



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS E
BIOQUÍMICOS EM *Hypostomus ancistroides* (Ihering,
1911) (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) EM UM RIO
URBANIZADO**

Maurício Nardi Machado

Toledo – Paraná – Brasil
2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS E
BIOQUÍMICOS EM *Hypostomus ancistroides* (Ihering,
1911) (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) EM UM RIO
URBANIZADO**

Mestrando: Maurício Nardi Machado

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* Toledo, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr Paulo Vanderlei Sanches
Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Thaís Souto Bignotto
e Prof^a. Dr^a. Nédia de Castilhos Ghisi

JULHO / 2021
Toledo – PR

AGRADECIMENTOS

Na realização deste trabalho muitas pessoas estiveram ao meu lado, dando-me suporte, coragem e incentivo, nos momentos difíceis que ocorreram durante este período de dedicação a dissertação.

Dentre estes, gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois é a fonte da energia de minha mente e meu coração. A minha família, que é meu porto seguro que sempre estiveram ao meu lado me dando apoio e confiança, a minha mãe Denize por me entender, apoiar e ampliar minha visão sobre a vida. Meu pai José Roberto por nunca medir esforços para possibilitar meus estudos, meu irmão de sangue Higor, minha avó Aline, e minha namorada Luana, por me ajudar tecnicamente neste trabalho, e estar comigo em todos os momentos sejam eles bons ou ruins.

Quero também expressar minha imensa gratidão aos meus orientadores, Paulo Sanches, Thaís Bignotto e Nédia Ghisi, que com seu enorme conhecimento dedicaram tempo para me auxiliar nesta pesquisa. Quero agradecer também aos professores Dirceu Baumgartner, Robie Bombardelli, Pitágoras Piana e Thiago Maniglia e também ao amigo Dimas, assim como toda a equipe e estrutura do GERPEL e ao curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da UNIOESTE de Toledo.

Agradeço a coordenação do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário FAG, por sempre estar de portas abertas para mim.

Agradeço também ao Laboratório de Análises Biológicas e Biologia Molecular da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Dois Vizinhos pelas análises realizadas.

Quero agradecer especialmente ao meu amigo irmão Juliano Karvat, que me incentivou e colaborou muito para que eu seguisse este caminho, aos meus amigos Iron Lucas Tessaro, Carolina Zawoski, Luciano Guedes, Ana Paula da Silva, Camila Dalpisol e Vinicius Faustino, por me auxiliarem na realização do projeto. Aos amigos Enzo Valduga e Winicyus Zanini, por me cederem confiança e espaço em suas moradias.

E por fim a todos os que de alguma forma, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. OBRIGADO!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização dos pontos de amostragem de *Hypostomus ancistroides* nos rios Toledo (P1 e P2) e Santa Quitéria (P3), na região Oeste do Paraná.... 12

Figura 2 – Total de alterações morfológicas nucleares (ENAs) presentes em espécimes de *Hypostomus ancistroides* coletados nos rios Toledo e Santa Quitéria, nas estações do ano (verão e inverno), na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020. Letras diferentes sobre as barras (a, b) representam diferença significativa.....20

Figura 3 – Total de alterações morfológicas nucleares (ENAs) presentes em espécimes de *Hypostomus ancistroides* coletados nos rios Toledo e Santa Quitéria, nos diferentes pontos amostrais (P1, P2 e P3), na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020. Os asteriscos significam que no local existe diferença significativa.21

Figura 4 – Análise da enzima glutatona S transferase (GST) em *Hypostomus ancistroides* coletados nos rios Toledo e Santa Quitéria, nos diferentes pontos amostrais (P1, P2 e P3), na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020. Letras diferentes sobre as barras (a, b, c) representam diferença significativa.....23

Figura 5 – Análise da enzima superóxido dismutase (SOD) em *Hypostomus ancistroides* coletados nos rios Toledo e Santa Quitéria, nos diferentes pontos amostrais (P1, P2 e P3), na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020. Os asteriscos significam que no local existe diferença significativa.....24

Figura 6 – Análise da lipoperoxidação (LPO) em *Hypostomus ancistroides* coletados nos rios Toledo e Santa Quitéria, na região Oeste do Paraná, nos diferentes pontos amostrais (P1, P2 e P3), na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020. Letras diferentes sobre as barras (a, b) representam diferença significativa.....25

Figura 7 – Análise multivariada dos resultados dos testes do micronúcleo e enzimáticos de *Hypostomus ancistroides*, sendo site 1 (ponto 1), site 2 (ponto 2) e site 3 (ponto 3), coletados nos rios Toledo e Santa Quitéria, na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020.....26

Figura 8 – Mediana, primeiro e terceiro quartil do fator de condição de espécimes de *Hypostomus ancistroides* coletados no rio Toledo, pontos 1 e 2, e no rio Santa Quitéria, ponto 3, na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020. Letras diferentes sobre as barras (b, c) representam diferença significativa.....27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coordenadas geográficas e caracterização dos pontos de coleta no rio Toledo e no rio Santa Quitéria durante o período de estudo 12

Tabela 2 – Valores médios das variáveis abióticas nos pontos de amostragens de *Hypostomus ancistroides* dos rios Toledo (pontos 1 e 2) e Santa Quitéria (ponto 3), região Oeste do Paraná, no verão e inverno de 2020 19

Tabela 3 – Números de ocorrência, médias (X) e desvios padrão (DP) de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares (*blebbed*, *lobbed*, *notched*, *binucleated* e *vacuolated*) observados em *Hypostomus ancistroides*, coletados no ano de 2020, nos rios Toledo e Santa Quitéria, na região Oeste do Paraná. Dados paramétricos ANOVA one-way. Dados não paramétricos foram analisados utilizando o teste ANOVA de Kruskal-Wallis. $P < 0,05$ 20

Artigo elaborado e formatado conforme as normas das publicações científicas
Ecotoxicology and Environmental Safety, ISSN: 0147-6513. Disponível em:
<https://www.journals.elsevier.com/ecotoxicology-and-environmental-safety>

SUMÁRIO

UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS EM *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) EM UM RIO URBANIZADO.

Resumo	7
Abstract	8
1 Introdução	9
2 Materiais e Métodos	11
2.1 Caracterização da área de estudo e pontos de coletas	11
2.2 Caracterização da espécie.....	13
2.3 Amostragens e procedimentos laboratoriais	13
2.4 Análises	14
2.4.1 Teste de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares (ENAs)	14
2.4.2 Testes enzimáticos	15
2.4.3 Fator de Condição	16
2.4.4 Análises estatísticas	17
3 Resultados e Discussão	18
4 Conclusão	28
5 Referências	30

UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS EM *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) EM UM RIO URBANIZADO.

RESUMO

Devido ao crescimento populacional e à antropização dos ambientes naturais, os corpos aquáticos urbanizados são acometidos diariamente com despejos e, em decorrência disso, espécies residentes sofrem diversos impactos. *Hypostomus ancistroides* faz parte da fauna ictiífica dos ambientes dulcícolas da América do Sul e exerce interações com o ambiente bentônico nos rios que ocorrem. Devido ao seu nicho trófico, indivíduos desta espécie entram em contato direto com despejos e poluição oriundos da urbanização e, por este motivo, torna-se um importante bioindicador de qualidade ambiental. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar os possíveis efeitos da exposição de exemplares de *H. ancistroides* às condições ambientais em um rio urbanizado (rio Toledo) no município de Toledo (PR), por meio de marcadores genéticos e bioquímicos. Para isso, foram utilizados o teste de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares (ENAs) e avaliação das enzimas hepáticas catalase, glutathione transferase, superóxido dismutase e lipoperoxidação. Foram coletados exemplares da espécie em dois pontos no rio Toledo (P1 e P2) e, para efeito de comparação, em um ponto em um rio não urbanizado na área rural de Toledo chamado rio Santa Quitéria (P3). Após coleta e identificação morfológica, os indivíduos foram eutanasiados, obtido o peso (g) e o comprimento total (cm) para determinação do fator de condição e, em seguida, coletadas amostras de sangue, para realização do teste de micronúcleos, e amostras de fígado, para avaliação de enzimas. Os resultados encontrados no teste de ENAs apontaram algumas anomalias morfonucleares em células, principalmente nos exemplares do rio Toledo coletados no ponto 2; porém, não houve diferença significativa entre os pontos, apenas entre as estações do ano. A respeito das análises enzimáticas, os indivíduos do ponto 2 também foram os que mais apresentaram alterações apontadas por esse biomarcador. O fator de condição revelou alterações significativas entre os indivíduos pertencentes também ao ponto 2 quando comparados aos indivíduos coletados na área rural do município durante o período do inverno. Sendo assim, constatou-se que o rio Toledo apresenta um eminente risco de contaminação para os animais que ali habitam, levando em conta seu nível de degradação.

Palavras-chave: Peixe; ENAs; Enzimas; Poluição.

