Hinton, D. E., Laurén, D. J. (1990). Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *American Fisheries Society Symposium*, 8, 51- 66.
- Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., & Takei, Y. (2003). Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(4), 593-620.
- Hollis, L., Hogstrand, C., & Wood, C. M. (2001). Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(4), 468-474.
- Jabeen, F., & Chaudhry, A. S. (2010). Environmental impacts of anthropogenic activities on the mineral uptake in *Oreochromis mossambicus* from Indus River in Pakistan. *Environmental monitoring and assessment*, 166(1-4), 641-651.
- Jarić, I., Višnjić-Jeftić, Ž., Cvijanović, G., Gačić, Z., Jovanović, L., Skorić, S., & Lenhardt, M. (2011). Determination of differential heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES. *Microchemical Journal*, 98(1), 77-81.
- Jiao, W., Chen, W., Chang, A. C., & Page, A. L. (2012). Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. *Environmental Pollution*, 168, 44-53.
- Kelly, S. P., & Wood, C. M. (2008). Cortisol stimulates calcium transport across cultured gill epithelia from freshwater rainbow trout. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 44(3), 96-104.

- Kerambrun, E., Henry, F., Cornille, V., Courcot, L., & Amara, R. (2013). A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere*, *91*(4), 498-505.
- Kirby, J., Maher, W., & Harasti, D. (2001). Changes in selenium, copper, cadmium, and zinc concentrations in mullet (*Mugil cephalus*) from the southern basin of Lake Macquarie, Australia, in response to alteration of coal-fired power station fly ash handling procedures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *41*(2), 171-181.
- Kosanovic, M., Hasan, M. Y., Subramanian, D., Al Ahbabi, A. A. F., Al Kathiri, O. A. A., Aleassa, E. M. A. A., & Adem, A. (2007). Influence of urbanization of the western coast of the United Arab Emirates on trace metal content in muscle and liver of wild Red-spot emperor (*Lethrinus lentjan*). *Food and chemical toxicology*, *45*(11), 2261-2266.
- Krishna, P. V., Rao, K. M., Swaruparani, V., & Rao, D. S. (2014). Heavy Metals Concentration in Fish *Mugil cephalus* from Machilipatnam Coast and Possible Health Risks to Fish Consumers. *Br Biotechnol J* *4*(2):126–133.
- Kulac, B., Atli, G., & Canli, M. (2013). Response of ATPases in the osmoregulatory tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus* exposed to copper in increased salinity. *Fish physiology and biochemistry*, *39*(2), 391-401.
- Liang, Y., Cheung, R. Y. H., & Wong, M. H. (1999). Reclamation of wastewater for polyculture of freshwater fish: bioaccumulation of trace metals in fish. *Water Research*, *33*(11), 2690-2700.
- Lombardi, P. E., Peri, S. I., & Guerrero, N. R. V. (2010). ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, *73*(7), 1704-1711.
- Malhat, F. (2011). Distribution of heavy metal residues in fish from the River Nile tributaries in Egypt. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *87*(2), 163-165.
- Malik, N., Biswas, A. K., Qureshi, T. A., Borana, K., & Virha, R. (2010). Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bhopal. *Environmental Monitoring and Assessment*, *160*(1-4), 267.
- Mallatt, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *42*(4), 630-648.
- Mancera, J. M., & McCormick, S. D. (2007). Role of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol in teleost osmoregulation. *Fish Osmoregulation*, 497-515.
- Marijić, V. F., & Raspor, B. (2014). Relevance of biotic parameters in the assessment of the spatial distribution of gastrointestinal metal and protein levels during spawning period of European chub (*Squalius cephalus* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(12), 7596-7606.
- Marshall, W. S. (2002). Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, *293*(3), 264-283.

- Marshall, W. S., & Grosell, M. (2006). Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. *The physiology of fishes*, 3, 177-230.
- Martinez, C. B. R., Nagae, M. Y., Zaia, C. T. B. V., & Zaia, D. A. M. (2004). Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Brazilian Journal of Biology*, 64(4), 797-807.
- Martinez, C.B.R. (2017) The kidney. *Encyclopedia of Fish Physiology - Reference Module in Life Sciences*. Elsevier.
- McCormick, S. D., Hasegawa, S., & Hirano, T. (1992). Calcium uptake in the skin of a freshwater teleost. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(8), 3635-3638.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3), 211-268.
- Mormede, S., & Davies, I. M. (2001). Heavy metal concentrations in commercial deep-sea fish from the Rockall Trough. *Continental Shelf Research*, 21(8-10), 899-916.
- Mortazavi, M. S., & Sharifian, S. (2011). Mercury bioaccumulation in some commercially valuable marine organisms from Mosa Bay, Persian Gulf. *International journal of environmental research*, 5(3), 757-762.
- Mozeto, A. A. (2004). Sedimentos e particulados lacustres: amostragens e análises biogeoquímicas. *Amostragem em Limnologia. São Carlos: RiMa*, 295-320.
- Ndimele, P. E., Jenyo-Oni, A., & Jibuike, C. C. (2009). The levels of lead (Pb) in water, sediment and a commercially important fish species (*Chrysichthys nigrodigitatus*) (Lacepede 1803) from Ologe Lagoon, Lagos, Nigeria. *Journal of Environmental Extension*, 8(1).
- Neskovic, N. K., Elezovic, I., Karan, V. E. S. E. L. A., Poleksic, V., & Budimir, M. (1993). Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 25(2), 173-182.
- Neškovid, N. K., Karan, V., Elezović, I., Poleksić, V., & Budimir, M. (1994). Toxic effects of 2, 4-D herbicide on fish. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 29(2), 265-279.
- Nussey, H. H. (2000). Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. *Water Sa*, 26(2), 269-284.
- OCDE – FAO (2015). Capítulo 2. Agricultura brasileira: Perspectivas e Desafios. In: *Perspectivas agrícolas 2015 – 2024*. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en. Acesso em: 02 de jan. 2018.
- Ong, C. N., & Lee, W. R. (1980). Interaction of calcium and lead in human erythrocytes. *Occupational and Environmental Medicine*, 37(1), 70-77.
- Ortiz, J. B., De Canales, M. L. G., & Sarasquete, C. (2003). Histopathological changes induced by lindane (γ -HCH) in various organs of fishes. *Scientia Marina*, 67(1), 53-61.

- Outridge, P. M., & Scheuhammer, A. M. (1993). Bioaccumulation and toxicology of chromium: implications for wildlife. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 31-77). Springer, New York, NY.
- Palermo, F. F., Risso, W. E., Simonato, J. D., & Martinez, C. B. (2015). Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, *116*, 19-28.
- Parvez, S., Sayeed, I., & Raisuddin, S. (2006). Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. *Ecotoxicology and environmental safety*, *65*(1), 62-66.
- Patel, M., Rogers, J. T., Pane, E. F., & Wood, C. M. (2006). Renal responses to acute lead waterborne exposure in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, *80*(4), 362-371.
- Paulino, M. G., Benze, T. P., Sadauskas-Henrique, H., Sakuragui, M. M., Fernandes, J. B., & Fernandes, M. N. (2014). The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. *Science of the Total Environment*, *497*, 293-306.
- Paulino, M. G., Sakuragui, M. M., & Fernandes, M. N. (2012). Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, *86*(1), 1-7.
- Paulino, M. G., Souza, N. E. S., & Fernandes, M. N. (2012). Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, *80*, 6-13.
- Peakall, D., & Burger, J. (2003). Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *56*(1), 110-121.
- Pereira, L. S., Ribas, J. L. C., Vicari, T., Silva, S. B., Stival, J., Baldan, A. P., ... & de Assis, H. S. (2016). Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. *Ecotoxicology and environmental safety*, *130*, 29-36.
- Pérez, M. R., Rossi, A. S., Bacchetta, C., Elorriaga, Y., Carriquiriborde, P., & Cazenave, J. (2018). In situ evaluation of the toxicological impact of a wastewater effluent on the fish *Prochilodus lineatus*: biochemical and histological assessment. *Ecological Indicators*, *84*, 345-353.
- Perry, S. F., & Fryer, J. N. (1997). Proton pumps in the fish gill and kidney. *Fish Physiology and Biochemistry*, *17*(1-6), 363-369.
- Perry, S. F., & Gilmour, K. M. (2006). Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Respiratory physiology & neurobiology*, *154*(1-2), 199-215.
- Perry, S. F., & Wood, C. M. (1985). Kinetics of branchial calcium uptake in the rainbow trout: effects of acclimation to various external calcium levels. *Journal of Experimental Biology*, *116*(1), 411-433.

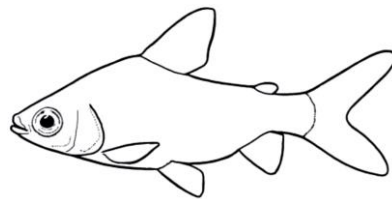
- Perry, S. F., Shahsavarani, A., Georgalis, T., Bayaa, M., Furimsky, M., & Thomas, S. L. Y. (2003). Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 300(1), 53-62.
- Poleksić, V., & Mitrović-Tutundžić, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Oxford: Fishing News Books, 339-52.
- Randall, D. J., & Brauner, C. (1998). Interactions between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119(1), 3-8.
- Ribeiro, A. M., Risso, W. E., Fernandes, M. N., & Martinez, C. B. (2014). Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. *Fish physiology and biochemistry*, 40(3), 645-657.
- Ribeiro, C. O., Vollaire, Y., Sanchez-Chardi, A., & Roche, H. É. L. È. N. E. (2005). Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, 74(1), 53-69.
- Rogers, J. T., & Wood, C. M. (2004). Characterization of branchial lead-calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of experimental biology*, 207(5), 813-825.
- Rogers, J. T., Patel, M., Gilmour, K. M., & Wood, C. M. (2005). Mechanisms behind Pb-induced disruption of Na⁺ and Cl⁻ balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(2), 463-472.
- Rogers, J. T., Richards, J. G., & Wood, C. M. (2003). Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, 64(2), 215-234.
- Santana, M. S., Yamamoto, F. Y., Sandrini-Neto, L., Neto, F. F., Ortolani-Machado, C. F., Ribeiro, C. A. O., & Prodocimo, M. M. (2018). Diffuse sources of contamination in freshwater fish: Detecting effects through active biomonitoring and multi-biomarker approaches. *Ecotoxicology and environmental safety*, 149, 173-181.
- Schmitt, C. J., Brumbaugh, W. G., & May, T. W. (2007). Accumulation of metals in fish from lead-zinc mining areas of southeastern Missouri, USA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(1), 14-30.
- Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., & Triebkorn, R. (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6(1), 75-86.
- Silva, A. O., & Martinez, C. B. (2014). Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. *Aquatic toxicology*, 156, 161-168.

- Souza-Bastos, L. R., Bastos, L. P., Carneiro, P. C. F., Guiloski, I. C., de Assis, H. C. S., Padial, A. A., & Freire, C. A. (2017). Evaluation of the water quality of the upper reaches of the main Southern Brazil river (Iguaçu river) through in situ exposure of the native siluriform *Rhamdia quelen* in cages. *Environmental Pollution*, *231*, 1245-1255.
- Souza, I. C., Duarte, I. D., Pimentel, N. Q., Rocha, L. D., Morozesk, M., Bonomo, M. M., ... & Matsumoto, S. T. (2013). Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. *Environmental pollution*, *180*, 136-144.
- Suiçmez, M., Kayım, M., Köseoğlu, D., & Hasdemir, E. (2006). Toxic effects of lead on the liver and gills of *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *77*(4), 551-558.
- Takashima, F., & Hibiya, T. (1995). *An atlas of fish histology: normal and pathological features*. 2.ed. Kodansha: Gustav Fischer Verlag.
- Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., & Jaritkhuan, S. (2003). Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, *121*(3), 307-320.
- Triebkorn, R., Telcean, I., Casper, H., Farkas, A., Sandu, C., Stan, G., ... & Köhler, H. R. (2008). Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: metal accumulation and histopathology in fish. *Environmental Monitoring and Assessment*, *141*(1-3), 177-188.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, *13*(2), 57-149.
- Veiga, M. L. D., Rodrigues, E. D. L., Pacheco, F. J., & Ranzani-Paiva, M. J. T. (2002). Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *45*(2), 171-175.
- Velma, V., Vutukuru, S. S., & Tchounwou, P. B. (2009). Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: a critical review. *Reviews on environmental health*, *24*(2), 129-146.
- Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E. I., & Unlu, E. (2007). Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *24*(3), 286-291.
- Velusamy, A., Kumar, P. S., Ram, A., & Chinnadurai, S. (2014). Bioaccumulation of heavy metals in commercially important marine fishes from Mumbai Harbor, India. *Marine Pollution Bulletin*, *81*(1), 218-224.
- Verbost, P. M., Flik, G., Lock, R. A. C., & Bonga, S. W. (1988). Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport. *The Journal of membrane biology*, *102*(2), 97-104.
- Viarengo, A. (1989). Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Rev. Aquat. Sci*, *1*(2), 295-317.

- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Cabrera, L. C., Primel, E. G., Fillmann, G., Bianchini, A., & dos Reis Martinez, C. B. (2017). A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Science of the Total Environment*, 586, 598-609.
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., da Costa Cabrera, L., Risso, W. E., ... & dos Reis Martinez, C. B. (2016). Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 542, 44-56.
- Vinodhini, R., & Narayanan, M. (2008). Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *International Journal of Environmental Science & Technology*, 5(2), 179-182.
- Vitale, A. M., Monserrat, J. M., Castilho, P., & Rodriguez, E. M. (1999). Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122(1), 121-129.
- Watanabe, H. (1984). Accumulation of chromium from fertilizers in cultivated soils. *Soil science and plant nutrition*, 30(4), 543-554.
- Weber, P., Behr, E. R., Knorr, C. D. L., Vendruscolo, D. S., Flores, E. M., Dressler, V. L., & Baldisserotto, B. (2013). Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. *Microchemical Journal*, 106, 61-66.
- Wei, K., & Yang, J. (2015). Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 113, 446-453.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.
- Widianarko, B., Van Gestel, C. A. M., Verweij, R. A., & Van Straalen, N. M. (2000). Associations between trace metals in sediment, water, and guppy, *Poecilia reticulata* (Peters), from urban streams of Semarang, Indonesia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(1), 101-107.
- Wong, C. K., & Wong, M. H. (2000). Morphological and biochemical changes in the gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquatic Toxicology*, 48(4), 517-527.
- Wood, C. M. (2012). An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. In *Fish physiology* (Vol. 31, pp. 1-51). Academic Press.
- Yasser, A. G., & Naser, M. D. (2011). Impact of pollutants on fish collected from different parts of Shatt Al-Arab River: a histopathological study. *Environmental monitoring and assessment*, 181(1-4), 175-182.
- Zhao, S., Feng, C., Quan, W., Chen, X., Niu, J., & Shen, Z. (2012). Role of living environments in the accumulation characteristics of heavy metals in fishes and crabs in the Yangtze River Estuary, China. *Marine pollution bulletin*, 64(6), 1163-1171.

Capítulo V

Manuscrito IV



A ser submetido ao periódico Chemosphere

Efeitos agudos de um formulado do piretroide lambda-cialotrina em parâmetros bioquímicos, genéticos e fisiológicos do teleósteo *Prochilodus lineatus*

Carlos Eduardo Delfino Vieira, Cláudia Bueno dos Reis Martinez

5.1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas três décadas, o padrão mundial de consumo de inseticidas foi se modificando e a diminuição na produção de compostos de alta toxicidade para mamíferos, como organofosforados e carbamatos foi a modificação mais notável (Kumar et al., 2014). Em contrapartida, a utilização de inseticidas da classe dos piretroides está em ascensão em escala mundial, pois são considerados compostos potentes e eficazes no controle de insetos, possuem ação rápida e apresentam toxicidade seletiva, considerados relativamente inofensivos para mamíferos e aves (Soderlund et al., 2002; Goulding et al., 2013; Haverin e Vornanen, 2014). No entanto, diversos estudos mostraram que os piretroides estão entre os agrotóxicos mais tóxicos para organismos aquáticos, tais como os peixes (Barrionuevo e Lanças, 2001; US EPA, 2001, Saxena e Seth, 2002; Pimpão, 2006; Gu et al., 2007). Devido ao seu caráter lipofílico, piretroides possuem uma alta taxa de absorção através das brânquias dos peixes, a qual pode explicar, em parte, a alta sensibilidade deste grupo de vertebrados à exposição por piretroides (Polat et al; 2002). Além disso, peixes parecem ser deficientes no sistema enzimático que hidrolisa estes compostos (Viran et al., 2003), o que confere um ritmo mais lento na metabolização e eliminação dos mesmos, em comparação com aves e mamíferos (Bradbury e Coats, 1989). As meias-vidas de eliminação de várias piretroides por peixes são todas superiores a 48 horas, enquanto o tempo de meia-vida para aves e mamíferos varia de 6 a 12 horas (Bradbury e Coats, 1989).

Como resultado do escoamento de áreas agrícolas, procedimentos de pulverização florestal e pulverização direta nos corpos d'água, os piretroides podem entrar nos ambientes aquáticos e se acumular em sedimentos, devido ao seu elevado coeficiente de adsorção, que confere fortes propriedades de ligação ao solo (He et al. 2008). Esta característica pode aumentar a concentração destes compostos em sedimentos de corpos d'água, cumulativamente, aumentando assim o risco para a saúde de peixes dulcícolas, principalmente para espécies bentônicas (Marino e Ronco, 2005; Velmurugan et al, 2007; Kutluyer et al., 2015). Atualmente, estes produtos químicos podem ser detectados em águas naturais em todo o mundo após aplicações agrícolas, urbanas e residenciais (Weston et al, 2009; Domagalski et al., 2010; Weston e Lydy, 2012; Jabeen et al., 2015; Stehle e Schulz, 2015). A presença da CL foi verificada em sedimentos de rios brasileiros nas concentrações de 1,32 ng.g⁻¹ (Hunt et al., 2016), 1 a 5 ng.g⁻¹ (Miranda et al. (2008) e 19,7 a 60,0 ng.g⁻¹ (Possavatz et al., 2014).

A atividade inseticida e toxicidade dos piretroides é dependente da estereoquímica do composto: geralmente os isômeros cis são mais tóxicos que os isômeros trans; e a introdução do grupo α -ciano aumenta a toxicidade da molécula tanto para insetos como para mamíferos (Casida et al., 1983). Lawrence e Casida (1982) dividiram os piretroides em duas classes, de acordo com o tipo de síndrome que a intoxicação causa em mamíferos: classe T (tremor), cuja intoxicação causa hipersensibilidade e agressividade e a classe CS (coreoatetose) cuja intoxicação causa salivação, seguida por acessos de tremores, espasmos convulsivos, coma e morte. Assim, os piretroides que causam síndrome T e não apresentam um grupo ciano em sua estrutura são classificados em tipo I; enquanto que os compostos que causam a síndrome CS e apresentam um grupo ciano em sua estrutura, são classificados em tipo II. Dentre os piretroides mais utilizados atualmente e anteriormente citados, a cismetrina e a permetrina são compostos do tipo I, ao passo que a deltametrina, ciflutrina, cipermetrina e cialotrina são piretroides do tipo II.

A λ -cialotrina (CL) é um α -ciano piretróide do tipo II e foi comercializada pela primeira vez em 1985 e, além de seu uso atual como um inseticida para uma ampla gama de insetos-alvo, também tem sido adotada para o manejo de pragas ou em campanhas de saúde pública no controle de insetos vetores de doenças (Muranli e Güner, 2011, Lofty et al, 2013; Ramadhas et al, 2014). O principal modo de ação dos piretroides é a alteração da permeabilidade dos canais de sódio voltagem-dependentes das células nervosas. Os

piretroides modificam a cinética de ativação e inativação dos canais de sódio, resultando em aberturas prolongadas dos canais individuais. Isso provoca a despolarização da membrana, descargas repetitivas e perturbações sinápticas que levam aos sintomas de intoxicação por hiperexcitabilidade (Vijverberg e van den Bercken, 1990; Soderlund et al., 2002). A CL é extremamente tóxica para animais aquáticos, incluindo peixes, invertebrados e anfíbios (Velisek et al, 2006; Carriquiriborde et al, 2009; Ansari et al, 2011; Muranli e Güner, 2011) atuando como uma substância neurotóxica que interfere na condutância iônica das membranas nervosas, prolongando a corrente de sódio (Clark, 1997). No Brasil, há 253 compostos piretroides registrados para formulações comerciais, sendo a CL o piretroide com maior número de registros (72) (BRASIL, 2018).

O peixe dulcícola *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) tem sido utilizado com um modelo biológico adequado para estudo de efeitos de agrotóxicos, pois tem se mostrado sensível aos efeitos das exposição à herbicidas (Langiano e Martinez, 2008; Modesto e Martinez, 2010a, 2010b; Paulino et al., 2012; Santos e Martinez, 2012; Pereira et al., 2013; Moreno et al., 2014) e inseticidas (Parma de Croux, 2002; Maduenho et al; 2008; Bacchetta et al., 2011; Poletta et al., 2013; Loteste et al., 2013; Vieira et al., 2018). Diante deste contexto o objetivo deste estudo é verificar os potenciais efeitos tóxicos da CL em biomarcadores bioquímicos, fisiológicos, genéticos do peixe *P. lineatus* após exposição aguda a concentrações ambientalmente relevantes de CL.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Desenho Experimental

Peixes em estágio juvenil da espécie *Prochilodus lineatus* (n= 40, peso: $21,57 \pm 3,86$ g; comprimento: $11,15 \pm 0,70$ cm), obtidos da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL), foram aclimatados durante sete dias em tanques de 300 L contendo água limpa, desclorada e com aeração constante, sob fotoperíodo de 12:12 h claro/escuro. Durante esse período foi fornecida ração comercial (Guabi®, 36 % conteúdo proteico) a cada 48 h, interrompendo-se a alimentação 24 h antes dos testes, bem como durante a exposição. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados durante

todo o experimento (aclimação e exposição: temperatura = $22,86 \pm 0,071$ °C; pH = $7,88 \pm 0,023$; O.D. = $7,26 \pm 0,028$ mg O₂.L⁻¹; condutividade = $0,102 \pm 0,004$ mS.cm⁻¹).

