



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA-PPGEAP  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA PESQUEIRA E MANEJO DE RECURSOS AQUÁTICOS  
GRUPO DE ECOLOGIA AQUÁTICA  
GRUPO DE BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO AQUÁTICA NA AMAZÔNIA

## **TESE DE DOUTORADO**

**Efeitos da poluição aquática e do ectoparasitismo sobre distintos órgãos de peixes de água doce: uma abordagem em baixo nível de organização biológica**

**SARITA NUNES LOUREIRO**

Orientador: Prof. Dr. Tommaso Giarrizzo- UFPA

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lílian Lund Amado- UFPA

Belém - Pará

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA-PPGEAP  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA PESQUEIRA E MANEJO DE RECURSOS AQUÁTICOS  
GRUPO DE ECOLOGIA AQUÁTICA  
GRUPO DE BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO AQUÁTICA NA AMAZÔNIA

**SARITA NUNES LOUREIRO**

**Efeitos da poluição aquática e do ectoparasitismo sobre distintos órgãos de peixes de água doce: uma abordagem em baixo nível de organização biológica**

Tese de doutorado apresentado à comissão do Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará como quesito para a obtenção do título de Doutora em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Tommaso Giarrizzo- UFPA

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lílian Lund Amado- UFPA

Belém - Pará

2017

**SARITA NUNES LOUREIRO**

**Efeitos da poluição aquática e do ectoparasitismo sobre distintos órgãos de peixes de água doce: uma abordagem em baixo nível de organização biológica**

Tese de doutorado apresentado à comissão do Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará como quesito para a obtenção do título de Doutora em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Tommaso Giarrizzo- UFPA PPGEAP

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lílian Lund Amado- UFPA

Instituto de Ciências Biológicas – ICB – UFPA

Banca examinadora:

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andréa Pontes Viana**

Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Aquáticos Amazônicos (UFOPA, Santarém)

**Prof. Dr<sup>ª</sup>. Lygia Segal Nogueira**

Universidade Federal do Pará (UFPA, Belém)

**Prof. Dr<sup>ª</sup>. Michele Velasco Oliveira da Silva**

Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA, Tomé-Açu)

**Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Lima**

Instituto Evandro Chagas

Suplentes:

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Bianca Bentes da Silva**

Universidade Federal do Pará (IECOS/UFPA, Bragança)

**Prof. Dr. Marcelo Costa Andrade**

Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da UFPA

Belém - Pará

2017

## APOIO FINANCEIRO E LOGÍSTICO



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)

---

- L892e Loureiro, Sarita Nunes Loureiro  
Efeitos da poluição aquática e do ectoparasitismo sobre distintos órgãos de peixes de  
água doce: uma abordagem em baixo nível de organização biológica / Sarita Nunes  
Loureiro Loureiro. - 2017.  
108 f. : il. color.
- Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca  
(PPGEAP), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Tommaso  
Giarrizzo Giarrizzo Coorientação:  
Profa. Dra. Lílian Lund Amado.
1. Ecologia aquática. 2. Peixe de água doce. 3. Biodiversidade. 4. Bioquímica.  
5. Amazônia. I. Giarrizzo, Tommaso Giarrizzo, *orient.* II. Título
-

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Mário de Melo Loureiro e Merita Nunes Loureiro  
Pelo carinho, amor e apoio de sempre...*

## AGRADECIMENTOS

Durante toda a minha vida acadêmica aprendi que não se faz pesquisa sozinho, sempre precisaremos de pessoas que nos ajudem, que nos estendem a mão, que compreenda que somos seres humanos e que temos dificuldades e limitações.

Então, durante o doutorado não foi diferente, “arregacei as mangas” para atingir o objetivo, e quero deixar claro aqui que sozinha não conseguiria, vários são os fatores e pessoas que me fizeram chegar até aqui. Nessa fase, foram muitas pessoas que cruzaram o meu caminho e que contribuíram para a realização desse sonho. Não posso deixar de agradecer a todos que de alguma forma me apoiaram e motivaram desde a graduação...

Agradeço a **Deus** por toda proteção nas idas e vindas para a universidade e nas coletas de campo, nada me aconteceu e isso é prova de sua proteção e iluminação, sou grata por toda ajuda espiritual nos momentos difíceis, pelo equilíbrio para suportar todas as dificuldades e por ter colocado pessoas fundamentais em meu caminho para a realização desse sonho.

Agradeço imensamente às pessoas que são o sentido de minha vida e que contribuíram positivamente para que eu pudesse chegar até aqui: aos meus queridos pais, **Merita Loureiro** e **Mário Loureiro**, por todo o amor, cuidado, carinho, ensinamentos, conselhos e apoio que sempre recebi em todos os momentos de minha vida, esse sonho é fruto dos bons ensinamentos que vocês me transmitiram. À minha querida irmã **Melissa Loureiro** pelo apoio, amizade e carinho; ao meu querido sobrinho **Pedro Aikau** por todo o carinho, beijos e abraços, pelos conselhos de “gente adulta” sempre dizendo que eu ia conseguir; ao meu companheiro, amigo e esposo **Israel Alves** pelo carinho enorme, conforto, por me apoiar em todas as minhas escolhas e decisões, pela amizade, por ter ido sempre me buscar ao lab e ter me esperado até tarde da noite, até as últimas leituras das placas e principalmente pela imensa paciência durante os vários momentos que passei de estresse. Amo todos vocês!!!

Agradeço a todos os meus parentes que torceram e torcem por mim, em especial à minha avó **Jandira Nunes**, meu avô **Marcelino Nunes** (in memoriam), minhas tias **Silvana Ferreira** e **Márcia Nunes** aos

primos **Patricia Nunes, Adriano Nunes, Marcela Videira** pelo carinho.

À professora **Flávia Lucena Frédou**, pelos ensinamentos e orientação na graduação e por ter sido fonte de inspiração para que eu continuasse a trilhar no caminho acadêmico;

Ao meu orientador **Tommaso Giarrizzo**, por todos os ensinamentos desde o mestrado, pela amizade, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, o Grupo de Ecologia Aquática (GEA), por ter aceitado a me orientar no doutorado, pelo apoio financeiro e logístico para que eu fizesse minhas coletas, pela ajuda com as dúvidas, pelas críticas construtivas que com certeza me fizeram crescer como pessoa e principalmente como pesquisadora.