USE OF GENETIC AND BIOCHEMICAL MARKERS IN *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) IN AN URBANIZED RIVER

Due to the great population growth and the anthropization of the natural environments, the urbanized water bodies are affected daily with dumping and, as a result, resident species suffer several impacts. *Hypostomus ancistroides* is part of the fauna of the freshwater environments of South America and has interactions with the benthic environment in the rivers that occur. Due to their trophic niche, individuals of this species come into direct contact with waste and pollution from urbanization and, for this reason, this species becomes an important bioindicator of environmental quality. Thus, we aimed to evaluate the possible genotoxic effects of the exposure of *H. ancistroides* to environmental conditions in an urbanized river (Toledo river) in the municipality of Toledo - South Brazil. Thus, the genetic biomarker test of The Erythrocyte Nuclear Abnormalities (ENA) was used, in addition to enzymatic tests. Specimens of the species were collected at two points in the Toledo River and, for comparison purposes, at one point in an undeveloped river in the rural area of Toledo (Santa Quitéria River). After collection and morphological identification, individuals were euthanized, weight (g) and total length (cm) were obtained for condition factor analysis, and then blood samples were collected for micronuclei test and muscle and liver samples, to assess the enzymatic level. The results showed that ENAs test indicated some morphonuclear anomalies in cells, mainly from specimens from the site 2 in Toledo River however, there were no significant differences between points, only between seasons. Regarding the enzymatic analysis, the individuals from point 2 were also the ones who showed the most alterations pointed out by this biomarker. The condition factor revealed significant changes among individuals belonging to point 2 when compared to individuals collected in the rural area of the municipality during the winter period. Thus, it was found that the Toledo River presents an imminent risk of contamination for the animals that live there, taking into account its level of degradation.

Keywords: Fish; ENAs; Enzymes; Pollution.

1 - INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos sofrem constantes degradações devido ao crescimento populacional humano e antropização dos ambientes, sendo acometidos diariamente com despejos em seus cursos, recebendo diversos tipos de xenobiontes (AQUINO et al., 2013). Nessa condição, muitas substâncias, até mesmo contaminantes, podem chegar às águas e serem depositados com a matéria e energia disponíveis aos organismos aquáticos (REIS-FILHO et al., 2006).

Devido a sua importância ambiental, ressalta-se a necessidade da preservação e constante monitoramento dos ambientes aquáticos, pois sua alteração pode refletir de forma direta na saúde e bem-estar humano (BERTI et al., 2009), assim como os demais organismos que habitam esses ambientes e pertencem a outros níveis tróficos, os quais podem sofrer efeitos genéticos, enzimáticos e celulares (BERTI et al., 2009).

Os impactos causados pela urbanização dos ambientes nos corpos hídricos resultam em alterações na forma como a ictiofauna se relaciona com estes ambientes (FERREIRA, 2017), uma vez que as substâncias presentes na água podem ser absorvidas pelos peixes através de vias digestivas, cutâneas e respiratórias (CETESB, 2019). Assim, a utilização de peixes como bioindicadores se mostra uma metodologia relevante para o biomonitoramento dos ambientes aquáticos, com possível inferência de resultados obtidos para outros ambientes ou outros organismos.

Várias metodologias podem ser utilizadas para se avaliar os efeitos genotóxicos, mutagênicos e enzimáticos em organismos expostos à ambientes degradados e, dentre elas, as que utilizam biomarcadores são consideradas altamente eficientes na realização de diagnóstico ambiental (TERRA, 2008). Essa eficiência está relacionada com limites de tolerância, determinação de concentração e efeito de poluentes presentes nos organismos analisados (TERRA, 2008).

Biomarcadores definem-se como variação celular, comportamental, bioquímica ou fisiológica, que pode ser identificada em fluidos corporais ou tecidos de um organismo, resultado da exposição do animal a um xenobiótico (TORRE, 2005). Dentre os biomarcadores disponíveis para a análise de

organismos em ambientes aquáticos, destacam-se o teste de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares (ENAs, *Erythrocytic Nuclear Abnormalities*). O teste de micronúcleo e ENAs consiste em uma técnica citogenética bastante utilizada na avaliação de danos cromossômicos geralmente causados por estresse ambiental (BOLOGNESI et al., 2006). Sendo assim, o teste de micronúcleo revela-se como uma excelente ferramenta na avaliação de organismos aquáticos expostos a substâncias genotóxicas, uma vez que estas substâncias podem induzir alterações no DNA.

Segundo Cogo (2009), outro biomarcador muito utilizado são as enzimas. Mudanças na atividade enzimática podem indicar respostas ao estresse ambiental, pois a determinação da atividade enzimática pode ser usada para avaliar a ação de alguma atividade antrópica impactante. Ivanina et al. (2008) mostram que a análise da atividade enzimática possibilita uma avaliação da qualidade ambiental, funcionando como um sinal de possível contaminação, tornando-se assim uma eficiente técnica para o monitoramento ambiental.

Outra forma de avaliar a qualidade do ambiente é por meio do fator de condição e da relação peso-comprimento das espécies, os quais, segundo Ghisi et al. (2012), constitui ferramenta muito importante na obtenção de informações sobre como as variações ambientais influenciam uma população. Além disso, o fator de condição pode avaliar, por exemplo, o estado fisiológico de uma população de peixes. Por ser um qualificador do bem-estar animal, seu resultado mostra de que maneira os indivíduos se relacionam com o ambiente e os recursos alimentares existentes (GHISI et al., 2012).

A espécie *Hypostomus ancistroides* é utilizada como bioindicador da qualidade ambiental devido a percepção de que essa espécie é bastante afetada pela ação antrópica, podendo inclusive demonstrar alterações significativas no número populacional de indivíduos de um local impactado (GHISI et al., 2016). Além disso, apresenta menor grau de higidez, maior carga parasitária e danos citogenéticos quando residentes em locais mais degradados (FERREIRA, 2017; GHISI et al., 2016).

Assim, assumindo o pressuposto que animais que habitam ambientes degradados apresentarão alterações genéticas, enzimáticas e alteração no fator de condição, este estudo tem como objetivo verificar os possíveis efeitos genotóxicos e enzimáticos em exemplares de *Hypostomus ancistroides*

capturados em um rio urbanizado, por meio da análise de micronúcleos e ENAs, análise enzimática, e da estimativa do bem estar dos animais por meio da avaliação do fator de condição.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área de estudo e dos pontos de coletas

O rio Toledo (Figura 1) possui extensão aproximada de 26,5 km e corre no sentido leste-oeste (WINTER; BRAUN; LIMA, 2005). Sua bacia hidrográfica é considerada uma sub-bacia inserida na bacia do rio São Francisco Verdadeiro que, por sua vez, são integrantes da bacia hidrográfica do Paraná III (NIEWEGLOWSKI, 2006). O rio drena uma área de aproximadamente 92 km² e toda sua extensão está englobada no território do município de Toledo. Sua nascente está localizada entre os distritos de São Luiz do Oeste e Linha Gramado, com a maior parte de seu curso localizado na área urbana, desaguando no Rio São Francisco Verdadeiro, logo abaixo do centro urbano de Toledo (TOLEDO, 2010; TOLEDO, 2017).

A escolha dos pontos de amostragem no rio Toledo foi baseada no fato destes locais se situarem dentro (ponto 1: P1) e logo após (ponto 2: P2) a área urbana de Toledo (Figura 1; Tabela 1), apresentando elevada taxa de carga orgânica (TABORDA et al., 2020). Para efeito de comparação, amostragens foram também realizadas no rio Santa Quitéria (ponto 3: P3) (Figura 1; Tabela 1), um rio não urbanizado localizado na área rural do município de Toledo.

O rio Santa Quitéria localiza-se na região sul do município de Toledo, na divisa do município com São Pedro do Iguaçu; drena uma área de 138,25 km², possui extensão de 39,73 km e deságua no rio São Francisco Verdadeiro (TOLEDO, 2010; TOLEDO, 2017). Sua mata ciliar é bastante preservada, com fragmentos de áreas reflorestadas, além de áreas de vegetação densas que em alguns trechos ultrapassam 2 km de largura. Atividades agrícolas em grandes fazendas como o plantio de grãos, eucaliptos e pecuária são observados por toda sua extensão (TOLEDO, 2017).

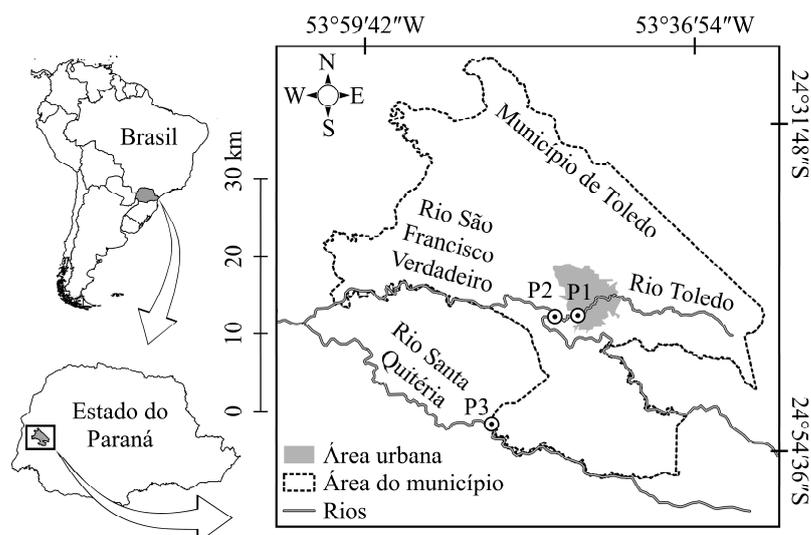


Figura 1 – Localização dos pontos de amostragens de *Hypostomus ancistroides* nos rios Toledo (P1 e P2) e Santa Quitéria (P3), na região Oeste do Paraná.