Após o período de aclimação, os peixes foram randomicamente divididos em cinco grupos (n = 8 peixes/grupo) e mantidos em aquários de vidro contendo 80 L de água desclorada. Um grupo foi mantido sob condições controladas somente em água limpa (CL 0) e os outros quatro grupos foram expostos à diferentes concentrações nominais de CL a partir da formulação comercial Karate Zeon® CS (5% de λ-cialotrina, Syngenta S.A., Brasil): 5 (CL 5), 50 (CL 50), 250 (CL 250) e 500 (CL 500) ng.L⁻¹, por 96 h, sob condições semiestáticas, com renovação total da solução teste a cada 24 h. A LC₅₀ 96 h da λ-cialotrina para diferentes espécies de peixes varia de 0,21 a 2,3 µg.L⁻¹ (Maund et al, 1998), apresentando grande toxicidade para estes organismos. Desta forma, buscou-se utilizar concentrações seguras de CL para *P. lineatus*, que não causassem mortalidade, partindo de uma concentração mínima de 5 ng.L⁻¹ e aumentando em progressão geométrica de 10 até a concentração máxima de 5000 ng.L⁻¹ (5 µg L⁻¹). Entretanto, houve 100% de mortalidade na maior concentração após 24 h, e uma concentração intermediária foi adicionada no experimento (250 ng.L⁻¹).

Após o período de exposição, os peixes foram anestesiados em benzocaína (0,1 g.L⁻¹) para a retirada de sangue pela veia caudal. Em seguida, os animais foram mortos por secção medular para a coleta do fígado, brânquia, rim, cérebro e músculo. Os órgãos foram armazenados em ultrafreezer (-80° C) para as análises bioquímicas e uma alíquota de sangue foi armazenada em soro bovino fetal e refrigerado (10° C) até o momento do ensaio genético. Amostras de sangue total foram armazenadas em microtubos e imediatamente após a amostragem foram utilizadas para a determinação dos parâmetros hematológicos. Os procedimentos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Processo 10493.2014.27).

5.2.2 Biomarcadores fisiológicos

Uma alíquota de sangue total (50 µL) foi utilizada para a determinação do hematócrito (Hct) em microcapilares de vidro heparinizados e centrifugados (1.200 g, 5 min), para a leitura em cartão padronizado, que determina a porcentagem de células

vermelhas na amostra. Outra alíquota de sangue (5 μ L) total foi diluída em tampão formol citrato (1:200) para a contagem do número de eritrócitos por mm^3 de sangue (RBC), em câmara de Neubauer ao microscópio de luz. A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada por meio do método de cianeto de metahemoglobina, utilizando-se um kit comercial (Doles, Brasil), em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido) a 540 nm. Após a determinação dos parâmetros hematológicos o sangue total foi centrifugado (1.870 g, 10 min – MCD2000, Hsiangtai, Taiwan), para obtenção do plasma. A glicose plasmática foi analisada pela técnica da glicose oxidase (Doles, Brasil) em espectrofotômetro de microplacas (Victor 3, Perkin Elmer, USA) à 510 nm.

No plasma foram analisadas as concentrações de sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) e osmolalidade. As concentrações de Na^+ e K^+ foram determinada em plasma diluído em água deionizada (1:100), usando fotômetro de chama (DM-62, Digimed). A análise de Cl^- foi realizada com auxílio de kit comercial (Labtest Diagnostica e BioClin, Brasil) pelo método do tiocianato de mercúrio, com leitura em espectrofotômetro a 490 nm. As dosagens de Ca^{2+} e Mg^{2+} foram realizadas com amostras de plasma diluídas (1:50) em óxido de lantânio (La_2O_3 0,1%), em espectrofotômetro de absorção atômica (AAAnalyst 700, Perkin Elmer).

5.2.3 Biomarcadores bioquímicos

Antioxidantes e dano oxidativo

Para a avaliação dos biomarcadores associados ao estresse oxidativo as amostras de fígado, brânquia, rim, músculo e cérebro mantidas no ultra freezer foram descongeladas em gelo, homogeneizadas (10x volume) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), centrifugadas (20 min, 13000 g, 4°C) e com o sobrenadante foram realizados os ensaios bioquímicos descritos em sequência.

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi determinada pelo monitoramento da complexação da glutathione reduzida (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em espectrofotômetro a 340 nm, de acordo com o método descrito por Keen et al.

(1976). O aumento de CDNB conjugado foi monitorado durante 1 minuto, em espectrofotômetro a 340 nm e a atividade da enzima foi expressa em nmol de CDNB conjugado $\text{min}^{-1} \text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

A atividade da Cu-Zn superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido em espectrofotômetro, a 550 nm, de acordo com McCord e Fridovich (1969). A atividade da enzima foi expressa em U de SOD. mg de proteína $^{-1}$, sendo que U representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada através da velocidade de decomposição de peróxido de hidrogênio pela enzima, sendo quantificado o decréscimo de absorvância em espectrofotômetro a 240 nm (Beutler, 1975). As amostras (1:100) foram adicionadas a um meio de reação (H_2O_2 0,03%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,25 mM), e o decréscimo de sua absorvância a 240 nm determinado durante 1 min. A atividade da enzima foi expressa em μmol de H_2O_2 degradado. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína $^{-1}$.

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi estimada indiretamente através da oxidação do NADPH em presença de glutathiona redutase (GR) e o substrato glutathiona oxidada, produzida pela ação da GPx, e acordo com o método de Hopkins e Tudhope (1973). Uma alíquota (10 μL) das amostras foi misturada concomitantemente a 1 mL do tampão (NaH_2PO_4 , 25 mM, Na_2HPO_4 , 25 mM, EDTA 2 mM, NaN_3 5 mM, NADPH 0,2 mM, GSH 1 mM, 25°C e protegido da luz), à GR (1 U) e ao H_2O_2 (0,4 mM) e a cinética da reação foi analisada por 1 minuto em espectrofotômetro a 340 nm. Os resultados foram expressos em μmol de NADP. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína $^{-1}$.

A concentração de glutathiona (GSH) no fígado foi determinada de acordo com o método de Beutler et al. (1963), através da reação dos grupamentos -SH com o reagente de cor 5,5-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB) que foi quantificado em 412 nm. A concentração de glutathiona foi expressa em μg GSH. mg proteína $^{-1}$.

Para avaliação da lipoperoxidação foi utilizado o ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, entre elas o malondialdeído [MDA]) de acordo com o protocolo descrito por Camejo et al. (1998). Ao sobrenadante foi acrescentado butilhidroxitolueno (BHT 1M), solução salina fosfatada (2 mM KCl; 1,4 mM NaH_2PO_4 ; 357 mM NaCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,4), ácido tricloroacético (TCA 50%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 1,3%)

dissolvido em 0,3% NaOH e a mistura foi mantida a 60°C em estufa por 1 hora. Posteriormente, foi feita a leitura de fluorescência (ex/em: 535/590 nm) e a concentração de TBARS determinada através de uma curva padrão de malondialdeído (MDA). A concentração de TBARS foi expressa em nmol de TBARS. mg de proteína⁻¹.

Atividade das esterases

A atividade das esterases no fígado e plasma foi quantificada de acordo com o método de Li e Fan (1997) com algumas adaptações, através do consumo dos substratos α e β -naftil pelas α -EST e β -EST, respectivamente, que os transformam em α e β -naftol. Para α -esterase, foi adicionado 10 μ L de amostra diluída (1:20) em cada poço, acrescentado de 200 μ L de α -naftil acetato (0,3 mM) em tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 7,2) e utilizando uma solução de α -naftol (35 nmol) como controle positivo. Após incubação de 15 min em temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de Fast Blue (0,3 % Fast Blue em 3,5 % de dodecil sulfato de sódio), mantidos sob mesma temperatura por mais 5 min e na sequência a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 544 nm (Victor 3, Perkin Elmer, USA). A atividade da β -Est seguiu as mesmas concentrações utilizadas para α , entretanto usando o β -naftil acetato (0,3mM) como substrato e o β -naftol (35 nmol) como controle positivo. Para o cálculo da concentrações de substratos convertidos nas amostras foi construída uma curva padrão de α -naftol e β -naftol (0 – 10 μ g . mL⁻¹) e os resultados expressos em nmol α / β min⁻¹. mg proteína⁻¹.

Os tecidos muscular e cerebral foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5; 1:10 p/v) e centrifugados (10.000 g, 20 min, 4° C) para a análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE), segundo método descrito por Ellman et al. (1961) e adaptado por Alves-Costa et al. (2007) para leitura em espectrofotômetro de microplacas a 415 nm. A atividade da AChE (nmol DTNB.min⁻¹.mg ptn⁻¹) foi determinada nos tecidos através da reação do iodeto de acetilcolina (9 mM) com reagente de cor contendo ditionitrobenzoato (0,5 mM). O produto da degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE, reage com o DTNB formando nitrobenzoato, que foi mensurado

espectrofotometricamente a cada 3 minutos pelo tempo total de 6 minutos. A concentração de proteínas totais para a expressão dos resultados foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976).

5.2.4 ATPases branquiais

Os filamentos branquiais separados dos arcos foram homogeneizados em tampão de homogeneização (Tris 100 mM, Sacarose 500 mM, ditioneitol [DTT] 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonilo [PMSF] 1 mM) e centrifugados (10000 g, 25 min, 4°C) e o sobrenadante foi usado para medir a atividade das ATPases. A atividade da Na⁺K⁺-ATPase (NKA) foi determinada segundo protocolo estabelecido por Quabius et al. (1997). Neste método, mede-se a atividade da enzima de modo indireto, através da produção de fosfato inorgânico proveniente da quebra de ATP, em amostras incubadas com KCl (que estimula a atividade da NKA) e com ouabaína (inibidor da NKA). Como padrão foi utilizada uma solução de fósforo 0,65 mM (Sigma). Os ensaios foram realizados em leitora de microplacas (620 nm, Elx 800, Biotek, USA).

A atividade das enzimas Ca²⁺-ATPase (CaATP) e Mg²⁺-ATPase (MgATP) foi mensurada segundo método descrito por Vijayavel et al. (2007) com modificações. Primeiramente, as amostras foram incubadas em uma solução reativa (NaCl 189 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris 20 mM, CaCl₂ 5 mM, ouabaína 2 mM, pH 7,6) sem ATP para determinação da concentração basal de fosfato inorgânico (Pi) na amostra. Em seguida, as amostras foram incubadas em solução reativa (CaATP: NaCl 189 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris 20 mM, CaCl₂ 5 mM, ouabaína 2 mM, pH 7,6; MgATP: NaCl 189 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris 20 mM, KCl 14 mM, EDTA 0,2 mM, ouabaína 2 mM, pH 7,6) contendo ATP (3 mM). A atividade da CaATP e MgATP foi determinada pela diferença de absorbância entre as amostras com ATP e as amostras sem ATP, pela quantificação de Pi liberado na amostra usando-se uma solução de coloração segundo Ames (1966). As leituras foram realizadas em leitora de microplacas (ELX 800, Bio-Tek Instruments) a 620 nm, sendo os valores expressos em $\mu\text{mol Pi mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

A concentração de proteínas totais nos diferentes homogenatos foi determinada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação de proteínas com o corante

Coomassie Brilliant Blue G-250. A curva de calibração foi feita com albumina de soro bovino (BSA) e a absorbância lida em espectrofotômetro a 595 nm.

5.2.5 Biomarcadores de genotoxicidade - Teste do Cometa

O ensaio alcalino do cometa foi realizado com eritrócitos, com base na metodologia descrita por Singh et al. (1988), com algumas modificações. Após a amostragem, uma alíquota de sangue foi adicionada à solução de soro bovino fetal (SBF, 1:100) e misturado com agarose de baixo ponto de fusão. Esta mistura foi colocada em lâmina de vidro previamente coberta com agarose normal, coberta com lamínula, e permaneceu na geladeira por 30 min. Em seguida as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 % DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 hora. Após esse tempo as lâminas foram transferidas para cubas de eletroforese contendo solução tampão (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) e permaneceram por 30 minutos. Logo depois foram submetidas à eletroforese por 20 minutos (300 mA, 25 V, 1 V.cm⁻¹), e após as lâminas foram neutralizadas com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5), em 3 lavagens de 5 min, e fixadas em etanol por 10 minutos. Para as análises, as lâminas foram coradas com o corante GelRed (Uniscience) e cobertas com lamínula. Foram examinadas em microscópio de fluorescência na objetiva de 40x em teste cego. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina. Os danos no DNA foram classificados visualmente conforme a migração dos fragmentos de DNA em quatro classes: 0: sem dano visível; 1: cauda menor que o diâmetro do núcleo; 2: comprimento de cauda de 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo; 3: comprimento da cauda maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. Para cada peixe o escore foi calculado multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe de dano pelo valor da classe (0, 1, 2 e 3), gerando um valor entre 0 e 300.

5.2.6 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram primeiro testados quanto à normalidade e homogeneidade da variância. Em seguida, utilizou-se a análise de variância paramétrica

(ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal-Wallis), seguida de um teste de comparação múltipla (teste de Newman-Keuls ou Dunns), quando indicado, sendo consideradas significativas diferenças cujo $p < 0,05$.

5.3 RESULTADOS

Os resultados dos diferentes parâmetros fisiológicos mensurados em *P. lineatus* após exposição à CL estão apresentados na Tabela 5.1. Em relação à CL 0, foi observado um aumento significativo ($p = 0,022$) no hematócrito em CL 5 e CL 50. Um aumento ($p < 0,001$) na glicemia foi observado em CL 50, CL 250 e CL 500 em relação à CL 0. Alterações nas concentrações iônicas indicaram uma diminuição das concentrações de Na^+ em CL 250 e CL 500 ($p < 0,001$), e de Ca^{2+} em CL 500 em relação à CL 0 ($p = 0,028$).

Tabela 5.1: Parâmetros fisiológicos de *P. lineatus* mantidos sob a condição controle (CL 0) ou expostos à λ -cialotrina a 5 (CL 5), 50 (CL 50), 250 (CL 250) e 500 (CL 500) ng.L^{-1} por 96 h.

Parâmetros fisiológicos	CL0	CL5	CL50	CL250	CL500
Hemoglobina (mg.dL^{-1})	9,07 \pm 0,54	9,44 \pm 0,20	10,45 \pm 0,38	10,43 \pm 0,37	10,35 \pm 0,39
Hematócrito (%)	37,14 \pm 2,03^a	47,25 \pm 2,67^b	48,00 \pm 2,03^b	41,00 \pm 0,95^{ab}	43,00 \pm 0,79^{ab}
RBCs ($\times 10^6 \text{ cel. mm}^3$)	2,37 \pm 0,14	2,75 \pm 0,14	3,05 \pm 0,15	2,59 \pm 0,07	2,66 \pm 0,18
Glicose (mg.dL^{-1})	35,51 \pm 1,63^a	41,10 \pm 2,65^a	48,40 \pm 2,00^b	49,28 \pm 2,24^b	46,63 \pm 2,25^b
Na^+ (mM)	148,88 \pm 4,14^a	145,02 \pm 2,13^a	145,75 \pm 3,40^a	128,65 \pm 2,48^b	120,28 \pm 5,60^b
K^+ (mM)	7,46 \pm 0,96	7,90 \pm 1,40	7,93 \pm 0,82	8,57 \pm 1,97	10,10 \pm 1,66
Cl^- (mM)	107,52 \pm 4,28	105,98 \pm 2,97	109,02 \pm 4,78	102,65 \pm 4,54	104,23 \pm 3,87
Ca^{2+} (mM)	2,65 \pm 0,09^a	2,53 \pm 0,06^{ab}	2,65 \pm 0,03^a	2,73 \pm 0,03^a	2,16 \pm 0,23^b
Mg^{2+} (mM)	0,60 \pm 0,02	0,59 \pm 0,03	0,63 \pm 0,02	0,59 \pm 0,01	0,58 \pm 0,09

Os dados representam a média \pm EP, $n = 8$.

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Em relação à CL 0, foi observado um aumento ($p < 0,001$) na atividade da GST (Fig. 5.1) no fígado, brânquia, cérebro e músculo dos peixes expostos à CL 500. A atividade da SOD apresentou uma diminuição ($p = 0,032$) na brânquia na maior concentração em relação à CL 0 (Fig. 5.2). A atividade da CAT (Fig. 5.3) mostrou-se diminuída ($p = 0,031$) no fígado

em CL 5, CL 50, CL 250, CL 500 em relação à CL 0, enquanto no músculo houve um aumento ($p < 0,001$) na atividade enzimática em CL 50, CL 250 e CL 500 em relação à CL 0. Com relação à atividade da GPx (Fig. 5.4), o fígado apresentou um aumento ($p < 0,001$) da atividade enzimática em CL500, com relação à CL0, enquanto na brânquia e no rim houve uma diminuição ($p < 0,001$) da atividade da enzima na maior concentração. Não foram observadas diferenças significativas na concentração de GSH (Fig. 5.5) entre os diferentes grupos, em nenhum órgão analisado. Um aumento significativo na LPO (Fig. 5.6) foi observado na brânquia ($p < 0,001$) e no rim ($p = 0,002$) em CL 500, em comparação à CL 0. A atividade da α -EST (Fig. 5.7 A) aumentou ($p < 0,001$) no fígado dos peixes em todos os grupos em relação à CL 0. Similarmente, a atividade da β -EST (Fig. 5.7 B) aumentou no fígado ($p < 0,001$) em todos as concentrações de CL em relação à CL 0, assim como no plasma ($p < 0,001$).

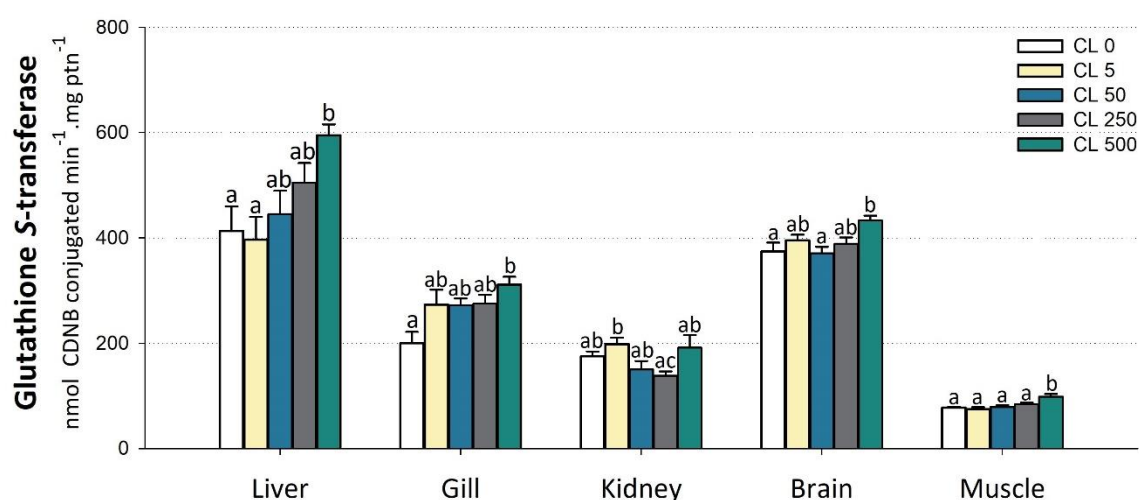


Figura 5.1 – Atividade da glutathione S-transferase (GST) em fígado, brânquia, rim, cérebro e músculo de *P. lineatus* mantidos sob a condição controle (CL 0) ou expostos à λ -cicalotrina a 5 (CL 5), 50 (CL 50), 250 (CL 250) e 500 (CL 500) ng.L^{-1} . Os dados representam a média \pm DP, $n = 8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

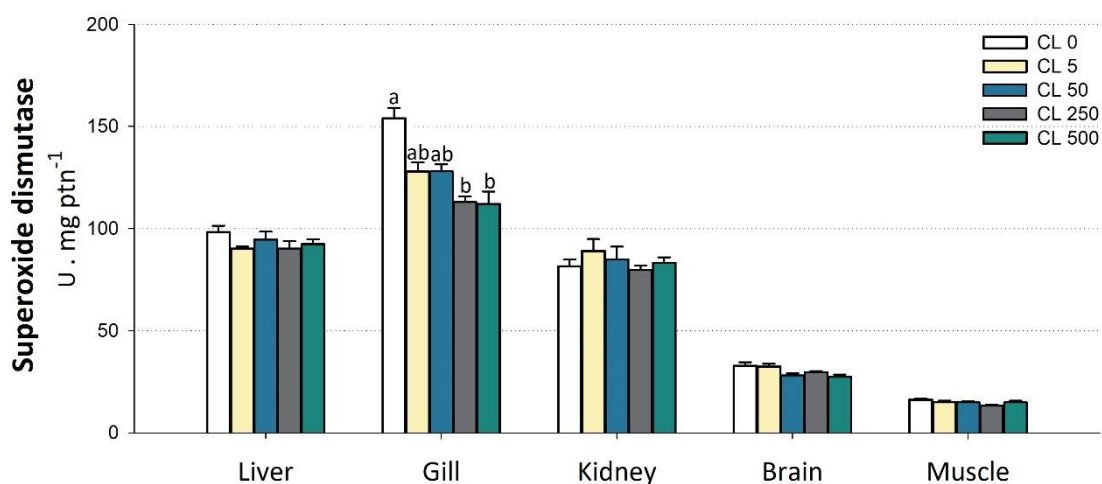


Figura 5.2 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) em fígado, brânquia, rim, cérebro e músculo de *P. lineatus* mantidos sob a condição controle (CL 0) ou expostos à λ -cicalotrina a 5 (CL 5), 50 (CL 50), 250 (CL 250) e 500 (CL 500) ng.L^{-1} . Os dados representam a média \pm DP, $n = 8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