À minha co-orientadora **Lílian Lund Amado**, que conheci no início do nascimento de minha ideia para o doutorado, agradeço por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, o Grupo de Biomarcadores de Poluição Aquática na Amazônia (BioPaq), por ter aceitado em me co-orientar, por todos os reagentes, placas, equipamentos e espaço disponibilizados para o desenvolvimento deste trabalho, pelos ensinamentos do passo a passo das análises do lab e do universo da Ecotoxicologia, por ter me permitido errar e compreender que fazia parte do processo de amadurecimento, pela disponibilidade, paciência, orientação, amizade construída ao longo desses últimos anos, apoio e conselhos que ficarão marcados em minha vida acadêmica;

A todos os amigos do **BioPAq**, em especial ao **Leonildo Dergan** e à **Danielle Ribeiro** pela paciência e ajuda nas primeiras padronizações de LPO de piranha e Curimatá, à minha amiga **Carla Carolina** minha eterna gratidão pela amizade sincera, apoio e conforto nos momentos difíceis, pela ajuda nas padronizações de LPO, ACAP e GST de curimatá e piranha, pela ajuda nos ensinamentos dos cálculos, pelo tempo disponível para ver alguns resultados e discuti comigo o seu ponto de vista e valiosas sugestões; ao **Felipe** por todas as sugestões, apoio e por me ajudar sempre que eu precisava quando o meu computador bugava; à minha amiga **Irina Sofia** pela amizade, pela preocupação com minha saúde e por me brigar e me “lembrar” para eu almoçar e beber água em todos os dias de trabalho no lab, pela ajuda principalmente nas análises laboratoriais e por me

acompanhar até tarde da noite nas leituras das placas, ao **Cainã**, **Luciana**, **Lorena**, **Rui** e **Sildiane** por ter me acompanhado e me ajudado muito nas últimas dosagens. Muito obrigada a todos! Vocês não têm ideia do quanto foram peças fundamentais na construção da minha vida acadêmica e como pessoa, muito obrigada!

A todos os amigos do **GEA** e principalmente ao **Rory** e **Fabiola** por terem dedicado um tempinho em sua agenda para revisar meu texto da tese; ao **Allan** pelas críticas construtivas, pelo apoio desde o mestrado, por tirar dúvidas e pela elaboração do mapa; ao **Marcelo** pelas ajudas por email e pessoalmente nas dúvidas sobre alimentação dos peixes; à **Priscila** pela amizade, apoio e pelas palavras de ajuda e conforto.

Aos pescadores **Nilson Loureiro** e **Neto Loureiro**, meus “primos”, pela amizade, por me ensinaram muito sobre o trabalho em campo, por me acompanharem e me ajudarem nas coletas dos peixes.

Aos colegas que me ajudaram no campo no Xingu ou no lab: **Nayara**, **Thayara**, **Oliver**, **Luis**, **Patricia**, **Silvia**, **Pedro**, **Rafael**, **Mara**, muito obrigada mesmo por toda ajuda e dedicação sem vocês seria muito mais difícil.

Ao guarda-florestal **Dezivaldo Ribeiro**, minha imensa gratidão por me acompanhar durante toda a coleta no rio Itacaiunas, pela ajuda no campo, pelos deliciosos almoços e valiosos ensinamentos sobre o ambiente aquático e floresta Amazônica.

Ao amigo **Augusto Junior** (muito obrigada por todos os conselhos desde a graduação, principalmente aqueles que eram para que eu fugisse da ansiedade, estresse, obrigada por sempre revisar o inglês de meus resumos e pela disposição em me ajudar quando eu mais precisei) e aos amigos que durante o doutorado sempre me deram palavras de apoio, de incentivo e estenderam a mão oferecendo ajuda quando eu mais precisei: **Samara Pinheiro**, **Pio Girard**, **Celly Cunha**, **Danielle Cavalcante** e **Miani**.

A todos os professores membros do Programa de pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca (UFPA) em especial às professoras: **Jussara Martinelli** pela atenção e por responder sempre as minhas dúvidas durante o período do doutorado; **Rossineide Rocha** por sempre me receber com um

sorriso, pelas valiosas dicas e sugestões durante a disciplina de biomarcadores, por ter dedicado algumas horas de seu tempo para me explicar ferramentas novas de busca de artigos no site da CAPES; **Virág Venekey** por ter aceitado que eu ministrasse as aulas referente ao estágio docência em sua disciplina no curso de licenciatura em biologia e por ter dedicado algumas horas para me orientar em como preparar e ministrar aulas;

Agradeço à banca examinadora da qualificação do plano de tese: **Edilson Rodrigues Matos, Raimundo Nonato Moraes Benigno e Rossineide Martins da Rocha**, pelas valiosas sugestões e críticas para este trabalho.

Aos professores **Andréa Pontes Viana, Lygia sega nogueira, Michele Velasco, Marcelo de Oliveira Lima, Bianca Bentes da Silva e Marcelo Costa Andrade** por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese.

A FAPESPA e CAPES pelas bolsas de doutorado durante parte do período do curso;

Ao ICMBIO, pela licença para a realização da pesquisa concedida nas áreas de estudo;

À Norte Energia pelo apoio logístico de campo.

## RESUMO

A grande maioria dos rios amazônicos encontram-se em estado de alteração ambiental, pois são fortemente influenciados por atividades antrópicas relacionadas à construção de usinas hidrelétricas, desmatamento e mineração que levam à perda de habitat, eutrofização, acúmulo de metais, altos índices de doenças parasitárias dentre outras consequências. Nesse contexto, o presente trabalho fez uma abordagem com peixes de diferentes níveis tróficos e com um número maior de tecidos (cérebro, brânquias, fígado e músculo) objetivando investigar se os padrões de resposta dos biomarcadores de exposição e efeito dos peixes expressam tendências semelhantes em um rio com menor histórico de poluição (Xingu) e em um rio com maior histórico de poluição (Itacaiunas) sem a influência do parasitismo, visando proporcionar uma visão mais integrada e complementar da saúde dos organismos. Adicionalmente, foi verificado se existe algum efeito do ectoparasitismo por Isopoda *Vanamea* sp. sobre a saúde de *Serrasalmus rhombeus*, utilizando como biomarcadores respostas em baixos níveis de organização biológica (molecular). Para o presente estudo as amostragens de peixes das espécies *S. rhombeus* (piranha preta) e *Prochilodus nigricans* (curimatá) foram realizadas durante o período seco no rio Xingu e no rio Itacaiunas. Os peixes foram capturados com anzol (piranha preta) e tarrafa (curimatá), sendo capturados 20 espécimes de *S. rhombeus* no rio Xingu e 29 no rio Itacaiunas e 40 espécimes de *P. nigricans* em cada um dos rios totalizando em 129 amostras no final do estudo. Em campo os peixes capturados foram pesados (com precisão de 0,01g) e medidos (com precisão de 0,1 cm). Posteriormente, as brânquias e superfície externa do corpo de cada peixe foram examinadas para verificação da presença de ectoparasitas crustáceos. A seguir, músculo, fígado, brânquias e cérebro foram retirados e inseridos em tubos criogênicos e levados ao laboratório em um recipiente contendo nitrogênio líquido para análise de biomarcadores. A partir dos resultados obtidos estão sendo elaborados dois artigos científicos com títulos preliminares: (1) Respostas biomarcadoras de múltiplos tecidos em peixes de água doce com diferentes estratégias tróficas de dois rios amazônicos; (2) Peixes parasitados de um rio poluído estão mais suscetíveis ao estresse oxidativo? Uma abordagem em vários tecidos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biomarcadores bioquímicos, Ectoparasitismo, *Serrasalmus rhombeus*, *Prochilodus nigricans*