Tabela 1 – Coordenadas geográficas e caracterização dos pontos de coleta de *Hypostomus ancistroides* no rio Toledo e no rio Santa Quitéria, região Oeste do Paraná.

Rio	Ponto de Coleta	Coordenadas Geográficas	Características
Toledo	P1	24° 44'10.60" S 53° 45'06.28" O	Localizado na área urbana do município de Toledo, cerca de 100 metros acima da ponte do contorno Sul (Jd. Bressan). Possui a margem direita bem preservada e mata ciliar com aproximadamente 50 metros de largura enquanto a mata ciliar da margem esquerda é pouco preservada com cerca de 15 metros de largura. Em seu entorno há o predomínio de loteamentos habitacionais e pouca atividade agrícola. Rio com fundo arenoso-rochoso, com depósito de matéria orgânica e lodo junto as margens e cerca de 1,5 metro de profundidade e 10 metros de largura.
	P2	24° 45' 14.35" S 53° 46' 33.91" O	Localizado logo após a área urbana a cerca de 300 metros da sua foz, próximo à pedreira municipal de Toledo. Este local possui mata ciliar bem preservada com aproximadamente 230 metros de largura. Em seu entorno há o predomínio de atividades agrícolas (lavoura de soja e milho) e suinocultura em sua margem esquerda e mineração na direita. Local com fundo arenoso-rochoso, com depósito de matéria orgânica e lodo junto às margens e cerca de 1 metro de profundidade e 10 metros de largura.
Santa Quitéria	P3	24° 52' 48" S 53° 50' 49" O	Localizado no sul do município de Toledo, este local está inserido na área rural do município. A mata ciliar é bem preservada, com consideráveis áreas de vegetação densa. Há fragmentos de áreas reflorestadas e atividade agrícola por toda a extensão desse rio, principalmente a pecuária no ponto em questão. O ponto de coleta tem o fundo arenoso-rochoso com locais mais rasos e corredeiras e poços com profundidade de cerca de 1,5 metros.

2.2 - Caracterização da espécie

Hypostomus ancistroides, conhecido popularmente como cascudo, é comum na maioria dos ambientes dulcícolas de toda América do Sul (GARAVELLO e GARAVELLO, 2004). Esta espécie é pertencente à família Loricariidae, e tem como principal característica hábitos bentônicos, permanecendo no fundo de corpos aquáticos, alimentando-se de invertebrados e, principalmente, raspando algas do substrato (BRITSKI et al., 1999). *H. ancistroides* possui grande potencial econômico, e é pescado intensamente em rios urbanizados da região sul do Brasil, devido a sua abundância e ao fato de sua carne ser apreciada por não conter espinhos em formato de Y (GHISI et al., 2016).

A alimentação desta espécie baseia-se quase que exclusivamente de detrito e algas, relacionado ao ambiente bentônico (BONATO, 2008; CARDONE, 2006; GARAVELLO e GARAVELLO, 2004; GONÇALVES, 2010), obtidos da raspagem do material existente sobre o fundo e rochas dos córregos que essa espécie habita. A obtenção do alimento ocorre devido a ação de dentes em forma de pentes móveis, favorecendo assim sua permanência e fixação nas porções bentônicas dos ambientes aquáticos (GARAVELLO e GARAVELLO, 2004).

Segundo Garavello e Garavello (2004), a região bucal destes indivíduos possui um disco oral, que serve para produzir alta ação suctória, sendo utilizado, juntamente com espinhos das nadadeiras peitorais e pélvicas, na fixação e ancoragem no fundo de rios. Já a nadadeira caudal de *H. ancistroides* promove locomoção pelo leito e coluna da água, devido a seu formato entalhado.

Além disso, *H. ancistroides* apresenta comportamento de guarda de ninho, não migratório (SOFIA et al., 2008) e hábitos noturnos (CASATTI, 2002). Devido a essas características, seu hábito alimentar e sua ampla ocorrência em rios urbanizados (OLIVEIRA e BENNEMANN, 2005), a espécie compreende um importante indicador da qualidade ambiental (GHISI et al., 2016).

2.3 – Amostragens e procedimentos laboratoriais

As amostragens de *H. ancistroides* ocorreram nos períodos de verão (janeiro e março) e inverno (agosto e setembro) de 2020, com auxílio de redes

de espera simples de malha 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 cm entre nós, e redes de tresmalhos (feiticeiras) de malha 6, 7 e 8 cm entre nós não adjacentes, as quais foram armadas no entardecer e retiradas no amanhecer do dia seguinte. Após a captura, os exemplares foram identificados morfológicamente de acordo com Nogueira et al. (2020), e alojados em tambor contendo água do próprio rio e aerador. Em seguida, foram transportados vivos para o laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, *Campus* de Toledo (PR), onde foram realizados os procedimentos para obtenção do material biológico.

Este estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE (Protocolo nº 37/19). Antes da manipulação e realização da eutanásia, os animais foram anestesiados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013), utilizando solução de eugenol a 10% diluída em recipiente contendo 5 litros de água. Após constatação da ausência de movimentos operculares dos peixes, os dados de peso (P; g) e comprimento total (CT; cm) foram obtidos. Em seguida, foi coletada amostra de sangue e de tecido hepático de todos os indivíduos para realização do teste de micronúcleo e das atividades enzimáticas.

A fim de caracterizar as condições ambientais, foram registrados os valores de variáveis abióticas da água por meio de aparelho multiparâmetro (AAKER *Professional Plus*), sendo: temperatura da água (°C), oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹ e % de saturação), condutividade elétrica (μS.cm⁻¹), sólidos totais dissolvidos (mg.L⁻¹) e pH.

2.4 – Análises

2.4.1 - Teste de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares (ENAs)

Para observação da frequência de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares em hemácias periféricas, seguiu-se o protocolo de Heddle (1973) e Schmid (1975). O sangue foi retirado dos animais por meio de punção cardíaca com auxílio de seringa hipodérmica estéril de 3 ml, heparinizada com anticoagulante EDTA Na₂. Após extração, uma gota do sangue foi colocada em uma lâmina de microscopia previamente identificada e limpa com álcool

isopropílico e realizado esfregaço pela superfície da lâmina. Após secar por 24 horas, as lâminas foram fixadas em etanol 96% durante 10 minutos e, posteriormente, coradas com Giemsa 10% diluído em tampão fosfato (pH 6,8), por 10 minutos. Ao término do procedimento, as lâminas foram lavadas com água destilada e ficaram dispostas para secagem.

As análises dos esfregaços foram realizadas com auxílio de microscópio ótico, sob aumento de 1.000X, procedendo varredura sistemática e quantificação do número de 1.000 células íntegras por lâmina por espécime. As células íntegras, sem nenhum tipo de alteração morfonuclear ou micronúcleo em seu citoplasma, foram consideradas normais. Já as células que apresentaram corpos no citoplasma nitidamente separados do núcleo, de mesma cor e aspecto nuclear e que não ultrapassaram 1/3 de seu tamanho, foram consideradas como células contendo micronúcleos. As alterações no formato elíptico normal dos núcleos dos eritrócitos que não se enquadraram nos parâmetros de micronúcleo descritos acima, foram quantificadas como alterações morfológicas nucleares, e foram classificadas segundo a categorização de Carrasco et al. (1990), como *lobbed* (lobado), *blebbed* (em bolha), *vacuolated* (vacuolado), *binucleated* (binucleado) e *notched* (entalhado). Para o teste do micronúcleo e ENAs, foram analisados 128 indivíduos, sendo 52 do ponto 1 (rio Toledo), 44 do ponto 2 (rio Toledo) e 32 indivíduos do ponto 3 (rio Santa Quitéria).

2.4.2 – Testes enzimáticos

Após eutanásia, os animais foram dissecados e o fígado de cada exemplar foi extraído. Em seguida, os tecidos hepáticos foram transferidos para tubos tipo *ependorf*, que tiveram suas tampas perfuradas, previamente preparados e identificados, que foram imediatamente acondicionados em galão contendo nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram transferidas para ultrafreezer a -80°C onde ficaram acondicionadas até o momento dos ensaios bioquímicos. Para as análises do perfil enzimático, foram analisados 111 indivíduos, sendo 40 do ponto 1 (rio Toledo), 40 do ponto 2 (rio Toledo) e 31 do ponto 3 (rio Santa Quitéria).

Os tecidos foram descongelados e homogeneizados (1:10 p/v) em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5. O homogenato foi então centrifugado a 15.000 g por 30 min a 4°C por 10 minutos. Uma fração da amostra foi utilizada para determinação da concentração de proteínas de acordo com o método proposto por Bradford (1976). Após a leitura da proteína no comprimento de onda de 595 nm, as amostras foram normalizadas para concentração de 1 mg/mL para a realização dos ensaios.