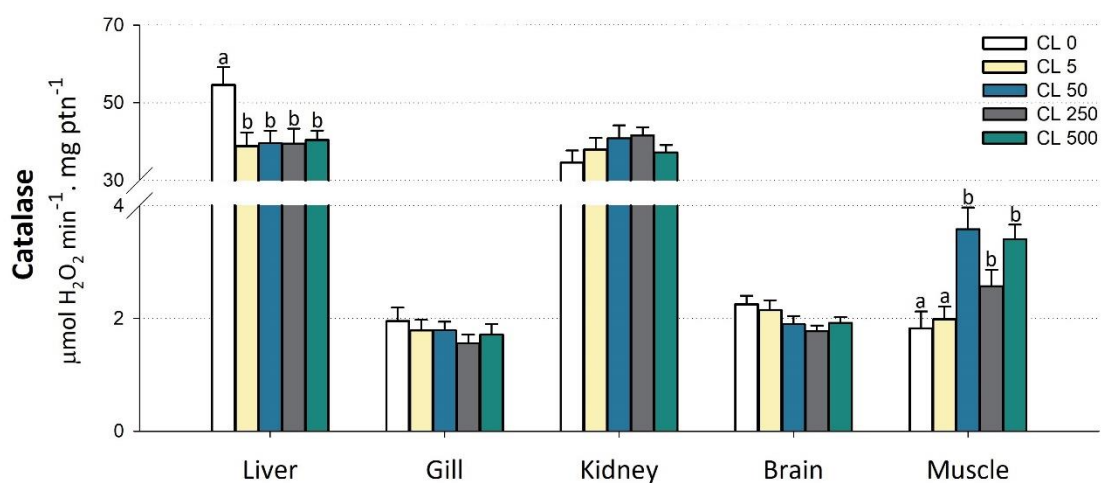


Figura 5.3 – Atividade da catalase (CAT) em fígado, brânquia, rim, cérebro e músculo de *P. lineatus* mantidos sob a condição controle (CL 0) ou expostos à λ -cicalotrina a 5 (CL 5), 50 (CL 50), 250 (CL 250) e 500 (CL 500) ng.L^{-1} . Os dados representam a média \pm DP, $n = 8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

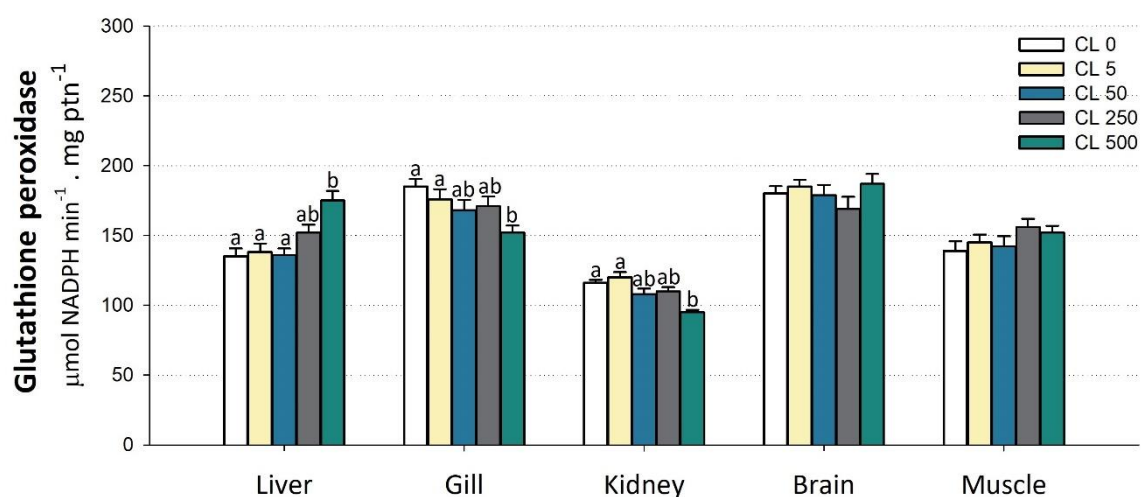


Figura 5.4 – Atividade da glutathione peroxidase (GPx) em fígado, brânquia, rim, cérebro e músculo de *P. lineatus* mantidos sob a condição controle (CL 0) ou expostos à λ -cicalotrina a 5 (CL 5), 50 (CL 50), 250 (CL 250) e 500 (CL 500) ng.L^{-1} . Os dados representam a média \pm DP, $n = 8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

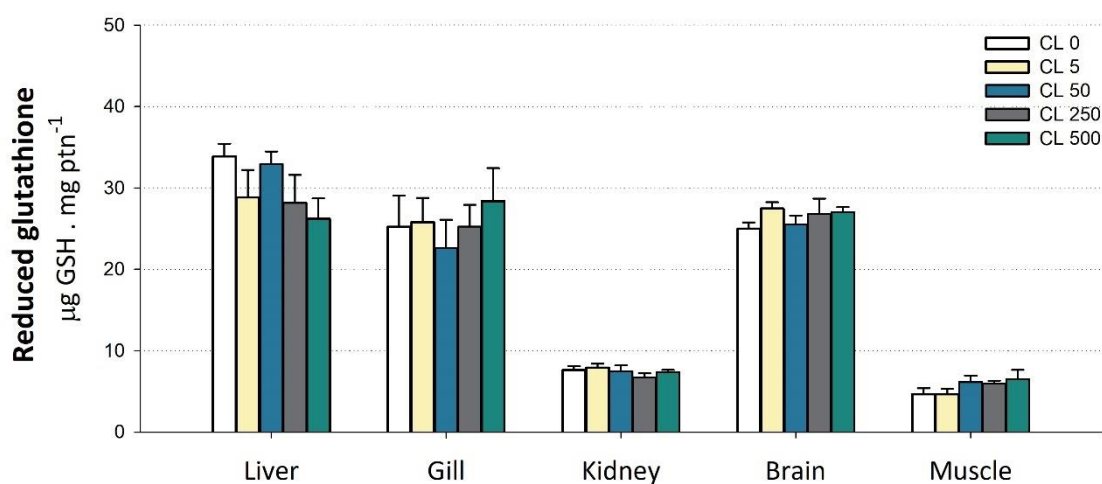


Figura 5.5 – Concentração de glutathione (GSH) em fígado, brânquia, rim, cérebro e músculo de *P. lineatus* mantidos sob a condição controle (CL 0) ou expostos à λ -cicalotrina a 5 (CL 5), 50 (CL 50), 250 (CL 250) e 500 (CL 500) ng.L^{-1} . Os dados representam a média \pm DP, $n = 8$.

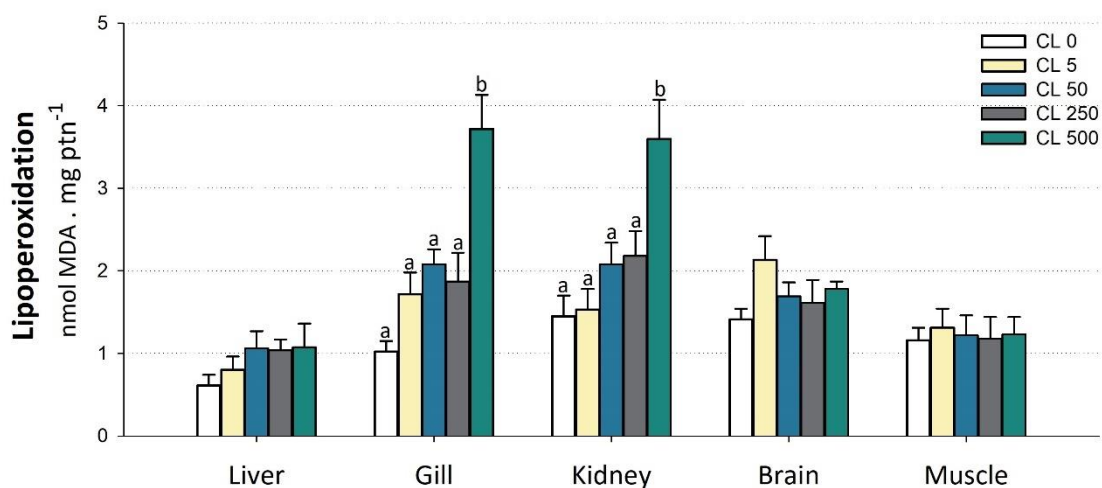


Figura 5.6 – Lipoperoxidação (LPO) em fígado, brânquia, rim, cérebro e músculo de *P. lineatus* mantidos sob a condição controle (CL 0) ou expostos à λ -cicalotrina a 5 (CL 5), 50 (CL 50), 250 (CL 250) e 500 (CL 500) ng.L^{-1} . Os dados representam a média \pm DP, $n = 8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

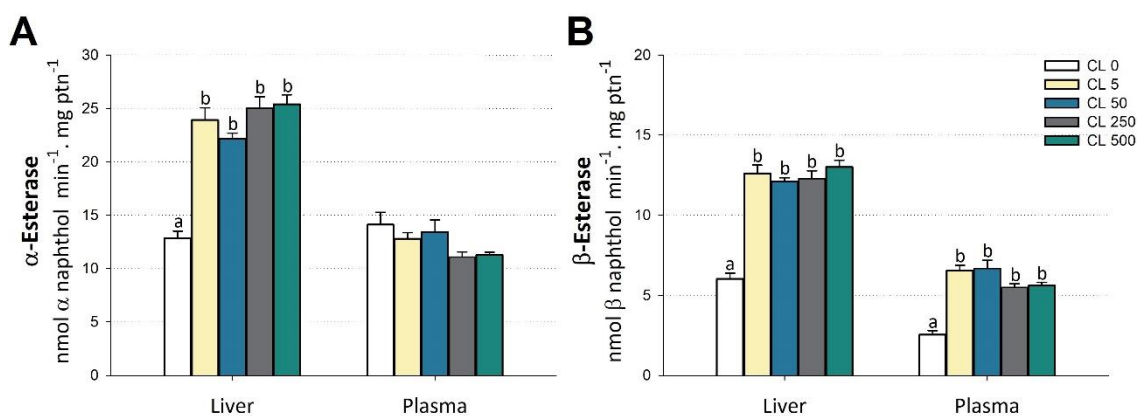


Figura 5.7 – Atividade da α -esterase (A) e β -esterase (B) em fígado e plasma de *P. lineatus* mantidos sob a condição controle (CL 0) ou expostos à λ -cicalotrina a 5 (CL 5), 50 (CL 50), 250 (CL 250) e 500 (CL 500) ng.L^{-1} . Os dados representam a média \pm DP, $n = 8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

A atividade da AChE (Fig. 5.8) no músculo foi afetada pela exposição à CL, pois uma diminuição na atividade da enzima ($p = 0,002$) foi observada em todos os grupos experimentais em relação à CL 0. No cérebro, não foram detectadas alterações significativas na atividade da AChE nos diferentes grupos experimentais.

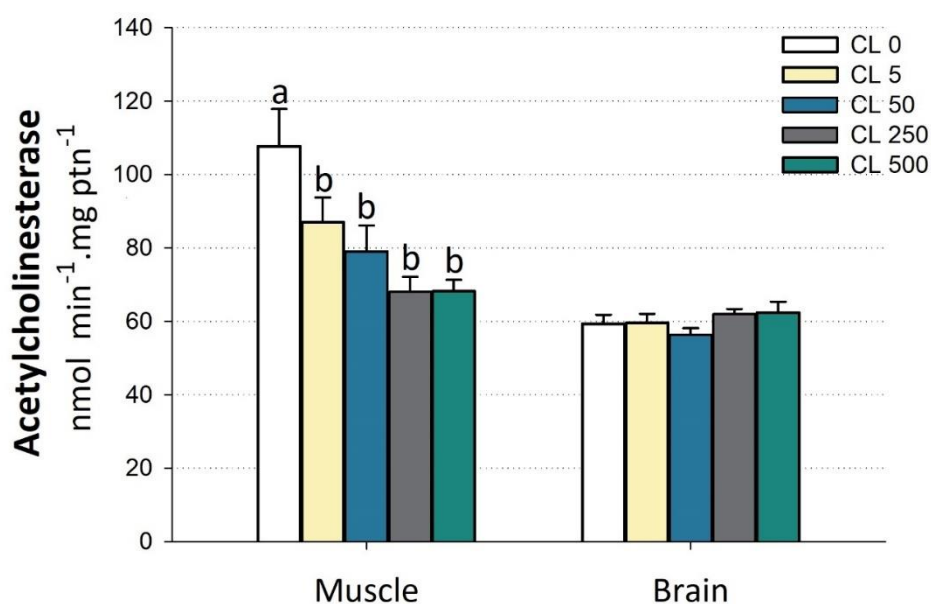


Figura 5.8 – Atividade da acetilcolinesterase em músculo e cérebro de *P. lineatus* mantidos sob a condição controle (CL 0) ou expostos à λ -cialotrina a 5 (CL 5), 50 (CL 50), 250 (CL 250) e 500 (CL 500) ng.L^{-1} . Os dados representam a média \pm DP, $n = 8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Os resultados das ATPases branquiais estão reunidos na Fig.5.9. Foi observado uma diminuição ($p = 0,004$) da atividade da CaATP em CL 50, CL 250 e CL 500 em relação à CL 0. A MgATP respondeu de maneira similar, e uma diminuição ($p = 0,004$) da atividade da enzima foi observada em CL 250 e CL 500 em comparação à CL 0. Por outro lado, um aumento da atividade da NKA foi observado em CL 500, comparado aos demais grupos ($<0,001$).

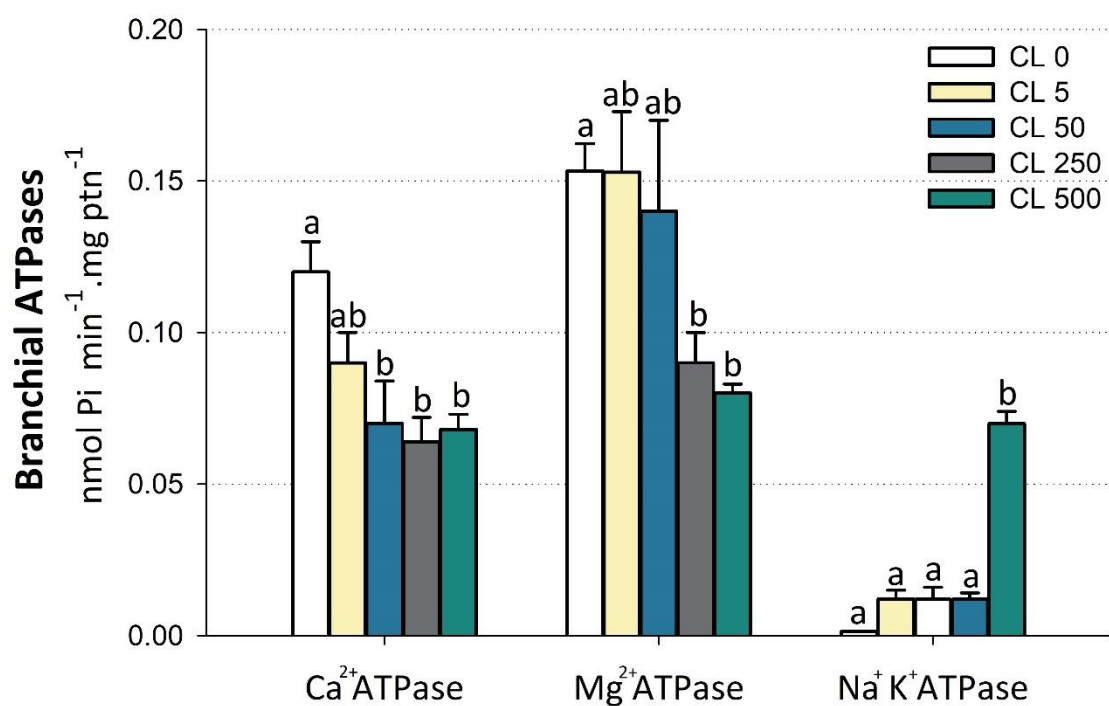


Figura 5.9 – Atividade da Ca²⁺ATPase, Mg²⁺ATPase e Na⁺K⁺ATPase em brânquias de *P. lineatus* mantidos sob a condição controle (CL 0) ou expostos à λ -cicalotrina a 5 (CL 5), 50 (CL 50), 250 (CL 250) e 500 (CL 500) ng.L⁻¹. Os dados representam a média \pm DP, n = 8. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p < 0,05).

Danos no DNA

Os resultados do teste do cometa demonstraram que a CL foi capaz de promover um aumento de danos no DNA em eritrócitos de *P. lineatus* em todas as concentrações testadas (Fig. 5.10), em relação à CL 0 (p < 0,001).

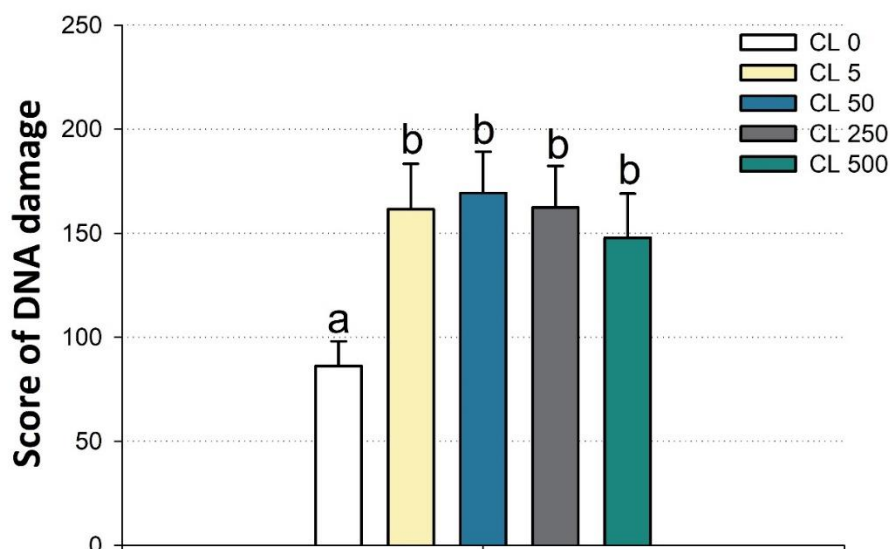


Figura 5.10 – Escore de danos no DNA em eritrócitos de *P. lineatus* mantidos sob a condição controle (CL 0) ou expostos à λ -cialotrina a 5 (CL 5), 50 (CL 50), 250 (CL 250) e 500 (CL 500) $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Os dados representam a média \pm DP, $n = 8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

5.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi demonstrado que a CL apresentou grande toxicidade para o peixe *P. lineatus* e as baixas concentrações utilizadas foram capazes de promover danos oxidativos e genéticos e alterações neurológicas e osmorregulatórios em diferentes tecidos do animal.

Os parâmetros fisiológicos dos peixes foram afetados após exposição aguda à CL. Em CL5 e CL50 houve um aumento do hematócrito em relação à CL 0. A CL também promoveu um quadro de hiperglicemia nos peixes em quase todos os grupos experimentais. Junto, estes dois parâmetros podem indicar uma situação de estresse fisiológico induzido pela CL. Sob ação de hormônios de estresse, como as catecolaminas, pode ocorrer um aumento dos parâmetros hematológicos como o RBC, Hb e Hct, resultante de contração esplênica (Wenderlaar Bonga, 2011), visando o maior suprimento de oxigênio para os tecidos metabolicamente ativos. A rápida liberação de glicose, o principal substrato energético dos animais, decorrente da glicogenólise hepática também é um efeito

característico de uma situação de estresse (Wenderlaar Bonga, 2011), visando suprir a demanda metabólica do animal. Desta forma, um aumento do Hct e a hiperglicemia em *P. lineatus* observadas em quase todos os grupos de exposição indicam uma situação de estresse promovida pela CL. Entretanto, os outros parâmetros hematológicos não foram alterados, e o aumento do Hct não foi acompanhado pelo aumento do número de eritrócitos circulantes. Além disso, nas duas maiores concentrações de CL não foram observadas diferenças no Hct. Ao que tudo indica, os resultados dos parâmetros hematológicos parecem ter sido influenciados pelos desajustes osmorregulatórios promovidos pela CL. Uma diminuição das concentrações plasmáticas de Na^+ em CL 250 e CL 500, bem como a diminuição de Ca^{2+} na maior concentração de CL pode indicar que ocorreu uma hemodiluição nos peixes, levando conseqüentemente a uma diminuição do Hct nestas mesmas concentrações. Desta forma, o possível aumento do Hct, RBC e Hb nas maiores concentrações CL possivelmente foi mascarado pelo ganho de água pelos animais.

Na literatura, variações nos parâmetros sanguíneos em peixes expostos à piretroides são controversos e parecem depender da espécie, do composto e das concentrações utilizadas. Em *Piaractus mesopotamicus* expostos à $0,7 \mu\text{g. L}^{-1}$ de CL por 96 h não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros sanguíneos (Bacchetta et al, 2014). Por outro lado, em *Clarias gariepinus* a CL promoveu uma diminuição do Hct, Hb e RBC (Yekeen et al., 2013). Outros piretroides do tipo II, como a deltametrina promoveram um aumento significativo nos parâmetros hematológicos do peixe *Ancistrus multispinis* (Pimpão et al, 2007), assim como a cipermetrina, nos teleósteos dulcícolas *Brycon amazonicus* (Moraes et al., 2018) e *Rhamdia quelen* (Borges et al., 2007; Montanha et al., 2014).