## ABSTRACT

The vast majority of Amazonian rivers are in a state of environmental change, they are strongly influenced by anthropic activities related to the construction of hydroelectric plants, deforestation and mining that lead to habitat loss, eutrophication, accumulation of heavy metals, high rates of diseases among other consequences. In this context, the present work has dealt with fish of different trophic levels and with a greater number of tissues (brain, gills, liver and muscle), aiming to investigate whether the response patterns of the biomarkers of exposure and effect of fishes express similar tendencies in a river with a lower history of pollution (Xingu) and in a river with a greater history of pollution (Itacaiunas) without the influence of parasitism, aiming to provide a more integrated and complementary view of the health of the organisms. In addition, it was verified if there is any effect of the ectoparasitism by Isopoda *Vanamea* sp. on the health of *Serrasalmus rhombeus*, using as biomarkers responses at low levels of biological (molecular) organization. For the present study fish samplings of the species *S. rhombeus* and *Prochilodus nigricans* (curimatá) were performed during the dry period on the Xingu river and the Itacaiunas river. Fish samples were captured with a fish hook (black piranha) and casting net (curimatá), being captured 20 specimens of *S. rhombeus* in the Xingu river and 21 in the Itacaiunas river and 40 specimens of *P. nigricans* in each of the rivers, totaling 121 samples at the end of the study. In the field the captured fish were weighed (with precision of 0,01g) and measured (with precision of 0,1 cm). Subsequently, the gills and outer surface of the body of each fish were examined for the presence of crustacean ectoparasites. Next, muscle, liver, gills and brain were removed and inserted into cryogenic tubes and taken to the laboratory in a container containing liquid nitrogen for analysis of biomarkers. From the results obtained two scientific articles with preliminary titles are being elaborated: (1) Biomarker responses of multiple tissues in freshwater fishes with different trophic strategies of two Amazonian rivers; (2) Are parasitized fish from a polluted river more susceptible to oxidative stress? A multi-tissue approach.

**KEYWORDS:** Biochemical biomarkers, Ectoparasitism, *Serrasalmus rhombeus*, *Prochilodus nigricans*

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1: Ectoparasita da ordem Isopoda nas brânquias de um exemplar da espécie de peixe *Serrasalmus rhombeus* capturado no rio Itacaiunas. (Fonte: Autor) ..... 23
- Figura 2: Exemplar da espécie de peixe *Serrasalmus rhombeus*. (Foto: Marcelo Andrade, 2012). ..... 24
- Figura 3: Exemplar da espécie de peixe *Prochilodus nigricans*. (Fonte: Marcelo Andrade, 2012). ..... 25
- Figura 4: Mapa da área de estudo indicando os dois rios estudados no trabalho, sendo que o ponto em vermelho está indicando o rio Itacaiunas e em amarelo indica o rio Xingu. .... 28
- Figura 5: Ilustração do desenho amostral para a realização do presente trabalho..... 29
- Figura 6: Metodologias utilizadas durante as análises de parâmetros abióticos (A), e durante as coletas de *Serrasalmus rhombeus* (anzol, B e C) e *Prochilodus nigricans* (tarrafa, D, F e G) no rio Itacaiunas e rio Xingu no período seco. .... 30

### Capítulo 2

- Fig. 1.** Mapa da área de estudo que indica os dois rios estudados no presente estudo, com o ponto vermelho indicando o rio Itacaiunas e amarelo, indicando o rio Xingu.... 66
- Fig. 2.** Análise de coordenadas principais (PCO) (a) e PCO em centroides (b) de respostas biomarcadoras de cérebro (vermelho), fígado (laranja), brânquia (azul) e músculo (verde) para *Serrasalmus rhombeus* (triângulo) e *Prochilodus nigricans* (círculo) de Itacaiunas (forma fechada) e Xingu (forma aberta) na estação seca..... 66
- Fig. 3.** Análise de coordenadas principais (PCO) de respostas de biomarcadores de cérebro (vermelho), fígado (laranja), brânquia (azul) e músculo (verde) para *Serrasalmus rhombeus* (triângulo) (a, b, c e d) e *Prochilodus nigricans* (círculo) (e, f, g e h) de Itacaiunas (forma fechada) e Xingu (forma aberta) na estação seca. .... 66
- Fig. 4.** Respostas de biomarcadores em cada órgão alvo (cérebro, fígado, brânquia e músculo) de *S. rhombeus* (a, b e c) e *P. nigricans* (d, f e g) coletados em período seco no rio Itacaiunas e Xingu (histogramas preto e branco, respectivamente). Histograma com média e erro padrão de respostas de biomarcadores: atividades de glutathione S-transferase (GST), capacidade contra radicais de peróxido (ACAP) e peroxidação lipídica (LPO). O número em cima do histograma significa o número analisado de cada biomarcador por amostra. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os rios, a ausência indica que não foram observadas diferenças significativas. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes nos testes post hoc, entre os vários órgãos testados para cada rio..... 66

### Capítulo 3

**Fig. 1.** Respostas de biomarcadores em cada órgão alvo (cérebro, fígado, brânquia e músculo) de *S. rhombeus* parasitados e não parasitados (histograma preto e branco, respectivamente) coletados em período seco no rio Itacaiunas. Histograma com média e erro padrão de respostas de biomarcadores: (a) atividade de glutathione S-transferase (GST), (b) Capacidade Antioxidante Total (ACAP) e (c) peroxidação lipídica (LPO). O número em cima do histograma significa o número analisado de cada biomarcador por amostra. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os peixes parasitados e não parasitados, a ausência indica que não foram observadas diferenças significativas. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os vários órgãos testados para cada condição. .... 103

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

TABELA I: Resumo dos testes de PERMANOVA de dois fatores para testar os efeitos dos fatores espécies (Sp, fixo, 2 níveis), rios (Ri, fixo, 2 níveis) e tecidos (Te, fixo, 4 níveis), do rio Itacaiunas e Xingu no seco estação. .... 71

TABELA II: Resumo do teste de PERMANOVA de dois fatores para avaliar o efeito do fator rio (Ri, fixo, 2 níveis) de *P. nigricans* e *S. rhombeus*, do rio Itacaiunas e Xingu na estação seca. .... 71