Para a análise da atividade da enzima catalase (CAT), foi utilizada a metodologia de Aebi (1984), na qual ocorre o decréscimo de absorbância a 240 nm baseado na degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada conforme Crouch et al. (1981) e baseia-se na capacidade da SOD em inibir a redução do azul de nitrotetrazólio para azul de formazan pelo radical superóxido gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, sendo medida espectrofotometricamente a 560 nm.

Para a determinação da atividade da glutathione transferase (GST), foi utilizada a metodologia descrita por Habig et al. (1976), a qual parte do princípio de que o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) é metabolizado pela GST, conjugado à enzima glutathione reduzida (GSH), com aumentos de absorbância em 340 nm. Durante o ensaio, a GST catalisa a conjugação da GSH com o substrato sintético CDNB que produz um conjugado, o qual é detectado em 340 nm. A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado.

A atividade da enzima LPO foi estimada pelo método de TBARS (FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007), fundamentada em medir MDA, que é um produto de endoperóxido de ácidos graxos insaturados resultados da oxidação de substratos lipídicos. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um cromógeno rosa (TBARS), que é medido à 535 nm.

2.4.3 – Fator de Condição

Após eutanásia dos animais, foram obtidos o comprimento total (CT; cm), com auxílio de um ictiômetro, e peso total (P; g), utilizando uma balança eletrônica de precisão. Os dados foram plotados no programa Excel. Foram

analisados 136 indivíduos, sendo 53 no ponto 1 (rio Toledo), 51 no ponto 2 (rio Toledo) e 32 indivíduos coletados no ponto 3 (rio Santa Quitéria).

A condição corporal dos indivíduos de *H. ancistroides* foi calculada por meio do Índice de Massa Escalonada (\hat{M}_i) proposto por Peig e Green (2009), utilizando a seguinte fórmula:

$$\hat{M}_i = M_i \left[\frac{L_0}{L_i} \right]^{b_{SMA}}$$

Sendo, M_i e L_i a massa corporal e a medida linear do corpo do indivíduo i , respectivamente; b_{SMA} o expoente escalonado estimado pela regressão SMA (*Standardized Major Axis*) de M em L ; L_0 é um valor arbitrário de L (no caso, o valor médio aritmético para a população em estudo); e \hat{M}_i é a massa corporal prevista para o indivíduo i quando a medida do corpo linear é padronizada para L_0 .

O Índice de Massa Escalonada padroniza a massa corporal a um valor fixo de uma medida linear do corpo com base na relação de escala entre massa e comprimento. Essa relação foi obtida através de transformações logarítmicas das medidas de peso e comprimento dos indivíduos de *H. ancistroides* e ajustada a regressão linear entre $\log Wt$ (peso total) e $\log Ls$ (comprimento padrão).

2.4.4 – Análises estatísticas

Os dados do teste de micronúcleos e ENAs foram submetidos a testes de pressupostos de normalidade e homocedasticidade, a partir dos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. Dados paramétricos foram analisados utilizando o teste ANOVA *one-way*, enquanto dados não paramétricos foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

Os dados das análises enzimáticas foram também submetidos a testes de pressupostos de normalidade e homocedasticidade, a partir dos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. Dados paramétricos foram analisados utilizando o teste ANOVA *one-way*, enquanto dados não paramétricos foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Posteriormente, foi realizado um teste post-hoc de comparação múltiplas.

O Índice de Massa Escalonada foi submetido à análise de variância fatorial em relação as estações em que ocorreram as coletas, seguida do teste de comparação de médias de Tukey. Os resultados foram submetidos a um teste ANOVA *one-way*, e posteriormente foi realizado um teste post-hoc, de comparações múltiplas, para verificar a diferença entre os pontos em cada estação.

Para a análise multivariada dos dados, foi realizada análise discriminante pelo método discriminante linear de Fisher para organizar os indivíduos nos três locais amostrados. Para isso, foram incluídos nas análises 111 indivíduos, sendo 40 do ponto 1 (rio Toledo), 40 no ponto 2 (rio Toledo) e 31 indivíduos do ponto 3 (rio Santa Quitéria). A análise discriminante também foi realizada para cada um dos pontos de coleta separadamente, para classificar os indivíduos de acordo com a estação do ano.

O nível de significância adotado foi $P < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o software STATISTICA® (*data analysis software system*) (StatSoft, 2007), Matlab e o Excel®.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos acerca das variáveis abióticas de ambos os rios podem ser observados na Tabela 2. Nota-se grande diferença entre os rios para algumas variáveis, principalmente com relação ao oxigênio dissolvido, condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos e pH. O rio Toledo apresentou os menores valores de oxigênio dissolvido e pH durante o verão e os maiores valores de condutividade elétrica e sólidos totais dissolvidos em ambas as estações.

Tabela 2 - Valores médios das variáveis abióticas nos pontos de amostragens de *Hypostomus ancistroides* dos rios Toledo (pontos 1 e 2) e Santa Quitéria (ponto 3), região Oeste do Paraná, no verão e inverno de 2020.

Variáveis Abióticas	Locais de Amostragem					
	Rio Toledo				Rio Sta. Quitéria	
	Ponto 1		Ponto 2		Ponto 3	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno
Condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	248,30	319,50	250,10	335,70	50,35	47,22
Oxigênio dissolvido (% saturação)	75,50	94,80	74,90	102,30	106,90	104,20
Oxigênio dissolvido (mg.L^{-1})	6,05	8,57	6,02	9,00	9,29	9,05
pH	5,78	5,45	5,76	5,37	6,54	5,65
Sólidos totais dissolvidos (mg.L^{-1})	165,75	241,80	165,80	248,30	36,40	34,20
Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$)	23,00	17,90	22,60	19,00	19,90	19,90

Foram observados micronúcleos e outras alterações nucleares em *H. ancistroides* de ocorrência tanto na área urbana do rio Toledo quanto na zona rural do rio Santa Quitéria (Tabela 3). Observou-se que os espécimes do ponto 2, no rio Toledo, no período inverno, apresentaram os maiores taxas de alterações nucleares, principalmente do tipo *lobbed*, seguido pelos espécimes amostrados no ponto 1, também no rio Toledo no período inverno. Os exemplares do rio Santa Quitéria (ponto 3) apresentaram os menores números de ocorrências de ENAs em ambas as estações (Tabela 3).

Apesar de, na região urbana do rio Toledo, o número total de ENAs nos exemplares de *H. ancistroides* ter sido ligeiramente maior do que aquele observado para os espécimes da região rural do rio Santa Quitéria (tabela 3), não houve diferença estatística significativa entre os locais de amostragens ($p > 0,05$). No entanto, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos quando se considerou as diferentes estações (verão/inverno) (Figura 2). Essa diferença foi determinada principalmente pelos maiores valores de ENAs observados nos espécimes do ponto 2, no inverno (Figura 3). Além disso, os exemplares de *H. ancistroides* amostrados no ponto 2, durante o inverno, diferiram dos demais grupos também quanto às alterações do tipo *blebbed*, *lobbed*, *notched* e micronúcleo ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Números de ocorrência, médias (X) e desvios padrão (DP) de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares (*blebbed*, *lobbed*, *notched*, *binucleated* e *vacuolated*) observados em *Hypostomus ancistroides*, coletados no ano de 2020, nos rios Toledo e Santa Quitéria, no Paraná.

Estação	Locais	Rio Toledo				Rio Santa Quitéria	
		Ponto 1		Ponto 2		Ponto 3	
	Classificação	N. de ocorrências	X ± DP	N. de ocorrências	X ± DP	N. de ocorrências	X ± DP
Verão	<i>Blebbed</i>	6	0,24 ± 0,60	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00
Verão	<i>Lobbed</i>	2	0,08 ± 0,28	2	0,10 ± 0,30	1	0,09 ± 0,30
Verão	<i>Notched</i>	2	0,08 ± 0,40	0	0,00 ± 0,00	1	0,09 ± 0,30
Verão	<i>Binucleated</i>	1	0,04 ± 0,20	3	0,14 ± 0,36	2	0,18 ± 0,60
Verão	<i>Vacuolated</i>	1	0,04 ± 0,20	0	0,00 ± 0,00	0	0,00 ± 0,00
Verão	Micronúcleo	2	0,08 ± 0,28	2	0,10 ± 0,30	0	0,00 ± 0,00
Verão	Total	14	0,09 ± 0,35	7	0,06 ± 0,23	4	0,06 ± 0,29
Inverno	<i>Blebbed</i>	12	0,44 ± 0,60	23	1,00 ± 1,10	7	0,33 ± 0,56
Inverno	<i>Lobbed</i>	7	0,26 ± 0,51	39	1,70 ± 1,80	7	0,33 ± 0,56
Inverno	<i>Notched</i>	4	0,15 ± 0,45	18	0,78 ± 1,06	3	0,14 ± 0,35
Inverno	<i>Binucleated</i>	2	0,07 ± 0,26	3	0,21 ± 0,51	0	0,00 ± 0,00
Inverno	<i>Vacuolated</i>	1	0,04 ± 0,19	1	0,04 ± 0,20	1	0,04 ± 0,21
Inverno	Micronúcleo	6	0,22 ± 0,42	11	0,48 ± 0,71	1	0,04 ± 0,21
Inverno	Total	32	0,20 ± 0,44	95	0,70 ± 1,16	19	0,15 ± 0,42