Um aumento da atividade da GST no fígado, brânquia, cérebro e músculo dos curimbas foi observado na maior concentração de CL. A GST além de ser uma enzima de fase II de biotransformação, tem papel determinante na prevenção do estresse oxidativo, pois além de complementar o papel da GPx na redução de hidroperóxidos, também protege as células dos produtos finais tóxicos da peroxidação lipídica (Hubatsch et al., 1998; Yang et al., 2001; Sharma et al., 2004). De acordo com Vontas e colaboradores (2002) a GST não atua na metabolização de piretroides em peixes. Os mecanismos de metabolização de piretroides em peixes serão discutidos posteriormente. Neste trabalho, o aumento da GST na maior concentração de CL parece ter tido um efeito protetor importante contra a

ocorrência da LPO em fígado, cérebro e músculo, visto que nestes órgãos não ocorreram danos oxidativos, mesmo com a diminuição da atividade de algumas enzimas antioxidantes. Assim, a GST não só complementaria a atividades das GPx na prevenção da peroxidação lipídica, reduzindo hidroperóxidos, mas também protegeria células de produtos finais tóxicos de peroxidação lipídica. O aumento da GST também foi observado em *Oreochromis niloticus* expostos à CL (Piner e Uner, 2012), em *Carassius auratus* expostos à cipermetrina (Dinu et al., 2010) e em *Cyprinus carpio* expostos à deltametrina (Ensibi et al., 2014).

Alterações nas enzimas de defesa antioxidante também foram observadas em *P. lineatus* após exposição aguda à CL e apresentaram respostas distintas nos diferentes órgãos do peixe. No fígado foi observado uma diminuição da CAT em todas concentrações de CL, enquanto a atividade GPx mostrou-se aumentada na maior concentração. Na brânquia, houve uma diminuição da SOD em CL 250 e CL 500, bem como um decréscimo na atividade da GPx na maior concentração. Similarmente, o rim posterior também apresentou um decréscimo da atividade da GPx em CL 500. No cérebro não foram observadas alterações em nenhum dos antioxidantes avaliados. Por último, o músculo apresentou um aumento na atividade da CAT em CL50, CL 250 e CL 500. Além destas variações na atividade destas enzimas, a ocorrência de LPO foi observada em brânquia e rim. Os possíveis mecanismos adaptativos de cada órgão serão discutidos a seguir.

No fígado, a indução da atividade da GPx e da GST podem ter sido responsáveis por proteger o tecido hepático contra o estresse oxidativo através da metabolização de hidroperóxidos orgânicos (ROOH), observações estas associadas com a não ocorrência de LPO neste órgão. Em geral, a inibição da atividade de CAT tem sido relacionada à ligação de substâncias tóxicas a grupos -SH de enzima, aumento de H₂O₂ e/ou radical superóxido (Ruas et al., 2008), embora a atividade da SOD tenha se mantido inalterada. No entanto, alguns estudos indicam que os níveis aumentados de peróxido de hidrogênio resultantes da inibição do CAT podem, em última instância, inibir a SOD (Kono e Fridovich, 1983). Quando há uma diminuição da CAT, o organismo passa a depender da GPx para a eliminação do H₂O₂, e que pode ter ocorrido nesta situação, tendo em vista o aumento da GPx na maior concentração. Em contraste aos nossos resultados, que indicam a eficiência do sistema antioxidante em combater os danos oxidativos no fígado de *P. lineatus*, Piner e Üner (2012) verificaram que CL causou aumento no conteúdo de glutathiona total e GSH e

na atividade de GST no fígado de juvenil de *O. Niloticus*, mas estas defesas não foram suficientes para combater a lipoperoxidação. Alak et al. (2013) demonstraram que a atividade de enzimas antioxidantes no tecido hepático da truta-arco-íris foi significativamente aumentada após exposição à CL. Dinu et al. (2010) encontraram resultados semelhantes aos do presente trabalho e verificaram uma diminuição da SOD e CAT, e um aumento de GST, GPx e LPO no fígado de *C. auratus* exposto à deltametrina.

A brânquia foi um dos órgãos mais afetados pela exposição à LC. Por estarem em contato direto com os contaminantes na água e em decorrência da alta lipofilicidade dos piretroides, ocorre uma grande absorção destes compostos pela superfície branquial (Mishra et al., 2005). Assim, esse órgão é altamente sensível à peroxidação lipídica induzida por xenobióticos, e seu potencial antioxidante é fraco em relação aos demais órgãos (Sayeed et al., 2003). A diminuição da GPx neste órgão na maior concentração de CL pode indicar uma deficiência no combate as ERO, resultando em um acúmulo de peróxido de hidrogênio, que por sua vez pode inibir a atividade da SOD, resultando em um acúmulo de radical superóxido. Assim, estes radicais em excesso podem prontamente oxidar os lipídios de membrana, que culminou no aumento expressivo de LPO observado em CL 500. O aumento da GST na maior concentração de CL pode ter decorrente da maior produção de hidroperóxidos orgânicos durante a LPO. A diminuição das defesas antioxidantes branquiais também foi observada em *C. punctatus* expostos à deltametrina (Sayeed et al., 2003), em *Labeo rohita* expostos ao fenvalerato (Prusty et al., 2011) e *B. amazonicus* expostos à cipermetrina (Moraes et al., 2018). O aumento da LPO também tem sido relatado em brânquias de peixes expostos à deltametrina e cipermetrina (Kaur et al., 2011; Amin e Hashem, 2012; Moraes et al., 2018).

Ao lado das brânquias, o rim mostra-se um dos primeiros órgãos afetados no caso de exposição a contaminantes, pois recebe a maior parte do sangue vindo dos órgãos respiratórios (Hinton e Laurén, 1990). Assim como observado nas brânquias, o rim de *P. lineatus* expostos à CL 500 apresentaram um decréscimo da GPx, com concomitante aumento da LPO, indicando que a deficiência na neutralização do H₂O₂ levou a ocorrência de estresse oxidativo neste órgão.

O cérebro também pode ser alvo de estresse oxidativo, dado a alta taxa de atividades metabólicas oxidativas e o alto índice de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas (Pérez-Campos et al., 1983; Hai et al., 1997; Fetoui et al., 2008. Entretanto,

este órgão não apresentou alterações nas enzimas antioxidantes e nem a ocorrência de LPO, após exposição à CL. O aumento da GST neste órgão, na maior concentração de CL avaliada, parece ter sido suficiente para prevenir a ocorrência de LPO. Resultados similares foram observados por Vieira et al. (2018), em juvenis de *P. lineatus* expostos ao inseticida imidacloprid, onde o aumento da GST nas maiores concentrações do neonicotinoide preveniu a ocorrência de LPO nas mesmas concentrações.

Embora as funções de desintoxicação ocorram principalmente no fígado, o músculo esquelético também está envolvido nesses processos. As células musculares esqueléticas demonstraram expressar diferentes tipos de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, incluindo o citocromo P450 e GST (Bainy et al., 1999; Hussey et al., 1991). O músculo esquelético dos curimbas pode ser um tecido atingido pela exposição à CL. Respostas adaptativas como o aumento da GST em CL 500 e na CAT nas três maiores concentrações de CL em decorrência do aumento na produção de ERO preveniram a ocorrência de LPO neste órgão. Em *C. carpio* mantidos em um sistema de cultivo de arroz irrigado no Sul do Brasil durante 100 dias, foi observado um acúmulo de CL no músculo e a ocorrência de LPO e oxidação de proteínas neste tecido, além de danos no fígado e nas brânquias (Clasen et al., 2018). Desta forma, o tecido muscular de peixes pode acumular piretroides e conseqüentemente apresentar alterações bioquímicas decorrente do desequilíbrio redox.

Piretroides são compostos muito apolares e, como tais, são passíveis de acumulação em tecidos ricos em lipídios. A forma mais eficiente de aumentar a solubilidade de um éster carboxílico, como a CL, é sua hidrólise, catalisada por carboxilesterases (CbE) em moléculas de álcool e ácido carboxílico. Esses metabólitos são mais solúveis em água e podem ser eliminados pela urina. Em ratos, os principais mecanismos de metabolização dos piretroides são oxidação, mediada pelo citocromo P450 e clivagem da ligação éster pelas CbE (Sogorb e Vilanova, 2002).

Alguns autores sugerem uma deficiência no sistema enzimático de hidrólise de piretroides em peixes, relacionado com a pequena quantidade de CbE nestes organismos, sendo a bile a principal rota para excreção dos produtos conjugados de piretróides hidroxilados (Demout, 1989; Bradbury e Coats, 1989; Haya, 1989). No entanto, diferenças na atividade ou na presença de vias metabólicas específicas podem determinar a dimensão da acumulação e da toxicidade de certos compostos para determinadas espécies de peixes, e resultar nas grandes diferenças de sensibilidade a um contaminante em particular.

Glickman et al. (1979) demonstraram que a habilidade de peixes em hidroxilar piretróides é interespecífica. Esse grupo de vertebrados parece ser mais dependente de outras vias de biotransformação, diferentes das CbE (Haya, 1989; Wheelock et al., 2005). Em truta arco-íris, após exposição à permetrina, Glickman e colaboradores (1981) não identificaram subprodutos de hidrólise de piretroides, apenas o metabólito hidroxilado e seu conjugado com ácido glicurônico. A mesma observação foi feita por Edwards et al. (1986) analisando comparativamente trutas, sapos, ratos e codornas expostos e tratados com cipermetrina. Segundo esses autores, a elevada concentração do metabólito hidroxilado 4'-OH-cipermetrina no cérebro de trutas indica que esse é o principal produto de biotransformação, seguido pelo conjugado glicurônico na bile. Ambos os estudos corroboram a hipótese de que, em peixes, a metabolização de piretroides se dá principalmente através de reações da fase I, com potencial geração de ERO. Entretanto, no presente estudo, a exposição aguda à CL promoveu um aumento das β -esterases no fígado e no plasma dos curimbas em todas as concentrações. Estes resultados podem indicar a participação destas esterases para metabolização da CL em *P. lineatus*, em particular importância para as CbE. Fraga (2010) estudou a distribuição e caracterização da atividade da CbE em três espécies de peixes Neotropicais, incluindo *Piaractus mesopotamicus*, *Leporinus macrocephalus* e *P. lineatus* e verificaram a presença desta enzima no fígado e plasma desta última espécie em grandes quantidades. Barron et al. (1999) demonstraram que a atividade da CbE no plasma de truta-arco-íris foi maior que a atividade determinada no fígado e brânquia, correspondendo a 57% da atividade total da enzima nesta espécie. Portanto, os resultados sugerem que as esterases em *P. lineatus* podem representar uma via importante na metabolização da CL.

Assim como a β -EST, foi observado um aumento da α -EST no fígado em todas as concentrações de CL, embora no plasma não tenham sido detectadas diferenças na atividade enzimática. Entre as α -EST, destacam-se as paraoxonases (PON), que apresentam ação protetora contra o estresse oxidativo celular (Aviram e Rosenblat, 2004). As PONs são um complexo multienzimático (hidrolase, arilesterase, diaxonase, fosfatase, peroxidase e lactonase) com propriedades antioxidantes, o que impede o aumento da quantidade de ERO e também apresentam efeitos protetores nas membranas celulares (Aşkar e Büyükleblebici, 2012), neutralizando os efeitos da peroxidação lipídica.

Outra β -EST abundante nos peixes é a acetilcolinesterase (AChE) que é responsável pela hidrólise do receptor acetilcolina (ACh). Nossos resultados evidenciaram que a CL promoveu uma redução na atividade da AChE muscular em todas as concentrações avaliadas, mas no cérebro não houve alteração enzimática. A inibição desta enzima leva ao acúmulo de ACh na fenda sináptica que pode levar à interrupção da atividade nervosa pela hiperestimulação dos receptores pós-sinápticos de ACh. Uma vez que o principal local de ação dos piretroides é o sistema nervoso, sua ação pode não estar restrita somente aos canais de Na^+ voltagem dependentes (Breckenridge et al., 2009). Outros estudos têm demonstrado a inibição da AChE em peixes expostos à CL, tais como *O. niloticus* (Piner e Ünner, 2014) e *C. punctatus* (Kumar et al., 2009), além de outros piretróides, como a cipermetrina (Reddy e Philip, 1994; Kumar et al., 2009), deltametrina (Szegetes et al., 1995) e fenvalerato (Mushigeri e David, 2005).

Um mecanismo de ação secundário de piretroides proposto está relacionado às desordens osmorregulatórias, visto que estes compostos podem afetar canais de cálcio e as enzimas Ca^{2+} e Mg^{2+} -ATPases (Narahashi, 1991; Coats, 2008). No presente trabalho, todas as ATPases branquiais foram afetadas pela exposição à CL, nas concentrações mais elevadas do inseticida. Uma inibição da CaATP foi evidenciada a partir da concentração de 50 ng.L^{-1} , enquanto a MgATP apresentou inibição em CL 250 e CL 500. Em teleósteos dulcícolas, a homeostase do Ca^{2+} ocorre, em parte, através da aquisição do Ca^{2+} do ambiente circundante, e de particular importância é o movimento transbranquial do cátion divalente, que se acredita ocorrer principalmente em todas as células ricas em mitocôndrias (Marshall 2002, Evans et al., 2005). Embora a CaATPase do sistema de absorção iônica branquial em situações normais não seja fator limitante para a tomada de Ca^{2+} (Perry, 1997), a atividade deste transportador branquial é fundamental para a manutenção dos níveis calcêmicos plasmáticos. Nossos resultados demonstraram que a inibição da CaATPase resultou em hipocalcemia na maior concentração de CL e, portanto, este piretroide pode promover desajustes osmo-iônicos em peixes. Similarmente, ocorreu uma inibição MgATP nas concentrações mais elevadas, embora os níveis de Mg^{2+} tenham se mantido inalterados. Sabe-se que além da via alimentar, o Mg^{2+} pode ser absorvido ativamente nas brânquias através de processos ainda não totalmente elucidados (Bijvelds et al., 1998; Marshall, 2002).

Por outro lado, um aumento significativo na atividade da NKA foi observado em CL 500. A bomba de sódio potássio é responsável pela geração do gradiente eletroquímico que favorece a entrada de Na^+ pela membrana apical das células de cloreto (CC) branquiais, e a redução de sua atividade deve resultar em alterações na concentração deste íon (Ahern e Morris, 1999; Rogers et al., 2003, 2005). Os dados osmorregulatórios obtidos após a exposição à CL permitem inferir que, em resposta ao estresse, houve um aumento da perfusão branquial, levando ao maior influxo de água, concomitante à perda de íons. Os dados iônicos e a diminuição do hematócrito evidenciam o ganho de água dos animais, o que pode ter contribuído para o aumento da atividade da NKA branquial como uma resposta adaptativa, visando o aumento da captação ativa do Na^+ . Resultados semelhantes foram observados por Moraes e colaboradores (2018) no peixe *B. amazonicus* expostos à cipermetrina, e segundo os autores, o aumento da NKA branquial pode ter sido decorrente da proliferação de CC como um efeito do aumento dos níveis séricos de cortisol. Peixes expostos a piretroides demonstraram respostas secundárias associadas ao aumento do cortisol, como observado em *C. gariepinus* exposto à deltametrina (Datta e Kaviraj, 2003); em *Heteropneustes fossilis* exposto à cipermetrina (Saha e Kaviraj, 2009) e em *Channa punctatus* exposto à CL e à cipermetrina (Kumar et al., 2012) e em *C. carpio* exposto à ciflutrina (Sepici-Dinçel et al., 2009).

Além de todos esses efeitos decorrentes da exposição à CL, danos no DNA em eritrócitos de *P. lineatus* foram detectados em todas as concentrações, demonstrando o efeito genotóxico deste piretroide mesmo em baixas concentrações. Diferentes trabalhos relatam o efeito genotóxico de piretroides em peixes. Ansari et al., 2011 afirmam que a cipermetrina tem potencial clastogênico em *C. punctatus*, e relacionam o efeito genotóxico do inseticida aos ataques oxidativos das ERO. Adicionalmente, estes autores constataram aumento de micronúcleos (MN) e de peroxidação lipídica (LPO) em eritrócitos, e aberrações cromossômicas (como quebra de cromossomos e cromátides) em células renais. Çavas e Ergene-Gözükara (2003) também verificaram um aumento na frequência de MN no peixe *Garra rufa* exposto à CL. Em *P. lineatus* expostos à cipermetrina foram evidenciados danos no DNA em eritrócitos pelo teste do cometa (Simoniello et al., 2009) e em hepatócitos de *Danio rerio* expostos ao mesmo inseticida (Jin et al., 2011). Em conjunto, estes resultados confirmam o potencial genotóxico de piretroides em peixes e

estes efeitos podem refletir em doenças carcinogênicas e anormalidades morfológicas, que afetam a aptidão física, adaptabilidade e sobrevivência dos animais (Jha, 2008).

Em conjunto, nossos resultados indicam que a espécie *P. lineatus* mostrou-se bastante sensível aos efeitos da exposição à CL. Apesar das baixas concentrações de CL e do curto tempo de exposição, este piretróide provocou ajustes hematológicos, estresse oxidativo, distúrbios na osmoregulação, prejuízos na transmissão neural e danos no DNA em *P. lineatus*. Tendo em vista o aumento global na utilização de piretróides e as características destes xenobióticos, é esperado um aumento das concentrações ambientais de CL levando à exposição crônica de peixes. As consequências ecológicas desta exposição podem ser drásticas, tendo em vista que as deficiências relatadas podem ser refletidas em vários parâmetros ecológicos relacionados ao comportamento, resistência a doenças, crescimento e reprodução, que precisam ser investigados em estudos futuros. Por fim, os mecanismos de metabolização da CL em *P. lineatus* precisam ser melhor caracterizados, contribuindo para a melhor compreensão dos efeitos tóxicos de piretróides em peixes.

5.5 REFERÊNCIAS

- Ahern, M. D., & Morris, S. (1998). Accumulation of lead and its effects on Na⁺ balance in the freshwater crayfish *Cherax destructor*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 281(4), 270-279.
- Alak, G., Atamanalp, M., Kocaman, E. M., Ucar, A., Arslan, H., & Parlak, V. (2013). Effects of lambda-cyhalothrin on the antioxidant enzyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fresenius Environmental Bulletin*, 22(2), 461-463.
- Alves-Costa, J. R. M., Mela, M., de Assis, H. C. D. S., Pelletier, É., Randi, M. A. F., & de Oliveira Ribeiro, C. A. (2007). Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(1), 82-88.
- Amin, K. A., & Hashem, K. S. (2012). Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *BMC veterinary research*, 8(1), 45.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2009). Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, 182(1), 7-20.