TABELA III: Resultados para a comparação da atividade de glutathione-S-transferase, Capacidade Antioxidante Total e peroxidação lipídica entre rios para cada órgão (cérebro, fígado, brânquias e músculo) de *S. rhombeus* e *P. nigricans*. As interações entre os rios foram baseadas em testes Pairwise, valor P com base em PERMANOVA (perm). Resultados significativos estão em negrito. .... 71

TABELA IV: Resultados para a comparação da atividade da glutathione-S-transferase, capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica entre cérebro, fígado, brânquias e músculos em *P. nigricans* e *S. rhombeus* para cada rio. As interações entre órgãos foram baseadas em testes Pairwise, valor P com base em PERMANOVA (perm). Resultados significativos estão em negrito. .... 71

### Capítulo 3

TABELA I: Resultados para a comparação da atividade da glutathione-S-transferase, capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica entre *S. rhombeus* parasitado ou não parasitado em um mesmo órgão (cérebro, fígado, brânquias e músculo). As interações entre peixes parasitados ou não parasitados foram baseadas nos testes Pairwise, valor P com base em PERMANOVA (perm). Resultados significativos estão em negrito. .... 105

TABELA II: Resultados para a comparação da atividade de glutathione-S-transferase, capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica entre diferentes órgãos (cérebro, fígado, brânquias e músculos) de *S. rhombeus* parasitado ou não parasitado. As interações entre órgãos foram baseadas em testes Pairwise, valor P com base em PERMANOVA (perm). Resultados significativos estão em negrito. .... 105

## SUMÁRIO

<b>APOIO FINANCEIRO E LOGÍSTICO</b> .....	iv
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xv
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	18
<b>Capítulo Integrador</b> .....	18
<b>1.1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	19
1.1.1. PARASITAS DE PEIXES.....	22
1.1.2. AS ESPÉCIES-ALVO DE ESTUDO.....	23
1.1.2.1. <i>Serrasalmus rhombeus</i> .....	23
1.1.2.2 <i>Prochilodus nigricans</i> .....	24
<b>1.2. ESTRUTURA DA TESE</b> .....	26
<b>1.3. OBJETIVOS</b> .....	26
1.3.1 GERAL.....	26
1.3.2 ESPECÍFICOS.....	26
<b>1.4. METODOLOGIA GERAL</b> .....	27
1.4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	27
1.4.2. DESENHO AMOSTRAL E COLETA DE PEIXES.....	29
1.4.3. COLETA DE PARASITOS.....	30
1.4.4. MEDIÇÕES DE BIOMARCADORES.....	31
1.4.4.1. biomarcadores de exposição.....	31
1.4.4.2. Biomarcador de efeito Lipoperoxidação (LPO) - Ensaio FOX modificado.....	32
<b>1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	40
<b>Multi-tissues biomarker responses in freshwater fish with different trophic strategies from two Amazon rivers</b> .....	40
Resumo.....	41
Introdução.....	42

Material e métodos.....	44
Resultados .....	49
Discussão .....	52
Conclusão.....	58
Agradecimentos .....	58
Referências.....	58
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>79</b>
<b>Peixes parasitados de um rio poluído estão mais suscetíveis ao estresse oxidativo? Uma abordagem em vários tecidos</b> .....	<b>79</b>
Resumo .....	80
Introdução .....	81
Material e métodos.....	83
Resultados .....	88
Discussão .....	89
Conclusão.....	95
Agradecimentos .....	95
Referências.....	95

**CAPÍTULO 1**

---

**Capítulo Integrador**

**Sarita Nunes Loureiro**

## 1.1. INTRODUÇÃO GERAL

A poluição aquática ainda é um problema frequente em ambientes de água doce e marinho. Os organismos aquáticos sofrem exposição de uma grande quantidade de fatores estressantes (*i.e.* gerados por contaminantes industriais, atividades urbanas e rurais, eutrofização e queimadas de florestas, metais) e conseqüentemente alguns químicos ambientais, como metais e metaloides (Hg, Cd, Cr, Cu, Zn, Pb, Cu, Ni, As), elementos organometálicos (MeHg) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) podem ser inseridos nos ecossistemas aquáticos (ALBERTS, 1995; LAFFERTY, 1997; DÓREA *et al.*, 2004; VIDAL-MARTÍNEZ- *et al.*, 2010; BRÁZOVÁ *et al.*, 2012; GOERTZEN *et al.*, 2012). ..

Os químicos ambientais biodisponíveis podem ser facilmente absorvidos atingindo órgãos alvo (Bainy, 1996; Fonseca *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2017). Ao entrarem em contato com os organismos os xenobióticos sofrem processos de biotransformação e provocam mudanças no equilíbrio redox proporcionando o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no interior das células que, dependendo da concentração e tempo de exposição, leva à efeitos negativos para a saúde da biota de diversos ecossistemas aquáticos (Bainy, 1996; Dórea *et al.*, 2004; Newman, 2015; Halliwell e Gutteridge, 2015; Souza-Araujo *et al.*, 2016).

Os efeitos adversos primários observados nos organismos sempre iniciam em menores níveis de organização celular, sendo verificado efeitos em nível bioquímico (e.g. efeito citotóxico, teratogênico, mutagênico, carcinogênico, oxidação de proteínas, peroxidação de lipídios), posteriormente os efeitos podem ser verificados em maiores níveis de organização celular como, por exemplo, danos histológicos, influências negativas nas taxas de crescimento, na reprodução, na fisiologia e no comportamento de peixes (WHO, 1990; van der Oost *et al.*, 2003; AMADO *et al.*, 2006; MARCOGLIESE *et al.*, 2005; VIDAL-MARTÍNEZ- *et al.*, 2010; OUELLET *et al.*, 2013).

Em adição aos exemplos de poluentes supracitados, as doenças parasitárias nos organismos aquáticos funcionam como estressantes naturais que afetam também a homeostase fisiológica de seus hospedeiros (SURES, 2004; MARCOGLIESE e PIETROCK, 2011). Dessa forma, algumas pesquisas têm também centralizado suas atenções sobre o parasitismo, com o objetivo de buscar indicadores de impacto humano no ambiente (OVERSTREET, 1997; SURES *et al.*, 1999; 2004). Estudos em peixes de

populações naturais têm observado que o parasitismo pode influenciar na biologia reprodutiva e alimentar, crescimento, estrutura e distribuição de algumas espécies de peixes comercialmente e ecologicamente importantes (ALOO *et al.*, 2004; BARBER *et al.*, 2000; FONTANA *et al.*, 2012). Além disso, a infecção parasitária afeta a eficiência respiratória, podendo a infestação causar a morte imediata dos seus hospedeiros ou pode funcionar como vetores para outros tipos de doenças causadas por bactérias ou fungos (PAVANELLI *et al.*, 2008; PRINTRAKOON e PURIVIROJKUL, 2011).