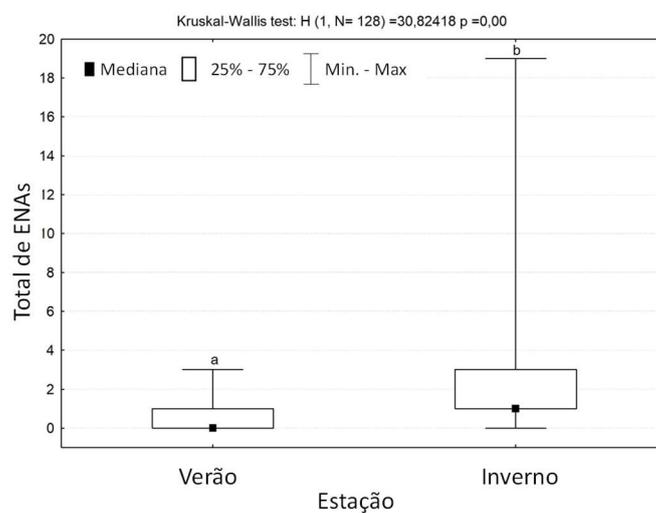


Figura 2 – Total de alterações morfológicas nucleares (ENAs) presentes em espécimes de *Hypostomus ancistroides* coletados nos rios Toledo e Santa Quitéria, nas estações do ano (verão e inverno), na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020. Letras diferentes sobre as barras (a, b) representam diferença significativa.

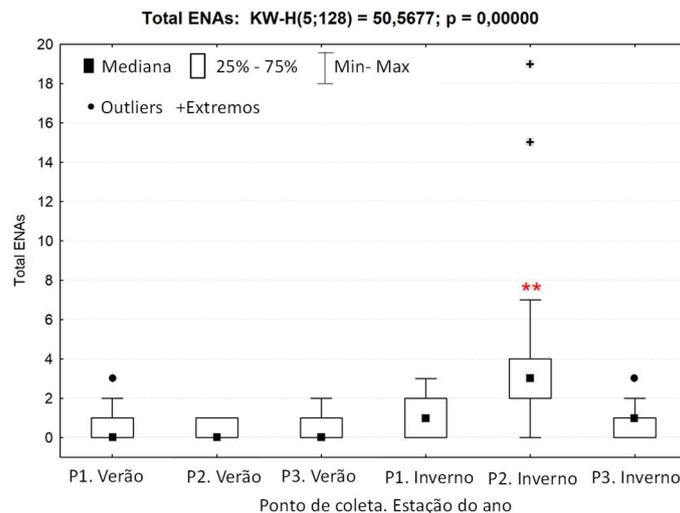


Figura 3 – Total de alterações morfológicas nucleares (ENAs) presentes em espécimes de *Hypostomus ancistroides* coletados nos rios Toledo e Santa Quitéria, nos diferentes pontos amostrais (P1, P2 e P3), na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020. Os asteriscos significam que no local existe diferença significativa.

Devido ao fato de o rio Toledo ser urbanizado, este apresentou piores índices de variáveis abióticas. Isso pode ser explicado pelo fato deste rio ser acometido por uma maior quantidade de efluentes industriais e domésticos, decorrentes do processo de urbanização (BARRETO et al., 2014).

As variáveis abióticas relacionadas à qualidade da água confirmam o elevado grau de impacto no rio Toledo, como demonstrado pelos maiores valores de condutividade elétrica e sólidos totais em suspensão, bem como os menores valores de oxigênio dissolvido e pH. Alguns dos fatores externos que ocasionam a diminuição no nível de oxigênio dissolvido são a decomposição de matéria orgânica e oxidação de íons metálicos (ESTEVES, 2011). Corpos aquáticos urbanizados, como é o caso do rio Toledo, são acometidos diariamente com despejos em seus cursos, recebendo desde fluidos do sistema de tratamento de esgoto até enxurradas do sistema pluvial. Nessa condição, muitas substâncias, até mesmo contaminantes, podem chegar às águas, alterando as variáveis abióticas do ambiente (AQUINO, 2013; BERTI, 2009; FILHO, 2006).

Valores baixos de pH e de oxigênio dissolvido e valores altos de condutividade e sólidos dissolvidos são característicos de ambientes aquáticos poluídos. Valores de condutividade acima de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, como os observados no ponto 1 e 2, pertencentes ao rio Toledo, são indicativos de ambiente impactado por ações antrópicas e de características corrosivas da água

(CONAMA 2005). Devido a esses fatores, pode-se dizer que, possivelmente, a maior ocorrência de danos ENAs em *H. ancistroides* coletados no rio Toledo, comparados aos indivíduos coletados no rio Santa Quitéria, está diretamente relacionado com o maior nível de degradação apontado pelas análises dos fatores abióticos de ambos os rios.

No presente estudo foi constatado que as maiores taxas de danos estão presentes nos peixes coletados no rio Toledo, no período do inverno, mostrando assim diferença estatística significativa quando comparado aos resultados obtidos no rio Santa Quitéria nesta mesma estação do ano (Figura 2). Jobling (1995) descreve que durante a estação do inverno, as temperaturas são mais baixas e ocorre uma queda significativa na atividade de decompositores, diminuindo assim a disponibilidade de nutrientes que são absorvidos pelos produtores e disponibilizados para os próximos níveis tróficos. Além deste fato, como salienta Ghisi et al. (2016), a dificuldade na obtenção de nutrientes e manutenção das funções fisiológicas, somada ao estresse ocasionado pela poluição e contaminação do ambiente, podem estar relacionadas com as maiores ocorrências de danos ao DNA das células observadas nos testes de micronúcleo e danos ENAs.

Como salienta Bolognesi et al. (2006), a diminuição da temperatura da água que ocorre durante o período do inverno, afeta diretamente diversas funções fisiológicas dos peixes, pois este estresse ambiental desencadeia processos metabólicos, que podem ser responsáveis pelo aumento na incidência de danos ENAs.

Sendo assim, as maiores taxas significativas de danos ENAs foram encontradas nos indivíduos coletados no ponto 2 do rio Toledo, durante o período do inverno, possivelmente por ser a estação com menor temperatura, além deste ponto conter os piores índices abióticos de condutividade elétrica, pH e sólidos dissolvidos, quando comparado aos demais pontos, nesta mesma estação (Tabela 2).

Quanto às análises enzimáticas, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os pontos de coleta ou entre as estações para catalase (CAT). Como salienta Martinez (2006), a catalase é uma enzima chave que faz parte do sistema de defesa antioxidante em peixes, sendo essencialmente importante no processo de detoxificação do organismo destes animais, já que a atividade desta

enzima pode ser um útil indicador de estresse oxidativo. A catalase está presente em todos os tecidos dos peixes, mas possui uma atividade particularmente alta nas células hepáticas destes animais (HERMES-LIMA, 2004).

Já a enzima glutathione transferase (GST) (Figura 4) apresentou maiores valores para indivíduos coletados no ponto 1 durante o período do inverno. A enzima GST exerce papel importante no organismo de peixes, pois catalisa a conjugação de vários compostos e desempenha funções no processo de detoxificação, reduzindo o processo de ligação de compostos tóxicos a macromoléculas celulares, como o DNA (STEGEMAN et al., 1992). Aumentos na atividade hepática da enzima GST em peixes já foram relacionados com a exposição destes a contaminantes orgânicos (SIMONATO et al., 2006)

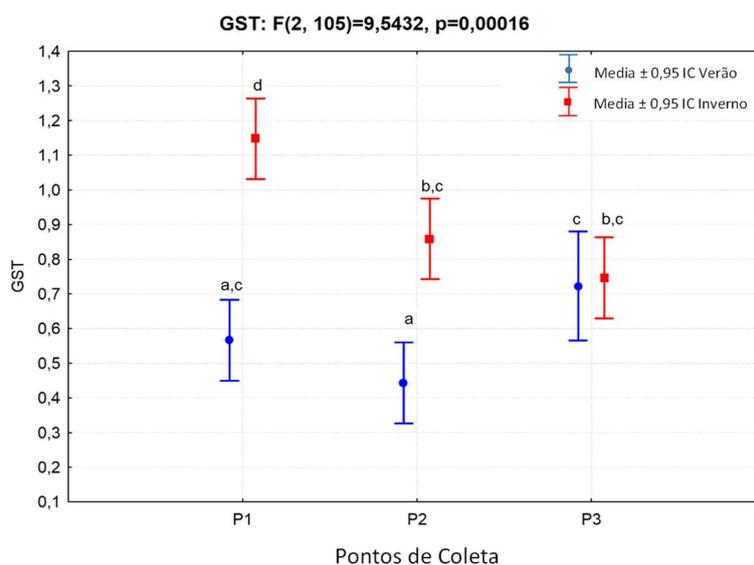


Figura 4 – Análise da enzima glutathione S transferase (GST) em *Hypostomus ancistroides* coletados nos rios Toledo e Santa Quitéria, nos diferentes pontos amostrais (P1, P2 e P3), na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020. Letras diferentes sobre as barras (a, b, c) representam diferença significativa.