- Ansari, R. A., Rahman, S., Kaur, M., Anjum, S., & Raisuddin, S. (2011). In vivo cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(1), 150-156.
- Aşkar, T. K., & Büyükleblebici, O. (2012). Paraoxonase: a new biochemical marker of oxidant-antioxidant status in atherosclerosis. In *Oxidative Stress-Molecular Mechanisms and Biological Effects*. InTech.
- Aviram, M., & Rosenblat, M. (2004). Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(9), 1304-1316.
- Bacchetta, C., Cazenave, J., & Parma, M. J. (2011). Responses of biochemical markers in the fish *Prochilodus lineatus* exposed to a commercial formulation of endosulfan. *Water, Air, & Soil Pollution*, 216(1-4), 39-49.
- Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M. J., & Cazenave, J. (2014). Combined toxicological effects of pesticides: a fish multi-biomarker approach. *Ecological indicators*, 36, 532-538.
- Bainy, A. C., Woodin, B. R., & Stegeman, J. J. (1999). Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir-São Paulo, Brazil. *Aquatic Toxicology*, 44(4), 289-305.
- Barrionuevo, W. R., & Lanças, F. M. (2001). Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Química Nova*, 24(2), 172-175.
- Barron, M. G., Charron, K. A., Stott, W. T., & Duvall, S. E. (1999). Tissue carboxylesterase activity of rainbow trout. *Environmental toxicology and chemistry*, 18(11), 2506-2511.
- Beutler, E. (1963). Improved method for determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61(5), 882-888.
- Beutler, E. (1975). *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. Grune & Stratton.
- Bijvelds, M. J., Velden, J. A., Kolar, Z. I., & Flik, G. (1998). Magnesium transport in freshwater teleosts. *Journal of Experimental Biology*, 201(13), 1981-1990.
- Borges, A., Scotti, L. V., Siqueira, D. R., Zanini, R., do Amaral, F., Jurinitz, D. F., & Wassermann, G. F. (2007). Changes in hematological and serum biochemical values in jundiá *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cypermethrin. *Chemosphere*, 69(6), 920-926.
- Bradbury, S. P., & Coats, J. R. (1989). Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 133-177). Springer, New York, NY.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- BRASIL (2018). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Relatório de produtos formulados. 2018. Disponível em:

- <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.> Acesso em: 23/02/2018.
- Camejo, G., Wallin, B., & Enojärvi, M. (1998). Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In *Free radical and antioxidant protocols* (pp. 377-387). Humana Press.
- Campana, M. A., Panzeri, A. M., Moreno, V. J., & Dulout, F. N. (1999). Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 438(2), 155-161.
- Carriquiriborde, P., Díaz, J., López, G. C., Ronco, A. E., & Somoza, G. M. (2009). Effects of cypermethrin chronic exposure and water temperature on survival, growth, sex differentiation, and gonadal developmental stages of *Odontesthes bonariensis* (Teleostei). *Chemosphere*, 76(3), 374-380.
- Casida, J. E., Gammon, D. W., Glickman, A. H., & Lawrence, L. J. (1983). Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 23(1), 413-438.
- Lawrence, L. J., & Casida, J. E. (1982). Pyrethroid toxicology: mouse intracerebral structure-toxicity relationships. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18(1), 9-14.
- Çavaş, T., & Ergene-Gözükara, S. (2003). Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1), 93-99.
- Cengiz, E. I. (2006). Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22(2), 200-204.
- Clasen, B., Loro, V. L., Murussi, C. R., Tiecher, T. L., Moraes, B., & Zanella, R. (2018). Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. *The Science of the total environment*, 626, 737-743.
- Coats, J. R. (2008). Toxicology of synthetic pyrethroid insecticides in fish: a case study. *The toxicology of fishes*. CRC Press, Boca Raton, 805-817.
- Datta, M., & Kaviraj, A. (2003). Ascorbic acid supplementation of diet for reduction of deltamethrin induced stress in freshwater catfish *Clarias gariepinus*. *Chemosphere*, 53(8), 883-888.
- Demoute, J. P. (1989). A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pest Management Science*, 27(4), 375-385.
- Dinu, D., Marinescu, D., Munteanu, M. C., Staicu, A. C., Costache, M., & Dinischiotu, A. (2010). Modulatory effects of deltamethrin on antioxidant defense mechanisms and lipid peroxidation in *Carassius auratus gibelio* liver and intestine. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 58(3), 757-764.
- Domagalski, J. L., Weston, D. P., Zhang, M., & Hladik, M. (2010). Pyrethroid insecticide concentrations and toxicity in streambed sediments and loads in surface waters of

- the San Joaquin Valley, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(4), 813-823.
- Edwards, R., Millburn, P., & Hutson, D. H. (1986). Comparative toxicity of cis-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse, and quail. *Toxicology and applied pharmacology*, 84(3), 512-522.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Ensibi, C., Hernández-Moreno, D., Míguez Santiyán, M. P., Yahya, D., Néjib, M., Rodríguez, F. S., & Pérez-López, M. (2014). Effects of carbofuran and deltamethrin on acetylcholinesterase activity in brain and muscle of the common carp. *Environmental toxicology*, 29(4), 386-393.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85(1), 97-177.
- Fetoui, H., Garoui, E. M., Makni-ayadi, F., & Zeghal, N. (2008). Oxidative stress induced by lambda-cyhalothrin (LTC) in rat erythrocytes and brain: attenuation by vitamin C. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(2), 225-231.
- Fraga, A.S. (2010). *Acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, carboxilesterase e a resistência de peixes neotropicais aos pesticidas organofosforados*. PhD Thesis. Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil. 98 p.
- Glickman, A. H., Hamid, A. A., Rickert, D. E., & Lech, J. J. (1981). Elimination and metabolism of permethrin isomers in rainbow trout. *Toxicology and applied pharmacology*, 57(1), 88-98.
- Glickman, A. H., Shono, T., Casida, J. E., & Lech, J. J. (1979). In vitro metabolism of permethrin isomers by carp and rainbow trout liver microsomes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 27(5), 1038-1041.
- Goulding, A. T., Shelley, L. K., Ross, P. S., & Kennedy, C. J. (2013). Reduction in swimming performance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following sublethal exposure to pyrethroid insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 157(3), 280-286.
- Gu, B. G., Wang, H. M., Chen, W. L., Cai, D. J., & Shan, Z. J. (2007). Risk assessment of λ -cyhalothrin on aquatic organisms in paddy field in China. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 48(1), 69-74.
- Hai, D. Q., Varga, S. I., & Matkovichs, B. (1997). Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology*, 117(1), 83-88.
- Haverinen, J., & Vornanen, M. (2014). Effects of deltamethrin on excitability and contractility of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 159, 1-9.

- Haya, K. (1989). Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8(5), 381-391.
- He, L. M., Troiano, J., Wang, A., & Goh, K. (2008). Environmental chemistry, ecotoxicity, and fate of lambda-cyhalothrin. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 71-91). Springer New York.
- Hinton, D. E. (1990). Integrative histopathological effects of environmental stressor on fishes. In *American Fisheries Society Symposium* (Vol. 8, pp. 51-66).
- Hopkins, J., & Tudhope, G. R. (1973). Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *British Journal of Haematology*, 25(5), 563-575.
- Hubatsch, I., Ridderström, M., & Mannervik, B. (1998). Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochemical Journal*, 330(1), 175-179.
- Hunt, L., Bonetto, C., Resh, V. H., Buss, D. F., Fanelli, S., Marrochi, N., & Lydy, M. J. (2016). Insecticide concentrations in stream sediments of soy production regions of South America. *Science of the Total Environment*, 547, 114-124.
- Hussey, A. J., Kerr, L. A., Cronshaw, A. D., Harrison, D. J., & Hayes, J. D. (1991). Variation in the expression of Mu-class glutathione S-transferase isoenzymes from human skeletal muscle. Evidence for the existence of heterodimers. *Biochemical journal*, 273(2), 323-332.
- Jabeen, F., Chaudhry, A. S., Manzoor, S., & Shaheen, T. (2015). Examining pyrethroids, carbamates and neonicotinoids in fish, water and sediments from the Indus River for potential health risks. *Environmental monitoring and assessment*, 187(2), 29.
- Jha, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), 207-221.
- Jin, Y., Zheng, S., Pu, Y., Shu, L., Sun, L., Liu, W., & Fu, Z. (2011). Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 82(3), 398-404.
- Kaur, M., Atif, F., Ansari, R. A., Ahmad, F., & Raisuddin, S. (2011). The interactive effect of elevated temperature on deltamethrin-induced biochemical stress responses in *Channa punctata* Bloch. *Chemico-biological interactions*, 193(3), 216-224.
- Keen, J. H., Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1976). Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183-6188.
- Kono, Y., & Fridovich, I. (1983). Inhibition and reactivation of Mn-catalase. Implications for valence changes at the active site manganese. *Journal of Biological Chemistry*, 258(22), 13646-13648.
- Kumar, A., Rai, D. K., Sharma, B., & Pandey, R. S. (2009). λ -cyhalothrin and cypermethrin induced in vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide biochemistry and physiology*, 93(2), 96-99.

- Kumar, A., Sharma, B., & Pandey, R. S. (2012). Assessment of stress in effect to pyrethroid insecticides, λ -cyhalothrin and cypermethrin, in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 58(1), 153-159.
- Kumar, A., Sharma, B., & Pandey, R. S. (2014). λ -Cyhalothrin and cypermethrin induce stress in the freshwater muddy fish, *Clarias batrachus*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 96(1), 136-149.
- Kutluyer, F., Erişir, M., Benzer, F., Öğretmen, F., & Inanan, B. E. (2015). The in vitro effect of Lambda-cyhalothrin on quality and antioxidant responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. *Environmental toxicology and pharmacology*, 40(3), 855-860.
- Langiano, V.C., & Martinez, C. B. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147(2), 222-231.
- Li, S. N., & Fan, D. F. (1997). Activity of esterases from different tissues of freshwater fish and responses of their isoenzymes to inhibitors. *Journal of toxicology and environmental health*, 51(2), 149-157.
- Lofty, H. M., El, A. E. A. A. A., & Monir, H. H. (2013). Determination of insecticides malathion and lambda-cyhalothrin residues in zucchini by gas chromatography. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 51(2), 255-260.
- Loteste, A., Scagnetti, J., Simoniello, M. F., Campana, M., & Parma, M. J. (2013). Hepatic enzymes activity in the fish *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) after sublethal cypermethrin exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(5), 601-604.
- Maduenho, L. P., & Martinez, C. B. (2008). Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(3), 265-272.
- Marino, D., & Ronco, A. (2005). Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 75(4), 820-826.
- Marshall, W. S. (2002). Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 293(3), 264-283.
- Maund, S. J., Hamer, M. J., Warinton, J. S., & Kedwards, T. J. (1998). Aquatic ecotoxicology of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin: considerations for higher-tier aquatic risk assessment. *Pest Management Science*, 54(4), 408-417.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- Miranda, K., Cunha, M. L., Dores, E. F., & Calheiros, D. F. (2008). Pesticide residues in river sediments from the Pantanal Wetland, Brazil. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 43(8), 717-722.

- Mishra, D., Srivastav, S. K., & Srivastav, A. K. (2005). Effects of the insecticide cypermethrin on plasma calcium and ultimobranchial gland of a teleost, *Heteropneustes fossilis*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(2), 193-197.
- Modesto, K. A., & Martinez, C. B. (2010a). Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81(6), 781-787.
- Modesto, K. A., & Martinez, C. B. (2010b). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78(3), 294-299.
- Montanha, F. P., Fredianelli, A. C., Wagner, R., Sacco, S. R., Rocha, D. C. C., & Pimpão, C. T. (2014). Clinical, biochemical and haemathological effects in *Rhamdia quelen* exposed to cypermethrin. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66(3), 697-704.
- Moraes, F. D., Venturini, F. P., Rossi, P. A., Avilez, I. M., de Souza, N. E. D. S., & Moraes, G. (2018). Assessment of biomarkers in the neotropical fish *Brycon amazonicus* exposed to cypermethrin-based insecticide. *Ecotoxicology*, 1-10.
- Moreno, N. C., Sofia, S. H., & Martinez, C. B. (2014). Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(1), 448-454.
- Muranli, F. D. G., & Güner, U. (2011). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(2), 104-108.
- Mushigeri, S. B., & David, M. (2005). Fenvalerate induced changes in the Ach and associated AchE activity in different tissues of fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) under lethal and sub-lethal exposure period. *Environmental toxicology and pharmacology*, 20(1), 65-72.
- Narahashi, T. (1991). Transmitter-activated ion channels as the target of chemical agents. In *Neuroreceptor Mechanisms in Brain* (pp. 61-73). Springer, Boston, MA.
- Parma de Croux, M. J.P., Loteste, A., & Cazenave, J. (2002). Inhibition of plasma cholinesterase and acute toxicity of monocrotophos in a neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(3), 356-363.
- Paulino, M. G., Souza, N. E. S., & Fernandes, M. N. (2012). Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 6-13.
- Pereira, L., Fernandes, M. N., & Martinez, C. B. (2013). Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(1), 1-8.

- Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., & Barja, G. (1993). A comparative study of free radicals in vertebrates--I. Antioxidant enzymes. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 105(3-4), 749-755.
- Perry, S. F. (1997). The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annual Review of Physiology*, 59(1), 325-347.
- Pimpao, C. T., Zampronio, A. R., & De Assis, H. S. (2007). Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(2), 122-127.
- Piner, P., & Üner, N. (2012). Oxidative and apoptotic effects of lambda-cyhalothrin modulated by piperonyl butoxide in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 33(3), 414-420.
- Piner, P., & Üner, N. (2014). Neurotoxic effects of lambda-cyhalothrin modulated by piperonyl butoxide in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental toxicology*, 29(11), 1275-1282.
- Polat, H., Erkoç, F. Ü., Viran, R., & Koçak, O. (2002). Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*, 49(1), 39-44.
- Poletta, G. L., Gigena, F., Loteste, A., Parma, M. J., Kleinsorge, E. C., & Simoniello, M. F. (2013). Comet assay in gill cells of *Prochilodus lineatus* exposed in vivo to cypermethrin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(3), 385-390.
- Possavatz, J., Zeilhofer, P., Alves Pinto, A., Tives, A. L., & Freire Gaspar de Carvalho Dores, E. (2014). Resíduos de pesticidas em sedimento de fundo de rio na Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 9(1).
- Prusty, A. K., Kohli, M. P. S., Sahu, N. P., Pal, A. K., Saharan, N., Mohapatra, S., & Gupta, S. K. (2011). Effect of short term exposure of fenvalerate on biochemical and haematological responses in *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Pesticide biochemistry and physiology*, 100(2), 124-129.
- Quabius, E. S., Balm, P. H., & Bonga, S. E. W. (1997). Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *General and comparative endocrinology*, 108(3), 472-482.
- Ramadhas, M., Palanisamy, K., Sudhagar, M., & Mani, V. M. (2014). Ameliorating effect of *Phoenix dactylifera* on lambda cyhalothrin induced biochemical, hematological and hepatopathological alterations in male wistar rats. *Biomedicine & Aging Pathology*, 4(3), 273-279.
- Reddy, P. M., & Philip, G. H. (1994). In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 52(4), 619-626.
- Rogers, J. T., Patel, M., Gilmour, K. M., & Wood, C. M. (2005). Mechanisms behind Pb-induced disruption of Na⁺ and Cl⁻ balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(2), 463-472.

- Rogers, J. T., Richards, J. G., & Wood, C. M. (2003). Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, *64*(2), 215-234.
- Ruas, C. B. G., dos Santos Carvalho, C., de Araújo, H. S. S., Espíndola, E. L. G., & Fernandes, M. N. (2008). Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *71*(1), 86-93.
- Saha, S., & Kaviraj, A. (2008). Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *80*(1), 49-52.
- Santos, T. G., & Martinez, C. B. (2012). Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, *89*(9), 1118-1125.
- Saxena, K. K., & Seth, N. (2002). Toxic effects of cypermethrin on certain hematological aspects of fresh water fish *Channa punctatus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *69*(3), 364-369.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., & Raisuddin, S. (2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and environmental safety*, *56*(2), 295-301.
- Sepici-Dinçel, A., Benli, A. Ç. K., Selvi, M., Sarıkaya, R., Şahin, D., Özkul, I. A., & Erkoç, F. (2009). Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *72*(5), 1433-1439.
- Sharma, R., Yang, Y., Sharma, A., Awasthi, S., & Awasthi, Y. C. (2004). Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxidants and Redox Signaling*, *6*(2), 289-300.
- Simoniello, M. F., Gigena, F., Poletta, G., Loteste, A., Kleinsorge, E., Campana, M., ... & Parma, M. J. (2009). Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *83*(2), 155-158.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, *175*(1), 184-191.
- Singhal, S. S., Zimniak, P., Awasthi, S., Piper, J. T., He, N. G., Teng, J. I., ... & Awasthi, Y. C. (1994). Several closely related glutathione S-transferase isozymes catalyzing conjugation of 4-hydroxynonenal are differentially expressed in human tissues. *Archives of biochemistry and biophysics*, *311*(2), 242-250.
- Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual review of entomology*, *34*(1), 77-96.
- Sogorb, M. A., & Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology letters*, *128*(1-3), 215-228.

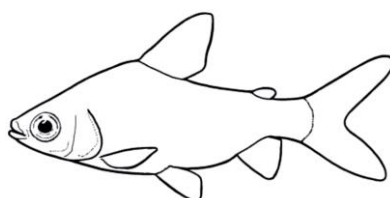
- Stehle, S., & Schulz, R. (2015). Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5750-5755.
- Szegletes, T., Balint, T., Szegletes, Z. S., & Nemcsok, J. (1995). In vivo effects of deltamethrin exposure on activity and distribution of molecular forms of carp AChE. *Ecotoxicology and environmental safety*, 31(3), 258-263.
- US EPA, Retrieved 13.02.13. http://npic.orst.edu/factsheets/l_cyhalogen.pdf 2001. Lambda-cyhalothrin factsheet. National Pesticide Telecommunications Network (Oregon State University and the U.S. Environmental Protection Agency).
- Velisek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodova, Z., Dobsikova, R., Novotny, L., & Dudzik, M. (2006). Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *VETERINARNI MEDICINA-PRAHA*, 51(10), 469.
- Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E. I., & Unlu, E. (2007). Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(3), 286-291.
- Vieira, C. E. D., Pérez, M. R., Acayaba, R. D. A., Raimundo, C. C. M., & dos Reis Martinez, C. B. (2018). DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 195, 125-134.
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., & Balasubramanian, M. P. (2007). Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere*, 69(6), 979-986.
- Vijverberg, H. P., & vanden Bercken, J. (1990). Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Critical reviews in toxicology*, 21(2), 105-126.
- Viran, R., Erkoç, F. Ü., Polat, H., & Koçak, O. (2003). Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 55(1), 82-85.
- Vontas, J. G., Graham, J., Nikou, D. C., Ranson, H., & Hemingway, J. (2002). Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, 362(2), 329-337.
- Wendelaar Bonga, S. E. (2011). Hormonal responses to stress. *Encyclopedia of fish: fish physiology from genome to environment*, 2, 1515-1523.
- Weston, D. P., & Lydy, M. J. (2012). Stormwater input of pyrethroid insecticides to an urban river. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(7), 1579-1586.
- Weston, D. P., Holmes, R. W., & Lydy, M. J. (2009). Residential runoff as a source of pyrethroid pesticides to urban creeks. *Environmental Pollution*, 157(1), 287-294.
- Wheelock, C. E., Shan, G., & Ottea, J. (2005). Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *Journal of Pesticide Science*, 30(2), 75-
- Yang, Y., Cheng, J. Z., Singhal, S. S., Saini, M., Pandya, U., Awasthi, S., & Awasthi, Y. C. (2001). Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation

overexpression of HGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19220-19230.

Yekeen, T. A., Fawole, O. O., & Bakare, A. A. (2013). Evaluation of toxic effects of lambda-cyhalothrin on the haematology and selected biochemical parameters of African catfish *Clarias gariepinus*. *Zoology and Ecology*, 23(1), 45-52.

Capítulo VI

Artigo



Artigo publicado no periódico *Chemosphere* (198) 2018, 125 -134 (Anexo)

DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*

Carlos Eduardo Delfino Vieira^{1*}; Maria Rita Pérez²; Raphael D'Anna Acayaba³, Cassiana Carolina Montagner Raimundo³; Cláudia Bueno dos Reis Martinez¹

¹Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

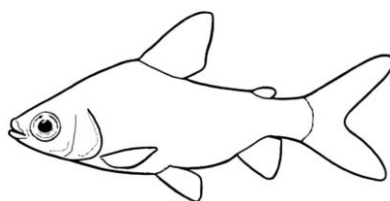
²Laboratorio de Ictiología, Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL), Santa Fe, Argentina.

³Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade de Campinas, São Paulo, Brasil

Neste trabalho investigamos os efeitos do inseticida neonicotinóide imidacloprid (IMI) em concentrações ambientalmente realistas (1.25, 12.5, 125 e 1.250 $\mu\text{g.L}^{-1}$) para o peixe *P. lineatus*. A exposição ao IMI promoveu alterações nos perfis enzimáticos de *P. lineatus*, como na atividade de enzimas biotransformação e defesas antioxidantes, em diferentes tecidos. Após 120 h de exposição, os peixes expostos a todas as concentrações de IMI apresentaram uma resposta hipoglicêmica. O equilíbrio redox dos tecidos foi afetado, visto a ocorrência de lipoperoxidação (LPO) e carbonilação de proteínas (PCC) no fígado, brânquia, rim e cérebro dos peixes expostos as diferentes concentrações de IMI. Danos no DNA nos eritrócitos também foram verificados por meio do teste do cometa, em todas as concentrações avaliadas. Os resultados foram integrados no índice Integrado de Resposta ao Biomarcador (IBR), que indicou que os órgãos mais afetados pela exposição ao IMI foram o fígado e o rim, seguidos pelas brânquias. Nossos resultados destacaram a importância de investigar diferentes tecidos após exposição ao IMI e também alertam para as possíveis consequências em peixes que vivem em ecossistemas de água doce susceptíveis à contaminação pelo IMI.

Capítulo VII

Considerações finais



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este último capítulo sintetiza as principais conclusões e alguns comentários derivados dos estudos realizados nesta tese.

Nos Capítulos II, III e IV utilizamos o biomonitoramento ativo, uma abordagem ainda pouco empregada em regiões tropicais para avaliação da qualidade ambiental. As vantagens desta abordagem incluem: o conhecimento da duração exata do tempo de exposição, a padronização do organismo teste (tamanho, sexo, idade, estágio de desenvolvimento reprodutivo), o confinamento *in situ* de espécies no local exato que se pretende investigar, possibilitando assim a comparação entre diferentes locais de exposição. Por outro lado, algumas desvantagens desta metodologia estão associadas ao estresse promovido pelo confinamento e manipulação dos peixes, que pode levar a confusão e falsa interpretação de alguns resultados. Assim, neste estudo, buscamos também elucidar os possíveis efeitos associados ao confinamento e manipulação através da comparação indireta das respostas dos peixes confinados *in situ* com as respostas basais desta espécie, ou seja, antes do confinamento. Estas observações foram imprescindíveis para a interpretação de alguns resultados. De maneira geral, o confinamento e a manipulação periódica em ambos os locais de exposição (REF e EXP) pode ter promovido alterações fisiológicas relacionadas ao estresse, como a ocorrência de LPO e PCC, diminuição do fator de condição geral, perda de peso e redução da resistência natatória (em comparação com as respostas basais). Entretanto, nos peixes confinados em EXP vários parâmetros mostraram-se aumentados em relação à REF, mantidos sobre as mesmas condições de confinamento. Contudo, após o período de 60 dias uma possível melhoria nas condições experimentais, relacionado à diminuição da densidade, diminuição da competição e maior disponibilidade de alimento dentro dos tanques podem ter sido fatores determinantes para “recuperação” da condição de saúde dos animais REF, haja vista a diminuição nos níveis de danos oxidativos, maior estocagem de energia na forma de glicogênio, recuperação moderada do FC e da resistência natatória, próximos aos níveis basais, além da maior taxa de crescimento em relação aos peixes mantidos no local EXP. Por outro lado, os animais confinados no local EXP apresentaram efeitos deletérios mesmo após esse período (t60) e assim, pudemos evidenciar de forma mais clara os efeitos de estressores químicos sobre as respostas biológicas dos peixes. De fato, o local experimental

apresentou as maiores concentrações dos agrotóxicos e metais analisados no sedimento e a bioacumulação temporal de OCPs no fígado destes peixes corrobora a contaminação do ambiente. Nesta perspectiva, os efeitos destes multi-estressores (físicos e químicos) foram mais proeminentes nos animais mantidos em EXP, que, de maneira geral, apresentaram danos oxidativos, genéticos e histológicos ao longo de todo o período de exposição.