O efeito combinado de parasitas e poluentes na saúde de peixes está cada vez mais se tornando alvo de pesquisas no mundo (BILLIARD e KHAN, 2003; MARCOGLIESE e PIETROCK, 2011; LUKIN *et al.*, 2011). Alguns trabalhos mostram que o parasita pode exercer tanto um efeito positivo quanto negativo nos hospedeiros de ambientes poluídos (MARCOGLIESE *et al.*, 2005; RETIEF *et al.*, 2006). Estudos mostraram que alguns parasitas podem influenciar nos mecanismos fisiológicos (defesa celular ou regulação endócrina) dos hospedeiros infectados. A resposta imune dos hospedeiros pode ser alterada, sendo observadas mudanças nas atividades do sistema antioxidante, tais como, catalase, glutathione redutase, glutathione S-transferase ou a peroxidação de lipídios (DAUTREMEPUTS *et al.*, 2002; MARCOGLIESE *et al.*, 2005). Já, em outros trabalhos verificou-se um efeito benéfico do parasitismo para os peixes infectados, como no caso de parasitas acantocéfalos, Cestoda e Isopoda que foram reportados por acumular metais em elevados níveis em relação aos seus hospedeiros (SURES *et al.*, 2004; RETIEF *et al.*, 2006; LINS *et al.*, 2008).

Tanto a biodisponibilidade dos químicos ambientais quanto a ação natural do parasitismo podem provocar alterações no equilíbrio redox facilitando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como, por exemplo, os radicais ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), além de outros não radicais que também são derivados do  $O_2^{\bullet-}$  como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido hipocloroso (HOCl) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; GAUVIN *et al.*, 2016) no interior das células. As EROs são fortemente reativas e possuem uma grande instabilidade elétrica, onde na tentativa de se estabilizarem podem captar um elétron de um composto que esteja próximo, podendo ser uma molécula, uma célula ou um tecido do organismo provocando desta forma uma lesão celular (FRAGA *et al.*, 1996).

Todas as células dos organismos eucarióticos possuem mecanismos de defesa para prevenir e interceptar as EROs e reparar alvos oxidados, tais mecanismos incluem os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que atuarão de forma integrada para evitar que ocorram danos oxidativos nas biomoléculas (BAINY, 1996; FRAGA *et al.*, 1996; NEWMAN, 2014; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

A presença de xenobióticos nos ambientes aquáticos e a biodisponibilidade deles podem induzir modificações nas respostas biológicas, que vão desde mudanças em componentes bioquímicos ou celulares até comportamentais e tais modificações são usados como biomarcadores (DEPLEDGE *et al.*, 1995). Os biomarcadores podem ser classificados como biomarcador de exposição e biomarcador de efeito. Sendo que o biomarcador de exposição pode ser classificado como qualquer substâncias exógenas, seu metabólito, ou pode ser o produto da interação entre xenobióticos e uma molécula ou célula que é medido em um organismo ou subunidade deste, nesse tipo de biomarcador é verificado a tentativa de detoxificação do organismo. Já em relação ao biomarcador de efeito pode ser considerado qualquer alteração bioquímica, fisiológica ou comportamental que podem afetar o bem-estar do organismo (van der Oost *et al.*, 2003).

No contexto de poluição ambiental encontram-se alguns rios amazônicos, pois são fortemente reportados por sofrerem elevadas influencias antrópicas relacionadas à queimadas de florestas, construção de usinas hidrelétricas, perda de habitat, eutrofização, mineração dentre outros (JUNK e MELLO, 1990; LACERDA *et al.*, 1994; WILCKE *et al.*, 2000; FEARNSSIDE, 2001; ANDRADE *et al.*, dados não publicados, 2013; SOUZA-FILHO *et al.*, 2015; MONTES *et al.*, dados não publicados, 2016; SOUZA-ARAÚJO *et al.*, 2016; WINEMILLER *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2017).

A grande maioria das pesquisas realizadas em rios amazônicos que verificaram a influência de impactos ambientais sobre a ictiofauna tem focado a nível populacional ou nas assembleias de peixes (e.g., LACERDA *et al.*, 1994; PORVARI, 1995; SANTOS *et al.*, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2017). Um estudo observou efeitos genotóxicos através do teste de micronúcleo no sangue de peixes da espécie *Prochilodus nigricans*, *Mylossoma duriventris* e *Hoplias malabaricus* e associaram esses efeitos à poluição por mercúrio (PORTO *et al.*, 2005). Alguns trabalhos avaliaram

os níveis de mercúrio e a influência desse metal na bioacumulação e/ou biomagnificação em tecidos musculares de peixes (DÓREA, *et al.*, 2003; KASPER *et al.*, 2012; KASPER *et al.*, 2014; SOUZA-ARAUJO *et al.*, 2016), outros trabalhos verificaram impactos diretos e indiretos de construções de barragens, observando que esse tipo de empreendimento realizados em alguns rios amazônicos modificaram os recursos alimentares disponíveis para os peixes, além de exercerem influência na abundância, biomassa e na interrupção de rotas de migração de algumas espécies de peixes (JUNK e MELLO, 1990; BARTHEM *et al.*, 1991; MERÓNA *et al.*, 2000).

Já em relação ao parasitismo de peixes em ambientes aquáticos amazônicos, a maioria das pesquisas deram ênfase apenas em relação ao parasitismo em algumas espécies de peixes e grande parte da literatura destacaram a taxonomia do parasita, os índices parasitários ou verificaram as relações entre parasitas e hospedeiros (THATCHER, 1993; MALTA E VARELLA, 1996; ACÁCIO *et al.*, 2012).

#### 1.1.1. PARASITAS DE PEIXES

Existe uma grande diversidade de parasitos de peixes, que podem ser distribuídos nos seguintes grupos zoológicos: Protozoa com 1.750 espécies, Monogenea com 1.500 espécies, Digenea com 1.700 espécies, Cestoda 1.000 espécies, Nematoda com 700 espécies, Acanthocephala com 400 espécies e Crustácea com 2.590 espécies (THATCHER, 2006).

Os crustáceos ectoparasitas recebem uma forte atenção, pois são de fácil visualização e apresentam uma ampla variação na forma e tamanho. Os principais grupos de crustáceos ectoparasitos de peixes são os Copepodas, Branchiuras e Isopodas. Esses parasitas podem ser encontrados na superfície do corpo, narinas, opérculo, tegumento, câmaras branquiais (Figura 1) ou na cavidade bucal dos peixes (MALTA e VARELLA, 1996; THATCHER, 2006).