Autores como Amado (2006) e Carvalho (2013) salientam que peixes coletados durante o período do verão apresentaram aumento significativo na atividade da enzima GST no fígado, quando comparado ao período de inverno, pois esse aumento pode ocorrer devido a um ajuste de defesa antioxidante presente em peixes de regiões subtropicais. No presente estudo vemos que o aumento na atividade desta enzima ocorre durante o período de verão.

Sendo assim a partir dos estudos de Almeida et al. (2005) e Camargo e Martinez (2006), que relacionam a ocorrência de aumento na atividade da enzima GST em peixes expostos ao sedimento coletado de ambientes poluídos e também em peixes residentes em ambientes impactados, quando comparados com animais coletados em locais mais preservados. Como salienta Gallagher et al. (2001), a alta atividade da GST em peixes pode ocorrer devido a um processo adaptativo destes indivíduos à presença de compostos orgânicos no ambiente aquático. Como podemos observar (Tabela 2), a quantidade de sólidos totais dissolvidos na água do rio Toledo é alta, reforçando assim, a suposição de que esta maior concentração de matéria orgânica presente no rio Toledo pode causar aumento na atividade da enzima GST nos peixes coletados neste rio.

Os peixes coletados no ponto 2, durante verão, mostraram diferenças significativas para a enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 5). Como salienta Martinez (2006), peixes residentes em ambientes contaminados apresentam maior atividade da enzima SOD. Essa enzima desempenha papel antioxidante e está envolvida na regulação da concentração de oxigênio intracelular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2005; HERMES-LIMA, 2004). Além de constituir o sistema antioxidante, esta enzima é essencial nos processos de detoxificação, tornando--se assim um útil indicador de estresse oxidativo e ambiental (MARTINEZ, 2006).

O aparecimento de danos ENAs em espécies de peixes, assim como uma maior atividade da enzima SOD, estão diretamente associados ao estresse ambiental causado pela degradação e poluição do ambiente aquático (BOLOGNESI et al., 2006; MARTINEZ, 2006).

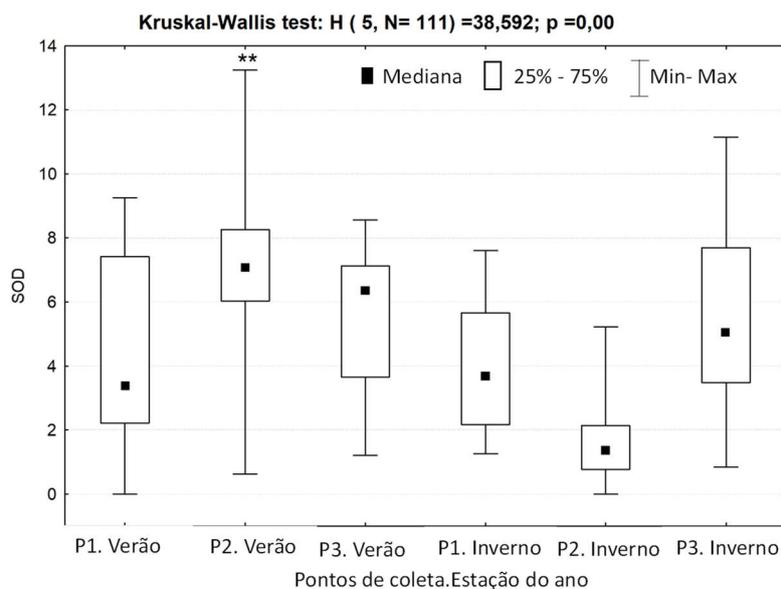


Figura 5 – Análise da enzima superóxido dismutase (SOD) em *Hypostomus ancistroides* coletados nos rios Toledo e Santa Quitéria, nos diferentes pontos amostrais (P1, P2 e P3), na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020. Os asteriscos significam que no local existe diferença significativa.

Ao analisarmos os resultados dos fatores abióticos obtidos durante o período do verão, percebemos que as piores condições em relação ao oxigênio dissolvido e pH, encontram-se no ponto 2, ponto esse que apresentou diferenças significativas da enzima SOD, quando comparado aos resultados desta enzima em animais coletados nos demais pontos, podendo ser consequência da intensa degradação ambiental neste ponto, que é demonstrada pelos resultados obtidos dos fatores abióticos.

Quanto à lipoperoxidação (LPO), os pontos 2 e 3, inverno, difeririam estatisticamente do ponto 1, verão (Figura 6). Segundo Forgati (2016), a LPO forma subprodutos prejudiciais as células, apresentando efeitos danosos as membranas celulares, podendo comprometer de maneira drástica o funcionamento celular e tecidual. Sendo assim, a LPO pode ser considerada uma das principais causadoras de morte celular em organismos aquáticos e por estes motivos a avaliação da LPO é muito utilizada como um marcador do estresse oxidativo (MUELLER et al, 2012). Como salienta De Zwart et al. (1999), dentre os processos de oxidação a LPO, além de causar danos a membranas celulares, também podem causar danos ao DNA de células.

Ao analisar a Figura 6, percebe-se diferenças estatísticas significativas para o ponto 2 durante o período do inverno da enzima LPO, além disso neste

mesmo ponto durante o mesmo período também foi possível observar uma incidência significativa de danos de ENAs nos mesmos indivíduos, sugerindo que o aumento na LPO, pode estar relacionado com danos ao material genético de células.

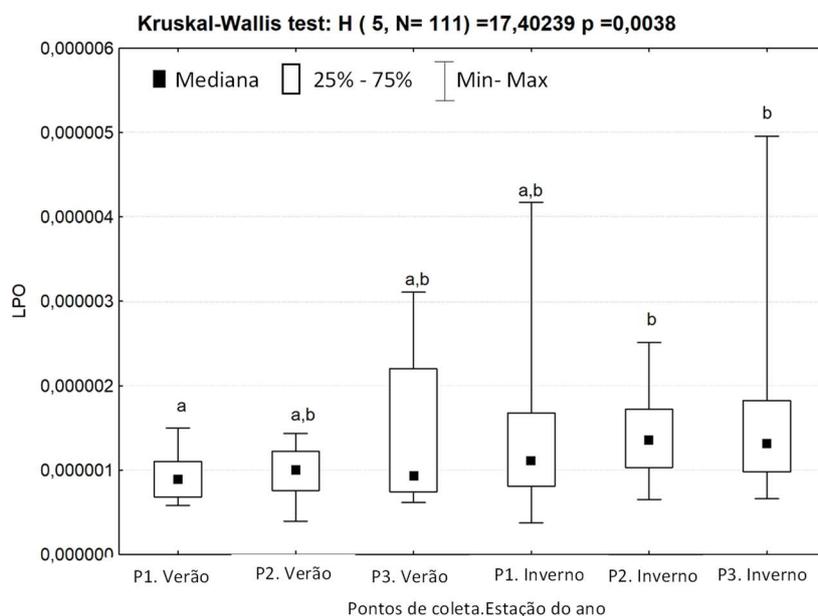


Figura 6 – Análise da lipoperoxidação (LPO) em *Hypostomus ancistroides* coletados nos rios Toledo e Santa Quitéria, na região Oeste do Paraná, nos diferentes pontos amostrais (P1, P2 e P3), na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020. Letras diferentes sobre as barras (a, b) representam diferença significativa.

Segundo Oliveira e Souza (2006), a observação dos níveis de LPO também tem sido muito utilizado em ambientes aquáticos para o monitoramento da poluição por metais. Como mostra a Figura 6, os animais coletados no ponto 3, durante o período do inverno, também mostraram diferenças estatisticamente significativas para LPO. Tal fato pode estar relacionado ao tipo de atividade econômica agrícola desenvolvida no ambiente rural onde se encontra o rio Santa Quitéria, além do tipo de solo existente no local. A alta concentração de metais no ambiente aquático, além dos de origem geoquímica, podem ser oriundos de resíduos de pesticidas e fertilizantes utilizados em atividades agrícolas (JENG, 1992).

De acordo com a análise multivariada dos resultados obtidos referentes ao teste do micronúcleo e das análises enzimáticas (Figura 3), percebe-se uma tendência de segregação dos espécimes de acordo com os pontos de coleta, de forma que os indivíduos coletados no rio Toledo (pontos 1 e 2) foram separados

entre si em relação ao eixo 1, enquanto que os indivíduos coletados no rio Santa Quitéria foram segregados dos espécimes do rio Toledo em relação ao eixo 2. Os biomarcadores que mais influenciaram nesta segregação foram GST (glutathione S transferase) e alteração morfológica nuclear do tipo *lobbed*, para o eixo 1, e LPO (lipoperoxidação) e SOD (superóxido dismutase) para o eixo 2.