Possivelmente, o custo da manutenção da homeostase nos peixes confinados em EXP conduziu à uma maior mobilização de recursos energéticos para os mecanismos de defesa e adaptação, em detrimento da mobilização de energia para atividade, crescimento e reprodução. Assim, funções relacionadas à sobrevivência e aptidão destes animais podem ter sido comprometidas e prejuízos em níveis mais elevados de organização biológica podem surgir. Todavia, vale ressaltar, que a interpretação dos resultados de campo é sempre muito complexa, pois um grande número de fatores pode influenciar as variáveis analisadas de maneira não controlada.

No que tange aos contaminantes ambientais detectados, observamos a ocorrência de OCPs, sobretudo no sedimento, que representa um reservatório para estes e diversos outros contaminantes. Estes compostos foram banidos do mercado de produção agrícola já há algum tempo, mas ainda estão presentes na natureza devido à sua alta persistência ambiental, passíveis de entrarem nas cadeias tróficas. *P. lineatus* possui a particular característica de iliofagia, e a ingestão de sedimentos contaminados com OCPs pode ter levado a bioacumulação via trófica destes xenobióticos. Como já discutido, OCPs e particularmente o endossulfan são compostos prejudiciais para os organismos, incluindo os peixes, e muitos dos efeitos observados podem ser decorrentes da exposição e bioacumulação deste agrotóxico. Além dos OCPs, CUPs de ampla utilização local e mundial também foram detectados, tais como a atrazina, o 2,4-D, carbendazim e o fipronil. Apesar das baixas concentrações destes compostos na água, é importante ressaltar que as análises químicas foram realizadas de forma periódica, concomitante às amostragens e, portanto, forneceram uma “fotografia” das características locais naquele momento. Em outras palavras, picos de aumento das concentrações de agrotóxicos, a dinâmica de entrada e saída e as flutuações temporais desses compostos na água podem não ter sido contemplados em sua totalidade. Compreender a dinâmica do ambiente ao longo do tempo é um grande desafio, que muitas vezes se torna metodológica e financeiramente inviável. Neste contexto, a utilização de amostradores passivos que registram todo o

histórico de contaminação do ambiente podem ser uma boa alternativa em estudos de monitoramento ambiental e surge como uma metodologia mais ambientalmente relevante, embora ainda pouco difundida e utilizada em ambientes aquáticos tropicais. Análises químicas que englobem uma maior gama de contaminantes devem ser realizadas, tanto em amostras de água e sedimento dos locais, em diferentes épocas do ano, a fim de se estabelecer uma melhor relação destes compostos com as respostas biológicas dos organismos, e compreender os potenciais efeitos destas misturas presentes nos ambientes aquáticos.

Outro objetivo dos estudos de campo foi avaliar a ocorrência de metais em água e sedimentos dos corpos d'água, o potencial de bioacumulação destes contaminantes em vários órgãos dos peixes e os possíveis efeitos na osmorregulação e morfologia das brânquias e rim posterior. Os resultados indicaram a presença de maiores concentrações de metais nos sedimentos do local EXP, com destaque para o Cu, de longe o metal mais abundante no sedimento. Nos tecidos, o Cu também foi o metal mais abundante e o fígado foi o órgão que apresentou a maior concentração total de metais. Entretanto, com exceção das brânquias, não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de metais nos diferentes órgãos de *P. lineatus* entre os locais REF e EXP, indicando que as diferenças nas concentrações de metais entre os dois ambientes podem não ter sido suficientemente grandes para promover maior acumulação nos peixes confinados em EXP; além de outros fatores discutidos no manuscrito.

Os resultados laboratoriais precisam ser extrapolados para o campo e, muitas vezes, esta extrapolação é difícil, pois as condições ambientais podem ser consideravelmente diferentes, os contaminantes ocorrem como misturas complexas e, portanto, os contaminantes podem interagir entre si e com os outros componentes abióticos. Portanto, é necessário desenvolver e validar metodologias para serem usadas em cenários reais, preferencialmente com organismos autóctones para aumentar a relevância ecológica das avaliações.

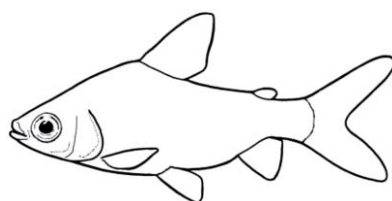
As alterações bioquímicas, genéticas e histológicas observadas neste trabalho, podem interferir, à longo prazo, em níveis mais elevados de organização biológica e de maior relevância ecológica, como alterações comportamentais, reprodutivas e na sobrevivência, que direta ou indiretamente interferem no *fitness* e sobrevivência da espécie em seu ambiente natural.

Em conjunto, os resultados deste trabalho alertam para deterioração da qualidade dos nossos corpos hídricos e para o comprometimento da saúde dos peixes confinados nestes locais. Estes resultados contribuíram para a compreensão dos efeitos à curto e médio prazo de agrotóxicos sobre espécies de peixes em condições de campo, e também destacaram os biomarcadores mais sensíveis à curto prazo (bioquímicos), daqueles que responderam melhor em tempos mais prolongados (bioacumulação, danos histológicos e danos cumulativos ao DNA), e que, portanto, podem ser incorporados e utilizados confiavelmente em programas de monitoramento e gestão de corpos d'água em áreas agrícolas em diferentes contextos de estudo.

Os resultados dos testes em laboratório, em conjunto, demonstraram que os inseticidas de uso atual IMI e CL podem promover efeitos deletérios em peixes, em baixas concentrações, passíveis de serem encontradas nos ambientes naturais. Entre os efeitos observados, também destacamos a ocorrência de danos oxidativos e genotóxicos, além de diversas alterações fisiológicas particulares de cada composto. Embora estes contaminantes não tenham sido quantificados em campo em virtude de limitações metodológicas, a presença dos mesmos nos ambientes aquáticos locais não pode ser descartada, visto a crescente utilização destes agrotóxicos nas práticas agrícolas modernas.

Por fim, os biomarcadores mais consistentes nas duas vertentes deste trabalho, frequentemente observados, foram os biomarcadores de efeito – lipoperoxidação (PCO), carbonilação de proteínas (PCC) e danos no DNA (ensaio do cometa). Os biomarcadores de exposição, tais como as enzimas de biotransformação e defesa antioxidante apresentaram maiores variações entre os diferentes grupos e situações experimentais, que podem estar relacionadas com mecanismos adaptativos particulares de cada órgão analisado. Apesar da importância destes biomarcadores, principalmente quando se necessita compreender mecanismos de toxicidade e adaptação dos organismos frente à exposição; para fins de monitoramento e diagnóstico de qualidade ambiental em áreas agrícolas não os mais indicados. Para atender a este objetivo, deve-se então selecionar aqueles biomarcadores mais consistentes e que dão respostas rápidas, tais como os biomarcadores de efeito acima citados.

ANEXOS





DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*



Carlos Eduardo Delfino Vieira^{a,*}, Maria Rita Pérez^b, Raphael D'Anna Acayaba^c,
Cassiana Carolina Montagner Raimundo^c, Cláudia Bueno dos Reis Martinez^a

^a Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil

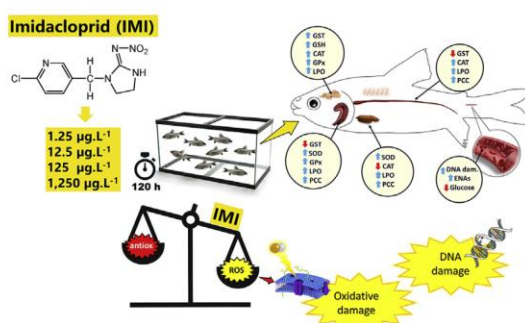
^b Laboratorio de Ictiología, Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL), Santa Fe, Argentina

^c Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade de Campinas, São Paulo, Brazil

HIGHLIGHTS

- We evaluated acute effects of Imidacloprid (IMI) on the fish *Prochilodus lineatus*.
- IMI promoted oxidative damage in different fish tissues.
- IMI promoted hypoglycemia in the exposed fish.
- DNA damage was detected in erythrocytes of fish exposed to IMI.
- Liver, kidney and gill were the most affected organs by IMI exposures.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Handling Editor: David Volz

Keywords:

Neonicotinoids
Acute toxicity
Lipoperoxidation
Protein carbonylation
Genotoxicity

ABSTRACT

Imidacloprid (IMI), a systemic neonicotinoid insecticide widely used in worldwide scale, is reported in freshwater bodies. Nevertheless, there is a lack of information about IMI sublethal effects on freshwater fish. Thus, the aim of this study was to identify the potential hazard of this insecticide to the South American fish *Prochilodus lineatus* exposed for 120 h to four IMI concentrations (1.25, 12.5, 125, and 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$). A set of biochemical, genotoxic and physiological biomarkers were evaluated in different organs of the fish. IMI exposure induced significant changes in the enzymatic profiles of *P. lineatus*, with alterations in the activity of biotransformation and antioxidant enzymes in different tissues. Redox balance of the tissues was affected, since oxidative damage such as lipoperoxidation (LPO) and protein carbonylation (PCC) were evidenced in the liver, gills, kidney and brain of fish exposed to different IMI concentrations. Fish exposed to all IMI concentrations showed decreased blood glucose indicating an increase of energetic demand. DNA damage was evidenced by the comet test, in the erythrocytes of fish all the concentrations evaluated. We integrated these results in the Integrated Biomarker Response (IBR) index, which evidenced that the organs most affected by IMI exposure were the liver and kidney, followed by the gills. Our results highlight the importance of investigating different target tissues after IMI exposure and show the sublethal effects of IMI in some of them; they also warn to the possible consequences that fish living in freshwater ecosystems can suffer due to IMI exposure.

© 2017 Published by Elsevier Ltd.

* Corresponding author. Laboratório de Ecofisiologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, s/n - Campus Universitário, Londrina, PR CP 86057-970, Brazil.

E-mail address: carlosvieira@uenp.edu.br (C.E.D. Vieira).

1. Introduction

Neonicotinoids are one of the most important chemical classes of insecticides due to their high efficacy against a broad spectrum of insects and the versatility of their use, together with the fact that they are potent at low doses, relatively non-volatile, and highly water-soluble (EXTOXNET, 1996; Tomlin, 2000). Today this class of insecticides comprises at least seven major compounds with a market share of more than 25% of total global insecticide sales (Bass et al., 2015) and is replacing older classes such as organophosphate and carbamate insecticides worldwide (Jeschke et al., 2011). Neonicotinoids act selectively on insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), as agonists (Jeschke et al., 2011), competing for these receptors in the postsynaptic membrane (Tomizawa and Casida, 2005; Anderson et al., 2015). Nicotinoids are much more toxic to insects than vertebrates due in part to differences in their interactions with the binding site of receptors (Tomizawa and Casida, 2009). However, Tennekes (2010) and Mason et al. (2012) suggested that neonicotinoid insecticides might be contributing to the decline of insectivorous birds in Europe, and fish, amphibians, bats, and birds around the world.

Imidacloprid (IMI) was the first neonicotinoid launched in 1991 and has become one of the major products in many pest control programs (Jeschke et al., 2011; Goulson, 2013). In Brazil, IMI was the tenth best-selling active ingredient during 2013, with approximately 8 thousand tons of compound sold (IBAMA, 2013). The use of IMI to control terrestrial pests could potentially result in unintended transport to aquatic habitats and indirect contamination through spray drift, atmospheric deposition, soil erosion, and runoff (CCME, 2007). A number of governmental agencies have developed guidelines on the acceptable IMI concentrations in surface water for the protection of aquatic organisms, ranging between 0.0083 (RIVM, 2014), 0.23 (CCME, 2007), and 1.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ (USEPA, 2014). However, several studies have detected IMI concentrations in surface water greater than the guidelines values, in different aquatic environments around the world. Concentrations up to 49 $\mu\text{g L}^{-1}$ were already measured (Starner and Goh, 2012; Main et al., 2014; Gibbons et al., 2015; Struger et al., 2017), although the highest concentrations mentioned above were detected in water bodies close to farming areas (Sánchez-Bayo and Goka, 2005; Van Kijk et al., 2013; Morrissey, 2015). In Brazil, IMI concentrations of 2.18 (Bortoluzzi et al., 2006) and 3.65 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Becker et al., 2009) have already been detected in aquatic environments influenced by agricultural activities. In a study of the risk classification of different neonicotinoids in Brazilian surface waters, Miranda et al. (2011) reported that IMI presents a greater risk of promoting serious effects on non-target organisms compared to other neonicotinoids. Additionally, according to Albuquerque et al. (2016), neonicotinoids together with other currently used insecticides such as fipronil, represent the greatest potential risk to local aquatic environments when compared to other classes of pesticides.

Despite IMI is being reported in surface waters at concentrations below those which will cause mortality to freshwater fish (SERA, 2005; Tisler et al., 2009), sublethal effects may occur, such as physiological stress and DNA damage (Gibbons et al., 2015). However, there is a lack of studies concerning IMI sublethal effects on fish. In this context, the aim of the present study was to evaluate the potentially harmful effects of IMI on biochemical, physiological, and genetic parameters of the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. This fish is an ecologically and economically important benthic species, widely found in rivers of the South and Southeast of Brazil where it comprises a large part of the ichthyomass (Taylor et al., 2006). Besides, *P. lineatus* is commonly used in ecotoxicological studies given its sensitivity to pesticides (Langiano and Martinez, 2008; Modesto and Martinez, 2010; Pereira et al., 2013;

Moreno et al., 2014). Additionally, this species meets the criteria of the OECD (1992) for selection of species for acute toxicity tests.

2. Material and methods

2.1. Fish handling, experimental design, and sampling

Juveniles of *P. lineatus* ($n = 40$; 23.3 ± 4.7 g; 12.6 ± 0.9 cm; mean \pm SD) were supplied by the Fish Hatchery Station of the State University of Londrina. Fish were acclimated for five days in a 300 L tank containing dechlorinated tap water under constant aeration. The room photoperiod was fixed at a 12:12 h light/dark cycle. On the second and fourth days of acclimation, fish were fed with a commercial fish diet containing 36% protein (Guabi, Brazil). Feeding was suspended 24 h prior to the beginning of the experiments and the animals were not fed during the experiments.

After acclimation, the fish were randomly divided into five groups ($n = 8$ fish per group) and maintained in glass aquaria containing 80 L of dechlorinated tap water. One group was kept under control conditions only in clean water (IMIO) and the other four groups were exposed to different nominal concentrations of active ingredient from the commercial formulation of Imidacloprid[®] (48% a. i.- Nortox S.A. Brazil): 1.25 (IMI1.25), 12.5 (IMI12.5), 125 (IMI125), and 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$ (IMI1250) for five days, under static conditions and daily water renewal. Imidacloprid is acutely toxic to adult fishes at relatively high concentrations, over 80 mg L^{-1} ; however, juvenile fishes are considerably more susceptible (Cox, 2001). Thus, the lower IMI concentration tested was defined as an environmentally relevant concentration (1.25 $\mu\text{g L}^{-1}$) and the others were defined from this concentration in geometric progression of ratio 10 to a maximum concentration of 1.25 mg L^{-1} , which would be safe for juveniles of *P. lineatus*.

Water temperature, pH, dissolved oxygen, and conductivity were monitored throughout the experiment using a multiparameter water quality meter (HORIBA U-52, Japan). Every day, water samples (500 mL) were collected from all aquaria for analysis of IMI concentration, before water renewal. Aquaria were partially covered to avoid photo degradation of IMI.

After the exposure period, fish were anesthetized with benzocaine (0.1 g L^{-1}) and blood samples were collected from the caudal vein and processed for comet assay and hematological parameters. After blood sampling fish were quickly sacrificed by medullar sectioning for the removal of liver, gills, posterior kidney, brain, and axial muscle. Organs were immediately stored in liquid nitrogen for biochemical analysis. In addition, subsamples of the liver were processed for comet assay.

Individual tissue samples were homogenized (1:10 w/v) in a phosphate buffer solution (0.1 M; pH 7.0 or 7.5 for AChE analysis). Samples were centrifuged (15,000xg, 20 min, 4 °C) and the supernatants were stored at -80 °C for subsequent biochemical analysis. For all biochemical biomarkers, the protein content was determined according to Bradford (1976).

2.2. Chromatographic analysis of imidacloprid in water samples

Water samples were collected daily during the fish exposure period in clean amber glass bottles and were analyzed without the solid phase extraction (SPE) step. The concentrations of IMI in water samples were determined according to the method validated by Montagner et al. (2014). Quantification of the IMI was performed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The analysis was performed using an Agilent 1200 Series LC system equipped with binary pump, automatic injector, and thermostated column compartment. Chromatographic separation was performed with a Zorbax SB-C18 column (2.1×30 mm,

particle size of 3.5 μm) at 25 °C. The mobile phase consisted of ultrapure water (A) and methanol (B), previously filtered in membranes with 0.2 μm porosity, containing 0.1% formic acid, which favors the formation of ions. The separation occurred in the isocratic elution mode, with a ratio of 70% water to 30% methanol in 3 min. Identification and quantification of imidacloprid was performed by mass spectrometry in an Agilent triple quadrupole device (model 6410B). The imidacloprid was ionized in a positive mode electrospray source and monitored by the MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) mode. The analytical curves were constructed according to the area obtained for each compound as a function of its mass in the column. The limits of detection, quantification, and coefficient of determination (r^2) for IMI were 1.6 $\mu\text{g L}^{-1}$, 5.4 $\mu\text{g L}^{-1}$, and 0.999 respectively.

2.3. Biomarkers

2.3.1. Physiological assays

To determine the hematocrit (Hct), blood was centrifuged (1200xg, 5 min) in a micro-capillary centrifuge (Luguimac S.R.L., Model LC 5, Argentina) and readings were performed using a standardized chart. The number of red blood cells per mm^3 blood (RBC) was counted using an improved Neubauer hemocytometer under a light microscope. The hemoglobin content (Hb) was estimated using the cyanmethemoglobin colorimetric method (commercial kit, Labtest Diagnóstica, Brazil); readings were performed at 540 nm using a spectrophotometer (Libra S32, Biochrom, United Kingdom). Blood samples were centrifuged (1870xg, 10 min), and plasma samples frozen ($-20\text{ }^\circ\text{C}$). Plasma glucose levels were determined using the glucose oxidase method with a commercial kit (Doles Reagentes Ltda, Brazil) at 505 nm (Victor³_{TM}, PerkinElmer, USA). The concentrations of sodium and potassium were determined in plasma samples using a flame photometer (Digimed DM-62, Brazil). Plasma concentrations of chloride were determined using a commercial test kit (Labtest Diagnóstica, Brazil) at 470 nm (Victor³_{TM}, PerkinElmer, USA) and calcium and magnesium concentrations were measured using the flame atomization method with an atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer A700).

2.3.2. Biochemical analysis

Glutathione-S-transferase (GST) activity was determined according to Keen et al. (1976) and adapted for microplates (Gagné, 2014), using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate, at 340 nm. Enzyme activity was expressed as nmol CDNB conjugate formed $\text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$.

Glutathione (GSH) concentration was determined according to Beutler et al. (1963) using 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), at 412 nm against a GSH standard curve. GSH concentration was expressed in $\mu\text{g GSH mg protein}^{-1}$. Copper-zinc superoxide dismutase (CuZn-SOD) activity was determined according to McCord and Fridovich (1969), based on the measurement of the inhibition of the reduction rate of cytochrome c by the superoxide radical, at 550 nm and 25 °C. SOD activity was expressed in SOD units mg protein^{-1} , with one unit of SOD corresponding to the quantity of enzyme that promoted the inhibition of 50% of the reduction rate of cytochrome c. Catalase (CAT) activity was determined according to Beutler (1975), by monitoring the H_2O_2 decomposition at 240 nm. The activity was expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$. Selenium-dependent glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by NADPH oxidation in the presence of GSH and H_2O_2 , at 340 nm (Hopkins and Tudhope, 1973) and was expressed in $\mu\text{mol oxidized NADPH min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$.

Lipid peroxidation (LPO) was determined by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, performed according to

Camejo et al. (1998). TBARS concentrations were expressed in nmol MDA mg protein^{-1} . Oxidative damage to proteins was measured by quantifying the protein carbonyl content (PCC) according to Levine et al. (1994) at 360 nm and the results were expressed in nmol carbonyl $\text{mg}^{-1} \text{protein}^{-1}$.

Subsamples of brain and muscle tissue were used for the AChE assays, according to Ellman et al. (1961) and adapted for microplates (Alves Costa et al., 2007). AChE activity was determined at 415 nm and expressed in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$.

2.3.3. Genotoxic analysis

The alkaline comet assay with erythrocytes and liver cells was performed according to Singh et al. (1988), with some modifications. Liver samples, were mechanical and chemical dissociated, according to Cavalcante et al. (2008). Subsequently, the solution was filtered (30 μm mesh size) into a tube containing fetal bovine serum (FBS), centrifuged (10 min, 1000 \times g) and the cellular pellet was suspended in FBS to be used in the comet assay. For blood samples an aliquot of cellular suspension was also mixed with FBS (1:100).