**Figura 1:** Ectoparasita da ordem Isopoda nas brânquias de um exemplar da espécie de peixe *Serrasalmus rhombeus* capturado no rio Itacaiunas. (Fonte: Autor)

### 1.1.2. AS ESPÉCIES-ALVO DE ESTUDO

Para a realização deste trabalho foram analisadas duas espécies que apresentam uma ampla distribuição geográfica e com diferentes posições na cadeia trófica, sendo a *Serrasalmus rhombeus* (carnívora) e *Prochilodus nigricans* (detritívora), visto que os rios escolhidos apresentam grandes distâncias e a forma como os organismos acumulam e metabolizam os contaminantes são diferentes.

#### 1.1.2.1. *Serrasalmus rhombeus*

A espécie *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1766) (Figura 2) pertence à ordem Characiformes e família Serrasalminidae. Os peixes dessa espécie, conhecidos popularmente como piranha preta, destacam-se pela sua voracidade, sendo carnívoros e estando entre os principais predadores de ecossistema de água doce neotropical (DÓREA *et al.*, 2004; MOL, 2006). Esses peixes são de grande porte (comprimento máximo de até 41,5 cm) possuem ampla distribuição geográfica em várzeas amazônicas, apresentam hábitos diurnos, reprodução do tipo parcelada e fecundação externa, e podem servir como fonte de alimento para a comunidade ribeirinha amazônica (FREITAS *et al.*, 2009).

Importantes estudos sobre crustáceos (4 espécies) e Monogenoidea (21 espécies) ectoparasitas infectando *S. rhombeus* em ecossistemas amazônicos já foram realizados (THATCHER, 1993; MALTA E VARELLA, 1996; THATCHER, 2006; ACÁCIO *et*

*al.*, 2012). Em grande parte desses estudos foi fornecido um destaque maior em relação à taxonomia do parasita (THATCHER, 1993; 2006 MALTA E VARELLA, 1996). E um trabalho tem fornecido informação em relação à interação ecológica entre crustáceos ectoparasitas e seus hospedeiros da espécie *S. rhombeus* (ACÁCIO *et al.*, 2012).



**Figura 2:** Exemplar da espécie de peixe *Serrasalmus rhombeus*. (Foto: Marcelo Andrade, 2012).

#### **1.1.2.2 *Prochilodus nigricans***

O peixe curimatá *Prochilodus nigricans* (Spix & Agassiz, 1829) (Figura 3) pertence à ordem Characiformes e família Prochilodontidae. Esta espécie pode alcançar um comprimento total máximo de 37 cm e apresenta uma ampla distribuição geográfica em toda a bacia Amazônica (CASTRO e VARI, 2003). O Peixe *P. nigricans* apresentam o corpo no formato fusiforme, são hidrodinâmicos e tem uma coloração de cinza azulada no dorso e com cor mais clara e prateada no ventre (CASTRO e VARI, 2003). O formato da boca é do tipo terminal com os lábios em forma de ventosa com a presença de numerosos dentes córneos usados para raspar o perifiton. Esses peixes costumam formar grandes cardumes e realizam longas migrações reprodutivas e tróficas, além disso, apresentam um rápido crescimento, uma elevada fecundidade, com desova ocorrendo durante a enchente em rios de água branca ou clara e os jovens crescem nos ambientes de várzea (SANTOS *et al.*, 1984). Adicionalmente, apresentam uma elevada importância na pesca comercial, sendo considerada uma das espécies de maior importância nos principais portos da Amazônia, além de funcionar como fonte de alimento para a comunidade ribeirinha amazônica (SANTOS *et al.*, 1984; BARTHEM e FABRÉ, 2004).



**Figura 3:** Exemplar da espécie de peixe *Prochilodus nigricans*. (Fonte: Marcelo Andrade, 2012).

## 1.2. ESTRUTURA DA TESE

A tese apresenta uma estrutura de três capítulos, sendo um compilativo e dois integrativos com o objetivo de elaborar dois artigos que serão submetidos à revista internacionais com enfoques ecológico e ecotoxicológico.

O artigo 1 tem como título: Multi-tissues biomarker responses in freshwater fish with different trophic strategies from two Amazon rivers

O artigo 2 tem como título: Peixes parasitados de um rio poluído estão mais suscetíveis ao estresse oxidativo? Uma abordagem em vários tecidos

## 1.3. OBJETIVOS

### 1.3.1 GERAL

Avaliar as respostas de biomarcadores bioquímicos em diferentes tecidos de peixes *Serrasalmus rhombeus* e *Prochilodus nigricans* no período seco em rios com diferentes níveis de poluição.

### 1.3.2 ESPECÍFICOS

Capítulo I: Multi-tissues biomarker responses in two fish with different trophic strategies from two Amazon rivers

1. Verificar o efeito da poluição aquática nas brânquias, cérebro, fígado e músculo de *Serrasalmus rhombeus* e *Prochilodus nigricans* em nível de biomarcadores bioquímicos, comparando as duas espécies e o rio Xingu (menor histórico de poluição) e o rio Itacaiunas (maior histórico de poluição) sem a influência de parasitas;

Capítulo II: Respostas de biomarcadores bioquímicos em tecidos de *Serrasalmus rhombeus* parasitados por *Vanamea* sp. (Isopoda)

1. Verificar a ocorrência de Isopoda ectoparasita nas brânquias e superfície do corpo das espécies *Serrasalmus rhombeus* e determinar os índices parasitários, tais como intensidade média, abundância média e prevalência nas brânquias dessa espécie coletados no rio Itacaiunas;

2. Verificar o efeito do ectoparasitismo nas brânquias, cérebro, fígado e músculo em nível de biomarcadores bioquímicos, comparando peixes parasitados e não-parasitados no rio Itacaiunas, verificando se os animais parasitados estão mais ou menos suscetíveis ao estresse oxidativo;

## **1.4. METODOLOGIA GERAL**

### **1.4.1 ÁREA DE ESTUDO**

O presente estudo foi realizado em um local totalmente ou parcialmente influenciado por atividades antrópicas (Rio Itacaiunas) e um local com menor histórico de poluição (Rio Xingu) (Figura 4). Os rios Xingu e Itacaiunas constituem típicos ecossistemas de águas claras da Bacia Amazônica. Esses ambientes de águas claras caracterizam-se por apresentar águas transparentes com baixos compostos orgânicos, que fluem por uma camada rochosa e possuem baixas cargas de sedimento (Sioli, 1984).