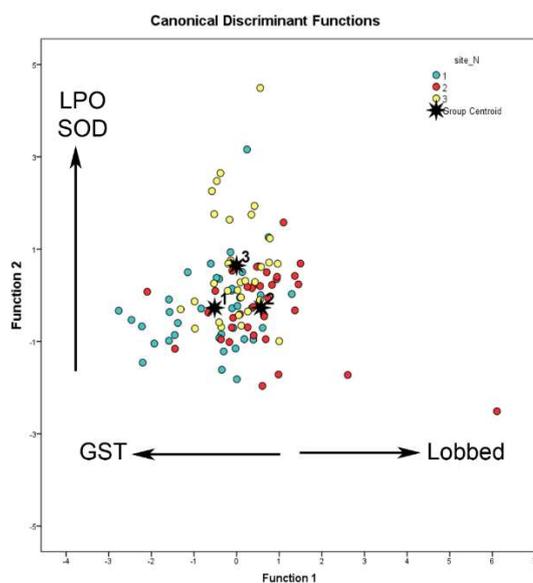


Figura 7 – Análise multivariada dos resultados dos testes do micronúcleo e enzimáticos de *Hypostomus ancistroides*, sendo site 1 (ponto 1), site 2 (ponto 2) e site 3 (ponto 3), coletados nos rios Toledo e Santa Quitéria, na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020.

Em relação ao fator de condição dos indivíduos analisados, percebemos que, em média, o valor observado nos indivíduos do ponto 3 é superior aos peixes dos demais pontos (Figura 7). Durante o período de verão, não houve diferença estatística significativa entre os pontos analisados. Já no período de inverno, percebe-se diferença estatística entre o ponto 2 e 3 ($p < 0,05$). Sendo assim, pode-se dizer que os indivíduos do ponto 3, no período do inverno, possuem um melhor índice de fator de condição do que os indivíduos do ponto 2 nesta mesma estação.

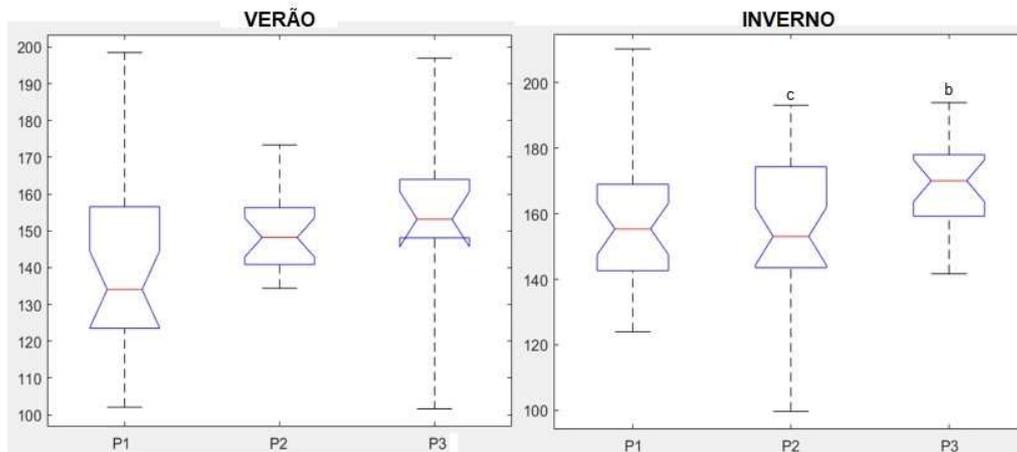


Figura 8 – Mediana, primeiro e terceiro quartil do fator de condição de espécimes de *Hypostomus ancistroides* coletados no rio Toledo, pontos 1 e 2, e no rio Santa Quitéria, ponto 3, na região Oeste do Paraná, durante o período de verão e inverno do ano de 2020. Letras diferentes sobre as barras (b, c) representam diferença significativa.

No estudo realizado por Ferreira (2017) com indivíduos da espécie *H. ancistroides*, foi avaliado o fator de condição e foi constatado que, em ambientes mais degradados, estes indivíduos apresentaram valores mais baixos do fator de condição. Este fato também foi observado no presente estudo, pois a média do valor do fator de condição dos indivíduos coletados nos pontos 1 e 2 foi menor do que a média dos indivíduos coletados no ponto 3, existindo diferença estatística significativa na estação do inverno entre o ponto 2 e 3. Este fato possivelmente ocorreu devido a diferença entre os resultados dos fatores abióticos, levando em consideração que esses resultados se apresentaram piores no ponto 2, pertencente ao rio Toledo, durante o período de inverno.

Como o fator de condição revela o grau de higidez de uma população, no trabalho de Ghisi et al. (2016), o valor do fator de condição de *H. ancistroides* mostrou-se menor em indivíduos que apresentaram maiores números de anormalidades observadas pelo teste bioindicador do micronúcleo e danos ENAs. Sendo assim, os maiores valores de fator de condição coincidiram com as menores taxas de danos celulares; resultado semelhante aos do presente estudo, em que o valor do fator de condição dos indivíduos coletados no ponto 3 durante o período de inverno, mostrou-se significativamente maior do que o valor encontrado para esta mesma análise no ponto 2, onde as taxas de danos celulares destes indivíduos apresentaram diferenças significativas para esta estação.

Sendo assim, observa-se que as diferenças significativas encontradas por meio das análises empregadas neste estudo, são mais ocorrentes no ponto 2 no período de inverno quando comparadas aos demais pontos, devido ao alto índice de mutações encontradas através da análise de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares, e para as quantidades das enzimas GST e LPO, bem como o ponto 2 também apresentou diferenças significativas para o fator de condição quando comparado com o ponto 3 ainda no período de inverno, levando em consideração que a avaliação das variáveis abióticas aferidas no ponto 2 pertencente ao rio Toledo, culminam para a obtenção dos resultados observados e discutidos.

4 - CONCLUSÃO

Sendo assim conclui-se que com base nas análises de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares, análises enzimáticas e fator de condição, pode-se dizer que o ponto 2 situado no rio Toledo, apresentou diferenças estatísticas em grande parte destas, quando comparado aos demais pontos, sendo possível encontrar nos exemplares analisados de *Hypostomus ancistroides*, incidência de alterações genéticas e enzimáticas, mostrando assim um alto risco de contaminação para os animais que nele habitam.

Já o ponto 3 que é situado em um rio não urbanizado apresentou diferenças em relação ao fator de condição, mostrando assim que uma melhor qualidade da água aferida neste ponto em comparação com os demais pontos, contribuiu significativamente para a redução dos danos genéticos nestes indivíduos, além de um maior índice de fator de condição.

Mesmo assim, percebe-se que ambos os ambientes são impactados pelas atividades humanas, e que estes impactos são mais visíveis durante o período de inverno.

Desta forma percebe-se a importância do uso de técnicas de monitoramento ambiental, tendo em vista a constante degradação do ambiente oriunda do processo de urbanização, já que essas técnicas podem implicar em ações preventivas e remediadoras em relação a degradação ambiental.

5 - REFERÊNCIAS

- AEBI, H. 1984. **Catalase in vitro**. Methods in Enzymology 105. 121-126.
- ALMEIDA, J. S.; MELETTI, P. C.; MARTINEZ, C. B. R. 2005. **Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus***. Comp. Biochem. Physiol. 356-363.
- AMADO, L. L.; ROSA, C. E.; LEITE, A. T. M.; MORAES, L.; PIRES, W. V.; PINHO, G. L. L.; MARTINS, C. D. M. G.; ROBALDO, R. B.; NERY, L. E. M.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A.; MARTÍNEZ, P. E.; MONSERRAT, L. A. G. 2006. **Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects**. Marine Pollution Bulletin, v. 52. 199-206.
- AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. 2013. **Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura**. Eng. Sanit. Ambient., v. 18, n. 3. 187-204.
- BARRETO, L. V.; FRAGA, M. S.; BARROS, F. M.; ROCHA, F. A.; AMORIM, J. S.; CARVALHO, S. R.; BONOMO, P.; SILVA, D. P. 2014. **Relação entre vazão e qualidade da água em uma seção de rio**. Ambiente & Água, v. 9, n. 1. 118-129.
- BERTI, A. P. 2009. **A importância da genética ecotoxicológica**. SaBios, Revista da Saúde e Biologia, v. 4, n. 1. 52-55.
- BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D.M.; SCIUTTO, A. 2006. **Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions**. *Aquatic Toxicology*. 93-98.
- BONATO, K. O.; ARAÚJO, M. I.; DELARIVA, R. L. 2008. **Dieta E Morfologia Trófica De *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) Em Dois Riachos Na Região De Maringá, Paraná**. Maringá, UNICESUMAR.
- 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. 248-254.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. 1999. **Peixes do Pantanal: Manual de Identificação**. Corumbá. Embrapa-SPI; Embrapa-CPAP.
- CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. 2006. **Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil**. Environ. Toxicol. Pharmacol. 61-69.

CARDONE, I. B. 2006. **Dieta E Morfologia Trófica De Espécies Do Gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Ostariophysi, Loricariidae) No Alto Curso Do Rio Corumbataí – Sp.** Rio Claro, Universidade Paulista.

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.** Fish Aquat 47. 2123–2136.

CASATTI, L., 2002. **Alimentação dos peixes em um riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do Alto Rio Paraná, sudeste do Brasil.** Biota Neotropica 2. 1-14.