Cellular suspensions were then mixed in low melting point agarose (0.5%), placed on slides precoated with normal (1%) melting point agarose, covered with coverslips and kept under refrigeration (10 °C) for 40 min. The slides were subjected to: a) lysis: 2 h at 4 °C, protected from light, in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% sodium lauroyl sarcosinate, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10.0); b) DNA denaturation: 30 min in the dark in an electrophoresis buffer (0.3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13, at 4 °C); c) electrophoresis: 20 min, 300 mA, 25 V, 0.7–0.8 V cm^{-1} ; and d) neutralization: three rinses for 5 min each with buffer (0.4 M Tris, pH 7.5). Slides were fixed with absolute ethanol and kept under refrigeration until analyses. Slides were stained with gelRed and analyzed under a Leica microscope (DM 2500) adapted for fluorescence/epifluorescence at 1000x magnification. All slides were blind-reviewed. The extent of DNA damage was quantified by the length of the tail formed by the migration of DNA fragments and classified into four comet classes, according to Vieira et al. (2016). DNA damage score was obtained by multiplying the number of cells in each class by the damage class, and ranged from 0 (all undamaged) to 300 (all maximally damaged).

The micronuclei (MN) test and the erythrocytic nuclear abnormalities (ENA) test were performed according to the technique described by Ueda et al. (1992). A small drop of blood was smeared over the glass slides, dried overnight and were then fixed with methanol. At the time of analysis, each slide was stained with 0.003% acridine orange in Sorenson's buffer at pH 6.8 and immediately analyzed under epifluorescence at 1,000X magnification. For each fish 3000 cells were analyzed, evaluating the presence of micronuclei and ENA (according to Carrasco et al., 1990). ENA were classified into three categories: segmented nucleus, lobulated nucleus, and kidney-shaped nucleus, in addition to the presence of binucleated cells. The mean frequency of MN and ENA, for each group, was calculated and expressed per 1000 cells (%).

2.4. Integrated biomarker response index (IBR)

The biomarker results were applied into the "Integrated Biomarker Response Index" (IBRv2), described by Beliaeff and Burgeot (2002) and modified by Sanchez et al. (2013). This index is based on the principle of reference deviation between a disturbed and undisturbed state (Sanchez et al., 2013). In the present work, the deviation between biomarkers measured in fish exposed for five days to different IMI concentrations, for each organ, were compared to those measured in fish exposed to clean

water (IMIO). For each individual biomarker, the ratio between the mean value obtained at each IMI concentration and the respective reference control value (IMIO) was log-transformed (Y_i). In the next step, a general mean (μ) and standard deviation (s) was calculated, considering Y_i values of a given biomarker measured in each group. Next, Y_i values were standardized by the formula: $Z_i = (Y_i - \mu)/s$ and the difference between Z_i and Z_0 (IMIO) was used to define the biomarker deviation index (A). To obtain an integrated multiple biomarker response, the value of A of each biomarker was calculated for every exposed group and IBRV2 was calculated for each group by the sum of the absolute values of A. For each group (IMI1.25, IMI12.5, IMI125, and IMI1,250) and each organ analyzed, A values calculated for each biomarker were reported in a star plot representing the reference deviation of each investigated biomarker. The area above 0 reflects biomarker induction, and the area below 0 indicates biomarker inhibition.

2.5. Statistical analysis

After checking data for normality (Shapiro Wilk test) and homoscedasticity (Levene's test) mean values for the different treatments, for each organ analyzed, were cross-compared using parametric (ANOVA) or non-parametric (Kruskal-Wallis) analysis of variance, followed by the Student-Newman-Keuls (SNK) or Dunn's test, respectively, when necessary. A significance level of 0.05 was used in all analyses. The data shown in the graphs represent means \pm SEM.

3. Results

3.1. Water parameters

During the tests, there was no mortality in any experimental group. The physical and chemical characteristics of the water for all the experimental periods remained stable. No significant differences between aquaria were detected (Table 1). All quantified imidacloprid concentrations were lower than the nominal concentrations and ranged from 5.45 to 359 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Table 1

Physical and chemical parameters and imidacloprid concentrations in the water used in the experiments. The values are represented as mean \pm SD (n = 5).

Water parameters	IMIO	IMI 1.25	IMI 12.5	IMI 125	IMI 1250
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	22.61 \pm 2.25	22.62 \pm 1.80	22.86 \pm 1.76	23.33 \pm 2.00	23.49 \pm 2.19
pH	7.93 \pm 0.19	7.92 \pm 0.14	7.88 \pm 0.15	7.87 \pm 0.19	7.80 \pm 0.21
Dissolved oxygen ($\text{mgO}_2 \text{L}^{-1}$)	7.10 \pm 0.08	7.14 \pm 0.13	7.14 \pm 0.16	7.15 \pm 0.09	7.09 \pm 0.07
Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	100.6 \pm 9.93	101.4 \pm 10.38	100.8 \pm 10.52	100.8 \pm 10.37	101.6 \pm 10.73
Imidacloprid ($\mu\text{g L}^{-1}$)	<DL	<DL	5.45 \pm 0.21	37.15 \pm 0.49	359.15 \pm 0.77

Values are mean \pm SD (n = 5). DL (Detection limit) = 1.6 $\mu\text{g L}^{-1}$

Table 2

Physiological parameters of *P. lineatus* kept under the control condition (IMIO) or exposed to IMI (nominally: 1.25, 12.5, 125, and 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Physiological parameters	IMIO	IMI 1.25	IMI 12.5	IMI 125	IMI 1250
Hemoglobin (mg dL^{-1})	10.42 \pm 0.33	10.12 \pm 0.38	10.47 \pm 0.14	11.09 \pm 0.17	10.67 \pm 0.46
Hematocrit (%)	45.14 \pm 0.88	43.14 \pm 1.30	41.29 \pm 1.32	48.00 \pm 0.87	43.43 \pm 1.78
Number of RBCs ($\times 10^6 \text{ cells mm}^{-3}$)	3.50 \pm 0.10	3.78 \pm 0.18	3.61 \pm 0.17	4.18 \pm 0.11	3.78 \pm 0.16
Glucose (mg dL^{-1})	75.24 \pm 4.24 ^a	58.15 \pm 3.28 ^b	48.87 \pm 2.12 ^b	55.04 \pm 5.41 ^b	56.73 \pm 4.01 ^b
Na ⁺	150.94 \pm 3.50	153.72 \pm 4.17	158.24 \pm 3.51	149.20 \pm 3.42	154.43 \pm 2.13
K ⁺	4.78 \pm 0.20	4.48 \pm 0.41	4.89 \pm 0.40	3.69 \pm 0.26	4.13 \pm 0.29
Cl ⁻	105.67 \pm 4.86	104.71 \pm 3.77	114.36 \pm 5.51	98.79 \pm 4.34	104.02 \pm 5.00
Ca ²⁺	2.91 \pm 0.56	1.61 \pm 0.11	2.30 \pm 0.28	1.79 \pm 0.11	2.14 \pm 0.25
Mg ²⁺	1.00 \pm 0.10	0.93 \pm 0.03	0.94 \pm 0.072	0.96 \pm 0.05	0.83 \pm 0.07

Results are expressed as mean \pm SEM (n = 8). Different letters indicate significant differences between groups (p < 0.05).

3.2. Biomarkers

3.2.1. Physiological parameters

No significant differences were found for hematological parameters amongst fish exposed to different concentrations of IMI (Table 2). However, plasma glucose was significantly lower in all groups of exposed fish, showing marked hypoglycemia in relation to IMIO (p = .002; Table 2). No significant change was found in plasma ions (Table 2).

3.2.2. Biotransformation and antioxidant defenses

Alterations in GST activity were found in the gills, kidney, and brain. In fact, the gills showed reduced GST activity in IMI12.5 and IMI125 groups (p < 0.001), as in the kidney of fish exposed to IMI1,250 (p < 0.001). In contrast, in the brain a significant GST increase was detected in fish from IMI125 and IMI1250 groups (Fig. 1A) together with a significant increase in GSH content (Fig. 1B). SOD activity showed significant increases in the liver of fish from IMI125 and IMI1,250 groups (p = .003) and in gills of fish from IMI1.25 and IMI12.5 groups (p = .008) (Fig. 1C). For CAT activity the liver of fish from IMI1,250 group presented a decrease (p = .036) while a significant increase was detected in the kidney of fish from all IMI concentrations (p < 0.001) and in the brain fish exposed to IMI1,250 (p = .026) (Fig. 1D). GPx activity increased in the gills of fish from IMI1.25 group (p = 0.021) as well as in the brain of fish from IMI125 and IMI1,250 groups (p < 0.001) (Fig. 1E).

3.2.3. Oxidative damage

Except for muscle, all the analyzed tissues demonstrated oxidative damage in lipids or proteins at least in one of the concentrations tested. LPO was significantly higher in fish liver (p = .001) and kidney (p = .024) from IMI1,250 group; in the gills of fish from IMI12.5 and IMI125 groups (p < 0.001); and in the brain of fish from IMI1.25 and IMI12.5 groups (p = .005) (Fig. 2A). Similarly, a significant increase was detected in PCC in the liver of fish from IMI1,250 group (p = .036); in the gills of fish from IMI125 groups (p < 0.001); and kidney of fish from IMI125 and IMI1,250 groups (p = .009) (Fig. 2B).

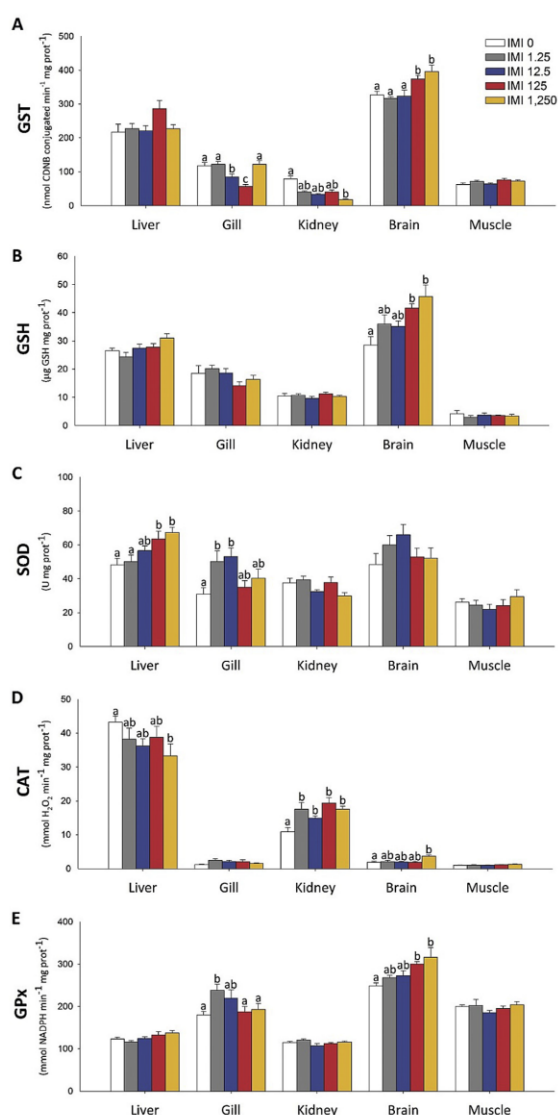


Fig. 1. Glutathione-S-transferase (A) activity, reduced glutathione concentration (B), superoxide dismutase (C), catalase (D), and glutathione peroxidase (E) activity, in the liver, gill, kidney, brain, and muscle of *P. lineatus* kept under the control condition (IMI0) or exposed to Imidacloprid at 1.25, 12.5, 125, and 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Data are mean \pm SEM, $n = 8$. Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$).

3.2.4. AChE activity

AChE activity was not affected by IMI exposure in brain or muscle. Fig. 3 shows AChE activities in these tissues at different IMI exposure concentrations.

3.2.5. Genotoxic biomarkers

The comet assay showed that all IMI concentrations promoted significantly higher DNA damage scores in *P. lineatus* erythrocytes in comparison to fish exposed to IMI0, indicating damage to the genetic material ($p = 0.018$; Fig. 4A). On the

contrary, hepatocytes did not present any significant changes in DNA damage scores (Fig. 4A).

In relation to frequency of micronucleus (MN), only 1 erythrocyte with MN was detected in fish exposed to the highest IMI concentration. In addition, there was a significant increase in ENA frequency in fish exposed to IMI1,250 ($p = .043$), relative to the other groups (Fig. 4B).

3.3. IBR

IBR values indicated that the liver and kidney showed greater variations in biomarker responses, with average IBR values of 11.29 and 11.15, respectively, followed by the gills (10.71) and brain (8.22) (Fig. 5). Muscle did not demonstrate any significant variation in biochemical responses and, therefore, was not applied in the index. Mean IBR values increased as IMI concentrations increased: IMI1.25 = 8.90 < IMI12.5 = 9.66 < IMI125 = 10.58 < IMI1,250 = 12.23, indicating that the highest concentration promoted more pronounced effects in the different organs evaluated, with the exception of the gills.

4. Discussion

This study is the first to report oxidative and DNA damage in different organs of a fish after IMI exposure. Previous studies conducted with a small number of fish species have concluded that fish are typically less sensitive to neonicotinoids than insects or other vertebrate groups (Anderson et al., 2015). However, the results of the present work show that *P. lineatus* was severely affected by the exposure to different IMI concentrations.

In the present work, the concentrations of IMI determined by LC-MS/MS were lower than the nominal concentrations (about 30% of nominal concentration). This discrepancy between nominal and measured concentrations is possibly related to different factors, such as photolytic degradation of the active ingredient in the commercial formulation and/or in the water of the aquaria, liquid formulation used, neutral pH and the interference of inert ingredients present in the formulation in IMI determination. Imidacloprid decomposes reasonably fast in aqueous solution under the influence of UV-light producing a number of photoproducts. According to Moza et al. (1998), irradiation at 290 nm resulted in 90% substrate transformation in 4 h, and 6-Chloronicotinaldehyde, N-methylnicotinamide, 1-(6-chloronicotinyl) imidazolidone and 6-chloro-3-pyridyl-methylethylenediamine were the main photoproducts identified by CG-MS analysis. The type of the formulation can also interfere on the persistence of IMI. Sarkar et al. (1999) observed higher half-lives of IMI in the powder formulation when compared to the liquid formulation. These same authors investigated the effect of pH on IMI persistence in water and found that the mean half-life value was higher at pH 9.0, indicating a longer persistence of the insecticide residues under alkaline conditions.

Hematological parameters and plasma ions of *P. lineatus* remained unaffected after IMI exposures. However, fish showed decreased glycemia after exposure to all IMI concentrations. Under stress conditions, an extra supply of energy substrates is required to compensate the increased energy demand and carbohydrates are usually the first energy supply in these situations (Saravanan et al., 2011; Cazenave et al., 2014). Another hypothesis to explain the observed hypoglycemia would be the decrease of glycogen in consequence of the high amount of energy required for the hepatic synthesis of detoxification enzymes, as pointed out by Begum and Vijayaraghavan (1995). In the fish *Piaractus mesopotamicus* acutely exposed to the organophosphate trichlorfon, Venturini et al. (2015) observed an increase in glucose in the liver and muscle, which suggests an increased glucose uptake during exposure. A

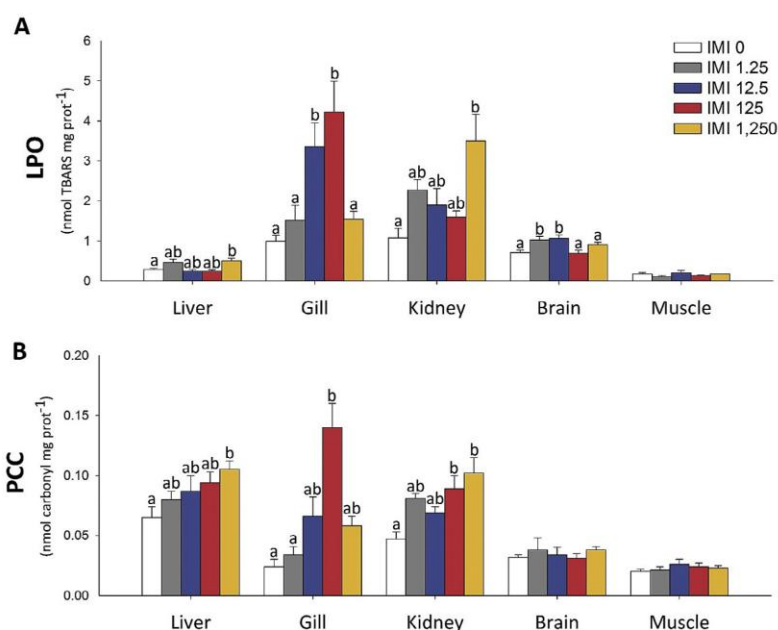


Fig. 2. Lipid peroxidation (A) and protein carbonyl content (B) in the liver, gill, kidney, brain, and muscle of *P. lineatus* kept under the control condition (IMI0) or exposed to Imidacloprid at 1.25, 12.5, 125, and 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Data are mean \pm SEM, $n = 8$. Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$).

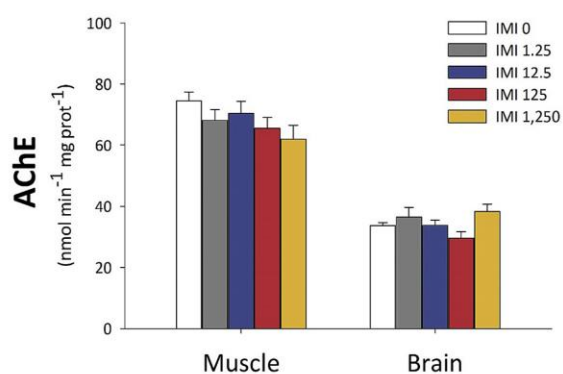


Fig. 3. Acetylcholinesterase activity in muscle and brain of *P. lineatus* kept under the control condition (IMI0) or exposed to Imidacloprid at 1.25, 12.5, 125, and 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Data are mean \pm SEM, $n = 8$.

hypoglycemic response in freshwater fish exposed to other insecticides is frequently reported (Singh et al., 1993; Borah and Yadav, 1995; Agrahari et al., 2007) and is related to the rapid use of blood glucose during hyperexcitability, tremors and convulsions, due to the effects of the insecticides on fish (Singh et al., 1993). Our results suggest that IMI exposure, regardless the concentration, promotes an increased metabolic demand in organs such as liver and muscle leading to hypoglycemia. Additional metabolic and behavior analyzes in exposed fish would be important to better elucidate these results.

It has been extensively reported that exposure pesticides can affect the balance between the generation of reactive oxygen species and antioxidant defense in fish (Lushchak, 2011); therefore,

alterations in the activity of antioxidants enzymes in different organs suggest from adaptive response to oxidative stress condition to irreversible damage in the organ (Livingstone, 2001). Enzymes such as SOD and CAT play an important role in the elimination of ROS produced during the biotransformation of xenobiotics and the induction of the SOD/CAT system may be the first defense mechanism against ROS (Lushchak, 2016). In *P. lineatus* exposed to IMI, an increase in hepatic SOD activity was detected at both IMI 125 and IMI1,250 indicating the generation of superoxide anions. Increased SOD activity was also observed in zebrafish exposed to neonicotinoid thiamethoxam for 7 and 14 days (Yan et al., 2015) and after 7 days of exposure to a range of 0.3–3 mg L^{-1} of IMI (Ge et al., 2015). In contrast, hepatic CAT activity decreased in *P. lineatus* after exposure to IMI1,250. Shukla et al. (2017) also detected reduced CAT activity in the liver of zebrafish exposed to IMI for 24 h. In general, the inhibition of CAT activity has been related to the binding of toxicants to -SH groups of enzyme, increased H_2O_2 and/or superoxide radical (Ruas et al., 2008). Thus, the significant decrease in CAT activity in liver of *P. lineatus* might have resulted from its inactivation by the superoxide radical triggered by IMI exposure. Navarro and Martinez (2014) also observed these opposite responses of the two primary antioxidant defenses in *P. lineatus* exposed to surfactant polyoxyethylene amine, supporting the hypothesis that SOD activity increases until the superoxide anion radical increases to a threshold and after that the excess of this radical promotes the inhibition of CAT. Taking together, these alterations in the antioxidant enzymes SOD and CAT might indicate a high production of ROS, which triggers a state of oxidative stress, as evidenced by the highest levels of LPO and PCC detected in *P. lineatus* exposed to IMI1,250. LPO reflects loss of membrane integrity (Valavanidis et al., 2006); while PCC reflects loss of protein function (Wong et al., 2010). Therefore, results obtained in the liver demonstrate irreversible damage, which can lead to a reduction in its functionality, intensifying the toxic effects of IMI.

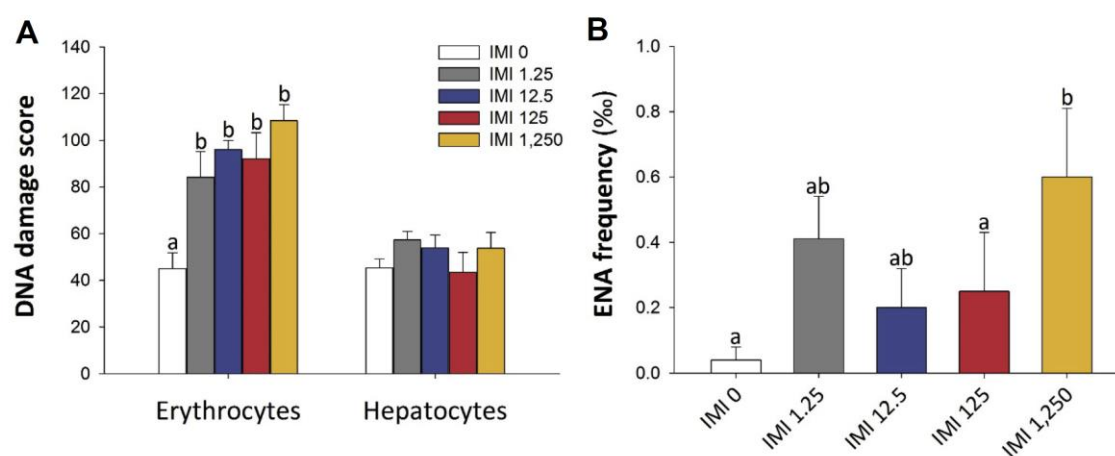


Fig. 4. Score of DNA damage in erythrocytes and hepatocytes (A) and frequency of nuclear abnormalities (B) in erythrocytes of *P. lineatus* kept under the control condition (IMI0) or exposed to Imidacloprid at 1.25, 12.5, 125 and 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Data are mean \pm SEM, $n = 8$. Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$).