A bacia hidrográfica do rio Itacaiunas está localizada no sudeste da região amazônica, perto da Serra de Carajás uma das maiores províncias de mineração do mundo, explorando minérios de ferro, cobre, manganês, ouro e outros (LACERDA *et al.*, 1994; KLEIN & LADEIRA, 2002; GALARZA *et al.*, 2008; ROCHA & RIBEIRO, 2010), apresentando um depósito significativo de cobre e ouro (LACERDA *et al.*, 1994). O rio Itacaiunas é um rio de águas claras, que recebe efluentes de mineração de ouro, além de altas taxas de desmatamento que contribui com a formação de novas paisagens dominadas por pastagens (SOUZA-FILHO *et al.*, 2015). Existe uma forte exploração de minério de cobre pela VALE em Carajás, que iniciou na mina do Sossego, localizada a 70 km de Carajás, apresentando uma capacidade instalada de produção de 540.000t anuais de concentrado, com 30% de cobre e 8 g/t de ouro (BERGERMAN, *et al.*, 2009). Embora as principais atividades de mineração sejam realizadas pela indústria (Companhia Vale do Rio Doce) a presença de ouro nos sedimentos dos rios atraiu garimpeiros para a região que usam a amalgamação de Hg como o processo de recuperação do ouro (LACERDA *et al.*, 1994). Durante o processo de amalgamação o Hg metálico é perdido para a atmosfera, solos e sedimentos (LACERDA *et al.*, 1994). E através deste processo, quase 50 tons de Hg são perdidos para o meio ambiente no estado do Pará, sendo que 1.0 a 5.0 toneladas são dos rios Itacaiunas-Parauapebas

(LACERDA e SALOMONS, 1991). As coletas no rio Itacaiunas foram realizadas próximo à Serra dos Carajás, Casa PAE, ICMBio,  $5^{\circ}55'44,7''S$   $50^{\circ}43'2,6''W$  e no presente trabalho foi considerado o local com maior histórico de poluição em relação ao rio Xingu.

A bacia do rio Xingu está inserida no lado direito do rio Amazonas, que se origina no estado brasileiro de Mato Grosso e é descarregada para a Amazônia a jusante da cidade de Porto de Moz, no estado do Pará, cobrindo mais de 500.000 km<sup>2</sup> e abrangendo uma área de 24,5% do estado do Pará. Os seus principais afluentes são o rio Iriti, que tem origem a aproximadamente 100km ao sudoeste da cidade de Altamira, e o rio Bacajá e Bacajaí, na Volta Grande do Xingu, a Jusante de Altamira (Salomão *et al.*, 2007;). As coletas no rio Xingu foram realizadas próximo à ilha da fazenda,  $3^{\circ}33'56,3''S$   $51^{\circ}55'36,55''W$ . As coletas no rio Xingu foram realizadas em um momento em que ainda não havia ocorrido a construção da barragem e foram realizadas próximo à ilha da fazenda,  $3^{\circ}33'56,3''S$   $51^{\circ}55'36,55''W$ . No presente trabalho foi considerado o local com menor histórico de poluição, pois a ilha da Fazenda está localizada a jusante de Altamira e mais distante da cidade e do centro da pressão pesqueira (Roman, 2011, dados não publicados).



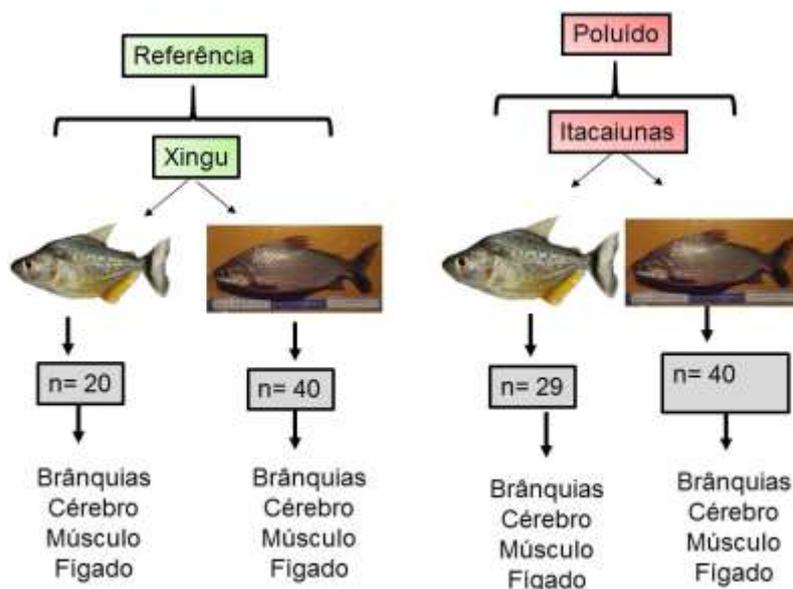
**Figura 4:** Mapa da área de estudo indicando os dois rios estudados no trabalho, sendo que o ponto em vermelho está indicando o rio Itacaiunas e em amarelo indica o rio Xingu.

#### 1.4.2. DESENHO AMOSTRAL E COLETA DE PEIXES

As amostragens foram realizadas durante períodos secos distintos, sendo que a coleta no rio Itacaiunas foi realizada no mês de dezembro de 2013, no rio Xingu foi realizada em julho de 2014.

Durante as amostragens foram medidas variáveis físico-química da água: pH, temperatura e oxigênio dissolvido utilizando uma sonda multiparamétrica HANNA®, modelo HI9828.

Foram capturados 20 espécimes de *S. rhombeus* no rio Xingu e 29 no rio Itacaiunas e 40 espécimes de *P. nigricans* em cada um dos rios totalizando 129 amostras (Figura 5). Nos dois rios, os peixes da espécie *S. rhombeus* foram coletados em ambientes de remanso e no canal principal do rio, já a espécie *P. nigricans* em ambientes de pedrais e corredeiras. Visando minimizar o efeito de estresse que pode ser provocado no momento da pescaria, as coletas foram padronizadas usando-se anzol para as capturas de *S. rhombeus* (Figura 6B, C) e tarrafa para *P. nigricans* (Figura 6D, F, G).



**Figura 5:** Ilustração do desenho amostral para a realização do presente trabalho.



**Figura 6:** Metodologias utilizadas durante as análises de parâmetros abióticos (A), e durante as coletas de *Serrasalmus rhombeus* (anzol, B e C) e *Prochilodus nigricans* (tarrafa, D, F e G) no rio Itacaiunas e rio Xingu no período seco.

Imediatamente após a captura, os peixes capturados foram pesados (com precisão de 0,01g) e medidos o comprimento total (com precisão de 0,1 cm). Posteriormente, cada peixe foi examinado para verificação da presença de ectoparasitas crustáceos na cavidade branquial, boca e no corpo dos hospedeiros. Após essa etapa os peixes coletados foram dissecados e retirado o músculo, brânquias, fígado e cérebro de cada indivíduo. Em seguida, os tecidos foram acondicionados dentro de criotubos identificados, inseridos em nitrogênio líquido e foram levados até o laboratório para a análise de biomarcadores bioquímicos.