CARVALHO, R. N. F.; ABREU, A. L. 2013. **Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil.** Latin american journal of aquatic research, v. 41, n. 2, 217–225.

CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2019. **Metabolismo dos poluentes em peixes.** Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/mortandade-peixes/metabolismo-dos-poluentes-nos-peixes/>> Acesso dia 26 de maio de 2019.

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A. 2009. **Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadores de impactos ambientais.** Natureza on line. 37-42.

CONAMA, Conselho Nacional Do Meio Ambiente. 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.** Diário Oficial [da] União, n. 53, 18 mar. 2005, p. 58-63. Disponível em: <http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf> Acesso dia 16 de novembro de 2020.

CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. 2013. **Diretrizes da prática de Eutanásia.** Resolução Normativa nº13. 22.

CROUCH, R. K.; Gandy, S. E.; Kimsey, G. 1981. **The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs.** Diabetes 35. 235-241.

DE ZWART, L.; MEERMAN, J.; COMMANDEUR, J.; VERMEULEN, N. 1999. **Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and in humans.** F.R.B. Medicine. v. 26, 202-226.

ESTEVES, F. A. 2011. **Fundamentos de limnologia.** Rio de Janeiro, Interciência, 3.ed. 602.

FEDERICI, G.; SHAW, B.; HANDY, R. 2007. **Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects.** *Aquatic Toxicology*, v. 84, n. 4. 415.

FERREIRA, G. F. 2017. **Relação peso-comprimento e fator de condição das espécies *Astyanax aff. paranae*, *Hypostomus ancistroides* e *Poecilia reticulata* em três ribeirões submetidos a diferentes graus de conservação.** Londrina, Universidade Tecnológica do Paraná.

FILHO, R. W. R.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. 2006. **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos.** São Paulo. *Química Nova.*, v. 29, n. 4. 817-822.

FORGATI, M. 2016. **Respostas Metabólicas de Brânquias de Peixes Antárticos Frente ao Estresse Térmico.** Universidade Federal do Paraná. Tese. 79-91.

GALLAGHER, E. P.; GROSS, T. S.; SHEEHY, K. M. 2001. **Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in lake Apopka brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*).** *Aquat. Toxicol.* 55. 223-237.

GARAVELLO, J. C.; GARAVELLO, J. P. 2004. **Spatial distribution and interaction of four species of the catfish genus *Hypostomus* Lacépède with bottom of Rio São Francisco, Canindé do São Francisco, Sergipe, Brazil.** *Braz. J. Biol.* 591-598.

GHISI, N. C.; ITO, K. M.; PRIOLI, A. J.; OLIVEIRA, E. C. 2012. **Relação peso-comprimento e fator de condição de *Astyanax aff. Paranae* (pisces) em corpos hídricos com diferentes níveis de interferência antrópica, no centro-oeste do Paraná.** *Ponta Grossa, Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 18, n. 1. 53-60.

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; MOTA, T. F. M.; VANZETTO, G. V.; ROQUE, A. A.; GODINHO, J. P.; BETTIM, F. L.; ASSIS, H. C. S.; PRIOLI, A. J. 2016. **Integrated biomarker response in catfish *Hypostomus ancistroides* by multivariate analysis in the Pirapo River, southern Brazil.**

GONÇALVES, L. B.; OLIVEIRA, S. A.; LIMA, S. E. 2010 **Hábitos alimentares da ictiofauna do córrego Franco, Mato Grosso do Sul, Brasil.** *Campinas. Biota Neotrop.* v. 10, n.2. 21-30. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032010000200001&lng=pt&nrm=iso>. Acesso dia 25 de outubro de 2020.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JACOBY, W. B. 1976. **Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mescapturic acid formation.** *Journal of Biological Chemistry* 249. 7130-7139.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 2005. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Oxford, Oxford University Press. 936.

HEDDLE, J. A. 1973. **A rapid in vivo test for chromosomal damage**. Mutation research 18. 187–190.

HERMES-LIMA, M. 2004. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals**. In: **STOREY, K.B.** (ed.) Functional metabolism: regulation and adaptation. New York, John Wiley & Sons, Inc. 319-368.

IVANINA, A. V.; HABINCK, E.; SOKOLOVA, I. M. 2008. **Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae)**. Comparative Biochemistry and Physiology. 148:72-79.

JENG, A. S.; BERGSETH, H. 1992. **Chemical and mineralogical properties of Norwegian alum shale soils, with special emphasis on heavy metal content and availability**. Acta Agric. Scand. B v. 42. 88-93.

JOBLING, M. 1995. **Environmental Biology of Fishes**. Chapman & Hall, London.

MARTINEZ, C. B. R. 2006. **Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água**. Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade Estadual de Londrina.

MUELLER, I. A.; DEVOR, D. P.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. 2012. **Exposure to critical thermal maxima increases oxidative stress in hearts of whitebut not red-blooded Antarctic notothenioid fishes**. Journal of Experimental Biology. v. 215, n. 20. 3655-3664.

NIWEGLOWSKI, A. A. 2006. **Indicadores De Qualidade Da Água Na Bacia Hidrográfica Do Rio Toledo – PR**. Curitiba, UFPR. Dissertação. 237.

NOGUEIRA, G. S.; BAUMGARTNER, D.; SANCHES, P. V. ; SEBASTIÉN, N. Y.; BAUMGARTNER, G.; DEBONA, T. 2020. **Levantamento da ictiofauna observada no percurso do rio Toledo**. In. Lindino, C. (Ed.) Eu, rio Toledo: Qualidade ambiental e perspectivas futuras. Edunioeste. Cascavel. v.1. 149-170.

OLIVEIRA, M. C.; SOUZA, V. H. E. 2006. **Utilização de biomarcadores de estresse oxidativo no monitoramento ambiental**. Revista UNINGÁ, n.10. 167-175.

OLIVEIRA, D. C. DE, BENNEMANN, S. T., 2005. **Ictiofauna, recursos alimentares e relações com as interferências antrópicas em um riacho urbano no sul do Brasil**. Biota Neotropica 5. 95-107.

PEIG, J.; GREEN, A. J. 2009. **New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method**. *Oikos*, 118. 1883–1891.

REIS-FILHO, R. W. R.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. 2006. **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos**. São Paulo, Química Nova. v. 29, n. 4. 817-822.

SCHMID, W. 1975. **The micronucleus test**. Mutation research, v. 31, n. 1. 9-15.

SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C. L.; MARTINEZ, C. B. R. 2006. **Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes**. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 76. 505-511.

SOFIA, S.H., GALINDO, B.A., PAULA, F.M., SODRE, L.M.K., MARTINEZ, C.B.R., 2008. **Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream**. Genet. Mol. Biol. 31. 317-323.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. 1992. **Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect**. In: HUGGET, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLEJR, P. M.; BERGMAN, H. L. (Ed) Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Lewis Publishers. 235-335.

TABORDA, J.; SEBASTIEN, N. Y.; BAUGARTNER, D.; SANCHES, P. V.; JOHANN, A. S. T. 2020. **Qualidade de água do rio Toledo por meio de análises físico-químicas e microbiológicas**. In. Lindino, C. (Ed.) Eu, rio Toledo: Qualidade ambiental e perspectivas futuras. Edunioeste. Cascavel. Cap. IV. 67-78.

TERRA, B. F; ARAÚJO, F. G; CALZA, C. F; LOPES, R. T; TEIXEI, T. P. 2008. **Heavy Metal in Tissues of Three Fish Species from Different Trophic Levels in a Tropical Brazilian River**. Water Air Soil Pollution v. 187. 275–284.

TOLEDO, Prefeitura Municipal de Toledo-PR. 2017. **Plano Municipal De Recursos Hídricos De Toledo**. Órgão oficial eletrônico do município, Edição nº 1.863, de 19/10/2017. Disponível em: <https://www.toledo.pr.gov.br/sites/default/files/plano_municipal_de_recursos_hidricos_aprovado_1.pdf> Acesso dia 05 de outubro de 2020.

TOLEDO, Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Toledo-PR. 2010. **Malha Hidrográfica**. Disponível em: <<https://www.toledo.pr.gov.br/portal/meio-ambiente/malha-hidrografica>> Acesso dia 01 julho de 2019.

TORRE, F. R.; FERRARI, L.; SALIBIA'N, A. 2005. **Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina**. Chemosphere, v. 59. 577-583.

WINTER, R.; BRAUN, M. S.; LIMA, J. F. 2005. **Notas sobre o impacto da produção de suínos na bacia do rio Toledo – Paraná.** Toledo, UNIOESTE. Conselho Editorial da Informe Gepec. 13.

NARDI MACHADO, MAURÍCIO

UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS EM *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) EM UM RIO URBANIZADO / MAURÍCIO NARDI MACHADO; orientador PAULO VANDERLEI SANCHES; coorientadora THAÍS SOUTO BIGNOTTO. -- Toledo, 2021.

35 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, 2021.

1. PEIXE. 2. ERYTHROCYTE NUCLEAR ABNORMALITIES. 3. ENZIMAS. 4. POLUIÇÃO. I. VANDERLEI SANCHES, PAULO, orient. II. SOUTO BIGNOTTO, THAÍS, coorient. III. Título.