Gills are organs involved in the excretion of xenobiotics but they also represent an important tissue for the uptake of xenobiotics as they are in direct contact with pollutants (Monteiro et al., 2005). In the present study, gills were one of the main organs that exhibited changes in the majority of the antioxidant defenses evaluated. Significant increases in SOD and GPx activities were evident in the gills of fish exposed to the lower concentration of IMI tested. Presumably, these increments in both SOD and GPx were effective for preventing oxidative damage in gills of fish exposed to IMI 1.25, but not to IMI 12.5. Moreover, gills of fish exposed to IMI 125 showed an increase in LPO and PCC levels. Detrimental effects on lipid and protein may be related to a decrease in branchial GST activity in fish exposed to both IMI12.5 and IMI125. The role of GST is to catalyze the detoxification of harmful compounds via conjugation of GSH (Hellou et al., 2012). Despite the levels of GSH in the gills remained unchanged in relation to the control fish (IMI0), the decrease in GST activity suggests a decline in detoxification at the gills, making possible the emergence of peroxidative damage.

As in the liver and gills, oxidative damage was evident in the kidney of *P. lineatus* exposed to the highest IMI concentration, along with decreased GST and increased CAT activities. IMI has a high water solubility (0.51 g/L at 20 °C) and low $\log K_{ow}$ value (0.57), indicating a low potential for bioaccumulation (Moza et al., 1998). Due to these characteristics, in mammals neonicotinoids are excreted unchanged in urine (Tomizawa and Casida, 2005). Rats excreted 96% of radio-labeled IMI within 48 h following an unspecified oral dosing, with 90% excreted in the first 24 h (Klein, 1987). Even if urinary elimination of xenobiotics is less important in fish than it is for mammals, due to the contribution of the gills to chemical elimination, urine may represent an important route for excretion of some compounds (Kleinow et al., 2008). Given its hydrophilic characteristic and importance of the kidney for its elimination, IMI could quickly reach this organ and promote biochemical disorders. An overproduction of ROS in the kidney was suggested by the increased CAT activity and high levels of protein carbonylation (PCC), which may also inactivate the activity of enzymes, such as GST.

In the brain, a rise in LPO levels was observed in fish exposed to IMI 1.25 and IMI 12.5, while at IMI125 and IMI1250 $\mu\text{g L}^{-1}$, an increase in GSH activity concomitant with increased GST levels

was seen, suggesting that activation of antioxidant defenses prevented oxidative stress in this organ at IMI high concentrations. In addition, an increase in brain GPx activity was observed in fish exposed to IMI 125 and IMI 1250. This enzyme catalyzes the reduction of H_2O_2 and lipid hydroperoxides at the expense of GSH (Lushchak, 2016) and its increase could have contributed to prevent oxidative damage in the brain of fish exposed to higher IMI concentrations. Shukla et al. (2017) observed an increase of GSH in the brain of *Danio rerio* exposed to IMI and consequently, an increase of MDA in this organ was not observed. Glutathione peroxidases (GPxs) are known to provide protection against LPO by terminating lipid peroxidation cascade through the reduction of fatty acid hydroperoxides (FA-OOH) and phospholipid hydroperoxides (PL-OOH) (Sharma et al., 2004). In addition to GPxs, some of the GST isozymes can efficiently reduce FA-OOH as well as PL-OOH and can interrupt the autocatalytic chain of lipid peroxidation by reducing these hydroperoxides that propagate lipid peroxidation chain reactions (Zhao et al., 1999; Yang et al., 2001). In addition, a subgroup of GST isozymes with substrate preference for α , β -unsaturated carbonyls (e.g., 4-HNE and acrolein) can effectively detoxify these toxic end products of lipid peroxidation (Singhal et al., 1994; Hubatsch et al., 1998). Thus, GSTs not only complement GPxs in attenuating lipid peroxidation by reducing hydroperoxides, but also protect cells from toxic end products of lipid peroxidation. In the present study, the increase or maintenance of normal levels of GST activity in the liver, brain and muscle may have played an important role in the prevention of oxidative stress. Thus, GST in fish brain can be considered as a beneficial tool for handling stress conditions. Iturburu et al. (2017) highlight the presence of IMI in the brain tissue of exposed fish, indicating that the compound may overpass the blood-brain barrier, which is an essential structure to maintain brain homeostasis and protect the organ from toxic substances.

No changes were observed in AChE activity in muscle and brain of fish exposed to any IMI concentration. Neonicotinoid insecticides act by interfering with the insect nervous system. Specifically, they exhibit insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) acting as 'false neurotransmitters' (Tomizawa and Casida, 2005). However, IMI binds more strongly in insect than mammalian or other vertebrate nAChRs, for this reason the toxicity in vertebrates is

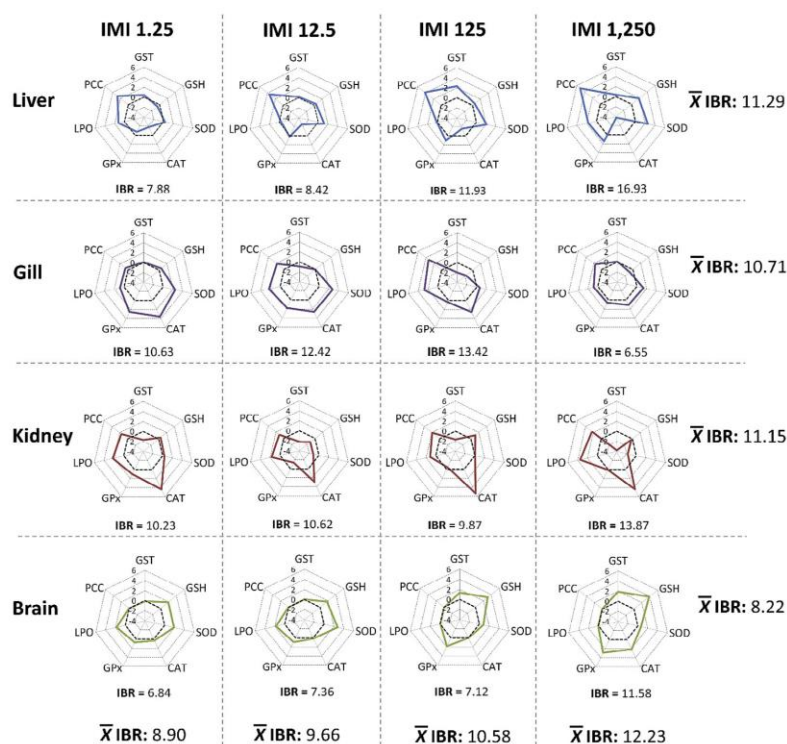


Fig. 5. Integrated biomarker response index (IBR) in the liver, gill, kidney, and brain of *P. lineatus* exposed to Imidacloprid at 1.25, 12.5, 125, and 1250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Biomarker results are represented in relation to the control group (IMi0) (dashed line). The area above 0 reflects induction of the biomarker and below 0 indicates reduction of the biomarker.

lower than in insects (Matsuda et al., 2001); and presumably because of this no effects were observed in AChE activity in *P. lineatus*. Contrary results were found by Topal et al. (2017) who observed AChE inhibition in the brain of rainbow trout after IMI exposure (10 and 20 mg L^{-1}) for 21 days, indicating that longer exposures periods to higher IMI concentrations can promote disturbances in the neurological activity of exposed fish.

The comet assay showed that exposure to IMI caused an increase in DNA damage in erythrocytes, but not in hepatocytes; the highest concentration of IMI tested also promoted the highest frequency of ENAs. Ge et al. (2015) working with *D. rerio* detected DNA damage in cell suspensions of livers exposed to IMI. Similarly, IMI exposure caused DNA damage in erythrocytes of frogs *Rana N. hallowell* (Feng et al., 2004). Moreover, in the highest concentrations of IMI tested, lipid peroxidation was also observed in liver, gill, and kidney; this process can generate lipid superoxide, free and alkyl radicals that intensify DNA damage (Wong et al., 2010; Hook et al., 2014). Similarly, Xia et al. (2016) observed a concentration and time-dependent increase in the frequency of MN and ENAs in the fish *Misgurnus anguillicaudatus* after exposure to IMI, in addition to DNA breaks at all concentrations tested (43–115 mg L^{-1}) after six days of exposure. Iturburu et al. (2017) observed an increased MN frequency in a Neotropical fish exposed to IMI at 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Together, these results clearly indicate that IMI promotes genotoxic effect on different species of fish.

Any of the analyzed parameters has changed in muscle tissue, this fact can be related to the characteristics of IMI, such as the low lipid solubility of the compound. Due to its hydrophilic nature, we

hypothesize that the main route that drives IMI to muscle would be from the blood supply, rather than the skin, and as this compound is rapidly excreted via urine, it does not accumulate in non-target tissues, not causing effects on the muscle.

The IBR values showed that the organs most affected by IMI exposure were the liver and kidney, followed by the gills, which are the main organs responsible for the metabolism, excretion and uptake of xenobiotics in fish, respectively. The biochemical biomarkers responded in a concentration-dependent manner in almost all organs, except for the muscle that did not present any alteration in the analyzed parameters. Our results highlight the importance of investigating different target tissues after exposure to toxicants, once specific tissue responses were observed in the activity of antioxidant enzymes after IMI exposure, indicating different rates of ROS generation and antioxidant capacity of these tissues.

5. Conclusion

The results obtained in this study indicated that high concentrations of IMI induced a marked increase in LPO and PCC in different tissues of fish. Although adverse effects were observed at higher exposure concentrations than habitually detected in surface water, IMI exposure caused oxidation of various biological molecules, including lipid, proteins and possible oxidative DNA damage, which leads to inactivation of their functions. Given the constant increment in the use and sale of IMI it is probable that its concentration in surface water will also increase, becoming particularly harmful to fish vulnerable to the effects of chronic exposure to IMI.

Acknowledgments

Authors thank the Hatchery Station of the State University of Londrina for supplying the fish for this research and the National Institute of Science and Technology of Aquatic Toxicology (INCT-TA) supported by the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support (grant # 573949/2008-5). M.R.Pérez thanks CONICET (Argentina) for scholarship. This work is part of the PhD thesis of C.E.D. Vieira, who received a scholarship from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). C.B.R. Martinez is a research fellow from CNPq (Process 307947/2015-7).

References

- Agrahari, S., Pandey, K.C., Gopal, K., 2007. Biochemical alteration induced by monochrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 268–272.
- Albuquerque, A.F., Ribeiro, J.S., Kummrow, F., Nogueira, A.J.A., Montagner, C.C., Umbuzeiro, G.A., 2016. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environ. Sci. Process. Impacts* 18, 779–787.
- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 82–88.
- Anderson, J.C., Dubetz, C., Palace, V.P., 2015. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: a literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Sci. Total Environ.* 505, 409–422.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M.S., Nauen, R., 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 78–87.
- Becker, A.G., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Loro, V.L., Santos, D.R., Reichert, J.M., Baldissero, B., 2009. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1734–1739.
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316–1322.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: a Manual of Biochemical Methods*. Grune & Stratton, New York.
- Beutler, E., Duroom, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882–890.
- Bortoluzzi, E.C., Rheinheimer, D.S., Gonçalves, C.S., Pellegrini, J.B.R., Zanella, R., Copetti, A.C.C., 2006. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 10, 881–887.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Begum, G., Vijayaraghavan, S., 1995. Carbohydrate metabolism in hepatic tissue of fresh water *Clarias batrachus* L. during dimethoate exposure. *Fd. Chem Toxic.* 33, 423–426.
- Borah, S., Yadav, R.N.S., 1995. Static bioassays and toxicity of two pesticides, rogor and endosulfan to the air-breathing fish, *Heteropneustes fossilis* with special reference to behaviour. *Poll. Res.* 14, 435–438.
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M., 1998. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiterplates. In: Armstrong, D. (Ed.), *Free Radical and Antioxidants Protocols*. Humana Press, New Jersey, pp. 377–387.
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 2123–2136.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 41–46.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campaña, M., Parma, M.J., 2014. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: a field caging study. *Ecol. Indic.* 38, 104–112.
- CCME, 2007. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Imidacloprid. Scientific Supporting Document. Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.
- Cox, C., 2001. Insecticide factsheet: imidacloprid. *J. Pestic. Reform* 21, 15–21.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, J.R.V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- EXTOXNET, 1996. *Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles : Imidacloprid*. Available at: <http://extoxnet.orst.edu/pips/imidaclo.htm>.
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L., Peng, P., 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana hallowell*. *Chemosphere* 56, 457–463.
- Gagné, F., 2014. *Xenobiotic Biotransformation*. in: Gagné, F. *Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods*. Elsevier: Academic Press, p. 682.
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J., 2015. Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Agric. Food Chem.* 63, 1856–1862.
- Gibbons, D., Morrissey, C., Mineau, P., 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 103–118.
- Goulson, D., 2013. Review: an overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50, 977–987.
- Hellou, J., Ross, N.W., Moon, T.W., 2012. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19, 2007–2023.
- Hook, S.E., Gallagher, E.P., Batley, G.E., 2014. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 10, 327–341.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Haematol.* 25, 563–575.
- Hubatsch, I., Ridderstrom, M., Mannervik, B., 1998. Human glutathione S-transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochem. J.* 330, 175–179.
- IBAMA — Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2013. *Agrotóxicos e Afins — Histórico das Vendas — 2000 a 2012*. Available at: http://ibama.gov.br/phocodownload/Qualidade_Ambiental/boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf.
- Iturburu, F.G., Zömisch, M., Panzeri, A.M., Crupkin, A.C., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Menone, M.L., 2017. Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 699–708.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A., 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897–2908.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.
- Kleinow, K.M., Nichols, J.W., Hayton, W.L., McKim, J.M., Barron, M.G., 2008. *Toxicokinetics in fishes*. In: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*. Boca Raton, USA.
- Klein, O., 1987. [14C]-NTN 33893: Biokinetic Part of the 'general Metabolism Study' in the Rat. Unpublished Report No. PF2889, 1987, Submitted to WHO by Bayer AG, Mannheim, Germany. INCHEM Toxicological Evaluations: Imidacloprid. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 147, 222–231.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 233, 346–357.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30.
- Lushchak, V.I., 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 711–747.
- Main, A.R., Headley, J.V., Peru, K.M., Michel, N.L., Cessna, A.J., Morrissey, C.A., 2014. Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's Prairie Provinces. *Plos One* 9, e92821.
- Mason, R., Tennekkes, H., Sánchez-Bayo, F., Jepsen, P.U., 2012. Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of global wildlife declines. *J. Environ. Immunol. Toxicol.* 1, 3–12.
- Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M., Sattelle, D.B., 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 573–580.
- McCord, J.E., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocypretein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Miranda, G.R.B., Raetano, C.G., Silva, E., Daam, M., Cerejeira, M.J., 2011. Environmental fate of neonicotinoids and classification of their potential risks to hypogean, epigeal, and surface water ecosystems in Brazil. *Human Ecol. Risk Assess.* 17, 981–995.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781–787.
- Montagner, C.C., Vidal, C., Acajaba, R.D., Jardim, W.F., Jardim, I.C.S.F., Umbuzeiro, G.A., 2014. Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surface and drinking Waters from the State of São Paulo (Brazil). *Anal. Meth.* 6, 6668–6677.
- Monteiro, S.M., Mancera, J.M., Fontainhas-Fernandes, A., Sousa, M., 2005. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 141 (C), 375–383.
- Moreno, N.C., Sofia, S.H., Martinez, C.B., 2014. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 448–454.
- Morrissey, C.A., 2015. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environ. Int.* 74, 291–303.
- Moza, P.N., Huster, K., Feicht, E., Kettrup, A., 1998. Photolysis of imidacloprid in aqueous solution. *Chemosphere* 36, 497–502.
- Navarro, C.D.C., Martinez, C.B.R., 2014. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 165, 83–90.
- OECD, 1992. *Fish Acute Toxicity Test*. OECD Guideline for Testing Chemicals, no. 203. Organization for Economic Co-operation and Development.

- Pereira, L., Fernandes, M.N., Martinez, C.B., 2013. Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 1–8.
- RIVM, 2014. Water Quality Standards for Imidacloprid: Proposal for an Update According to the Water Framework Directive. Dutch National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Netherlands.
- Ruas, C.B., Carvalho, C.S., Araujo, H.S., Espindola, E.L., Fernandes, M.N., 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 86–93.
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J., 2013. A novel “integrated biomarker response” calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2721–2725.
- Sánchez-Bayo, F., Goka, K., 2005. Unexpected effects of zinc pyriothione and imidacloprid on Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 74, 285–293.
- Saravanan, M., Prabhu Kumar, K., Ramesh, M., 2011. Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100, 206–211.
- Sarkar, M.A., Biswas, P.K., Roy, S., Kole, R.K., Chowdhury, A., 1999. Effect of pH and type of formulation on the persistence of imidacloprid in water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 604–609.
- SERA. Syracuse Environmental Research Associates, 2005. Imidacloprid: Human Health and Ecological Risk Assessment - Final Report. Prepared for USDA Forest Service. Available online. http://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/122805_Imidacloprid.pdf.
- Sharma, R., Yang, Y., Sharma, A., Awasthi, S., Awasthi, Y.C., 2004. Antioxidant role of glutathione S-Transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxidants Redox Signal.* 6, 289–300.
- Shukla, S., Jhamtani, R.C., Dahiya, M.S., Agarwal, R., 2017. Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. *Tox. Rep.* 4, 240–244.
- Singh, N.N., Srivastava, A.K.S., Srivastava, A.K., 1993. Biochemical changes in the freshwater Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* following exposure to sublethal concentration of aldrin. *J. Environ. Biol.* 14, 7–12.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.A., 1988. Single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Singhal, S.S., Zimniak, P., Awasthi, S., Piper, J.T., He, N.G., Teng, J.I., Petersen, D.R., Awasthi, Y.C., 1994. Several closely related glutathione S-transferase isozymes catalyzing conjugation of 4-hydroxynonenal are differentially expressed in human tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 242–250.
- Starnes, K., Goh, K.S., 2012. Detections of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in surface waters of three agricultural regions of California, USA, 2010–2011. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 316–321.
- Struger, J., Grabuski, J., Cagampan, S., Sverko, E., McGoldrick, D., Marvin, C.H., 2017. Factors influencing the occurrence and distribution of neonicotinoid insecticides in surface waters of southern Ontario, Canada. *Chemosphere* 169, 516–523.
- Taylor, B.W., Flecker, A.S., Hall Jr., R.O., 2006. Loss of a harvest fish species disrupts carbon flow in a diverse tropical river. *Science* 313, 833–836.
- Tennekes, H., 2010. The Systemic Insecticides: a Disaster in the Making. ETS Nederland BV, Zutphen, The Netherlands, p. 69.
- Tisler, T., Jemec, A., Mozetič, B., Trebse, P., 2009. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere* 76, 907–914.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247–268.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2009. Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death. *Acc. Chem. Res.* 42, 260–269.
- Tomlin, C.D.S., 2000. The Pesticide Manual, twelfth ed. British Crop Protection Council, Surrey, United Kingdom.
- Topal, A., Alak, G., Ozkaraca, M., Yeltekin, A.C., Comaklı, S., Aclı, G., Kokturk, M., Atamanalp, M., 2017. Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 175, 186–191.
- Ueda, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakamura, T., Kobayashi, J., Sofuni, T., 1992. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Sci. Technol.* 25, 235–240.
- USEPA, 2014. OPP Pesticide Toxicity Database. http://www.epa.gov/oppfed1/ecorisk_ders/aquatic_life_benchmark.htm. January 25, 2017.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189.
- Van Kijk, T., Van Staalduinen, M.A., Van der Sluijs, J.P., 2013. Macroinvertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PLoS One* 8, e62374.
- Venturini, F.P., Moraes, F.D., Cortella, L.R.X., Rossi, P.A., Cruz, C., Moraes, G., 2015. Metabolic effects of trichlorfon (Masoten®) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish Physiol. Biochem.* 41, 299–309.
- Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Lunardelli, B., Oliveira, L.F., Cabrera, L.C., Risso, W.E., Primel, E.G., Meletti, P.C., Fillmann, G., Martinez, C.B.R., 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Sci. Tot. Environ.* 542, 44–56.
- Wong, C.M., Marcocci, L., Liu, L., Suzuki, Y.J., 2010. Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxidants Redox Signal.* 12, 393–404.
- Xia, X., Xia, X., Huo, W., Dong, H., Zhang, L., Chang, Z., 2016. Toxic effects of imidacloprid on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45, 132–139.
- Yan, S.H., Wang, J.H., Zhu, L.S., Chen, A.M., Wang, J., 2015. Thiamethoxam induces oxidative stress and antioxidant response in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Environ. Toxicol.* 31, 2006–2015.
- Yang, Y., Cheng, J.Z., Singhal, S.S., Saini, M., Pandya, U., Awasthi, S., Awasthi, Y.C., 2001. Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2–2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J. Biol. Chem.* 276, 19220–19230.
- Zhao, T., Singhal, S.S., Piper, J.T., Cheng, J.Z., Pandya, U., Clark-Wronski, J., Awasthi, S., Awasthi, Y.C., 1999. The role of human glutathione S-transferases hGSTA1–1 and hGSTA2–2 in protection against oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 367, 216–224.