#### 1.4.3. COLETA DE PARASITOS

Em campo, cada espécime de *S. rhombeus* foram examinadas: a superfície externa do corpo, a base das nadadeiras, cavidade bucal e branquial e a parede interna do opérculo para verificar a presença de ectoparasitas crustáceos.

Os crustáceos Isopodas foram removidos dos hospedeiros com pincéis, finos estiletos e pinças e posteriormente inseridos em tubos identificados e foram conservados em etanol 70%. As amostras de parasito foram identificadas utilizando bibliografias específicas de acordo com ARAÚJO (2002) e THATCHER (1993; 2006).

#### 1.4.4. MEDIÇÕES DE BIOMARCADORES

##### 1.4.4.1. biomarcadores de exposição

As amostras de cada órgão foram homogeneizadas (1:4, p/v) em tampão Tris-HCl (100 mM), EDTA (2 mM) e MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (5 mM), com pH ajustado para 7,75 (Gallagher, *et al.*, 1992), em diluição específica para cada tecido conforme protocolo padronizado para as espécies em estudo. As amostras foram então processadas em agitador mecânico, tipo Potter, e centrifugadas à 20.000 xg durante 20 min a 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi separado em alíquotas de 200 µL e acondicionado a -80 °C até o momento dos ensaios de atividade da glutathione S-transferase (GST) e da Capacidade antioxidante total (ACAP). Em cada etapa, separaram-se alíquotas adicionais para análise do teor de proteína presentes nos extratos obtidos. A medição do teor de proteínas totais (550 nm) foi efetuada com kit comercial Doles (Ltda, Brasil) baseado no método de Biureto (citrato trissódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21M e sulfato de cobre 0,01M). Todas as respostas de biomarcadores foram determinadas em espectrofluorímetro (Victor X3, Perkin Elmer, USA) com leitora de microplacas e cada leitura foi feita em triplicata.

##### 1.4.4.1.1. Determinação da atividade da glutathione-S-transferase (GST)

A determinação da atividade da glutathione S-transferase foi baseada nos métodos propostos nos trabalhos de Habig *et al.*, (1974) e Habig & Jakoby (1981). A metodologia consiste em avaliar a conjugação de 1mM de GSH (Sigma) com 1mM do reagente 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB, Sigma), processo catalisado pela GST. É utilizado o tampão fosfato 0,1 M, pH 7,00 como meio de reação. O complexo conjugado formado possui absorvância máxima em 340 nm (o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) utilizado para a formação do conjugado CDNB-GSH foi 9,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). As leituras foram realizadas em espectrofluorímetro (Victor X3, Perkin Elmer, USA) com leitora de microplacas e cada leitura foi feita em triplicata. Os resultados são expressos em UGST/ mg de proteína que representa a quantidade necessária da enzima para conjugar 1 µMol de CDNB/ min/mg de proteína, a 25°C e pH 7,0.

##### 1.4.4.1.2. Determinação da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil

A capacidade antioxidante total foi determinada conforme AMADO *et al.* (2009). Este ensaio é baseado na capacidade total da amostra (enzimática e não enzimática) de capturar os radicais peroxil. A ACAP foi analisada através da determinação da concentração de espécies ativas de oxigênio (EAO) nas amostras com e sem exposição a um gerador de radicais peroxil. O princípio deste método é que amostras com maior capacidade antioxidante terão menor formação de radicais. Os radicais peroxil foram produzidos por termólise (37°C) do reagente 2'2'-azobis-2-metilpropilamida dihidroclorato (ABAP, 4mM; Sigma-Aldrich) (Winston *et al.*, 1998). As leituras (em triplicata) foram realizadas em leitora de microplaca de fluorescência (485 e 530 para excitação e emissão respectivamente) durante uma hora (Victor X3, Perkin Elmer, USA), em um meio contendo 30 mM de HEPES (pH 7,2), 200 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 µM H<sub>2</sub>DCF-DA com e sem a adição de ABAP. O incremento de fluorescência de cada amostra ao longo de uma hora de leitura foi plotado e área sob a reta formada foi calculada. A diferença relativa entre as áreas com e sem ABAP foram consideradas como medida da capacidade antioxidante total, onde a maior área significa uma menor capacidade antioxidante, uma vez que uma alta fluorescência foi obtida após adição de ABAP, indicando baixa competência para neutralizar radicais peroxil (Amado *et al.*, 2009). A capacidade antioxidante total foi expressa pelo inverso da área relativa.

#### **1.4.4.2. Biomarcador de efeito Lipoperoxidação (LPO) - Ensaio FOX modificado**

O conteúdo de lipídeos peroxidados foi determinado segundo o método FOX, descrito por Hermes-Lima *et al.* (1995) e adaptado por Monserrat *et al.* (2003). Este ensaio é baseado na oxidação do Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> por hidroperóxidos lipídicos presentes na amostra, em pH ácido. Sob condições de pH ácido o Fe<sup>3+</sup> formado se complexa ao corante laranja de xilenol (Fe III-complexante). As amostras foram homogeneizadas (1:6 m/v) em metanol 100% à frio (4°C). Os homogeneizados foram centrifugados a 1000x g, durante 10 min à 4°C e o sobrenadante foi utilizado para determinação da lipoperoxidação. A presença de hidroperóxidos lipídicos nas amostras é avaliada espectrofotometricamente em 550 nm. O hidroperóxido de cumeno (CHP) (um hidroperóxido lipídico adicionado em concentração conhecida) foi utilizado como padrão. As leituras do ensaio (em triplicata) foram realizadas em leitora de microplaca multimodal (Victor X3, Perkin Elmer, USA). O aumento na absorbância causado pela formação do conjugado Fe<sup>3+</sup>-laranja de xilenol foi registrado a 550 nm após o tempo de

incubação específico para cada extrato de tecido (determinado por padronizações prévias). O conteúdo de peróxidos lipídicos foi expresso como equivalentes de 1nM CHP/g de tecido úmido.

## 1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACÁCIO, M., VARELLA, A.M.B., MALTA, J.C.O., 2012. The parasitic crustaceans of *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1776) (Characiformes: Serrasalminidae) from floodplain lakes of the Solimões River, Central Amazon, Brazil. *Neotropical Helminthology*. 6, 179 – 184.

ALBERTS, P. H. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Cairns, J (Eds.). *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton: Lewis publishers, 1995. p. 330-355.

ALOO, P. A.; ANAM R.O.; MWANGI, J. 2004. Metazoan parasites of some commercially important fish along the Kenyan Coast. *Western Indian Ocean J. Marine Sci.*, 3: 71-78.

AKAGI, H., NAGANUMA, A., 2000. Human exposure to Mercury and the accumulation of methylmercury that is associated with gold mining in the Amazon Basin, Brazil. *J Health Sci*. 46, 323-8.

AMADO, L.L., ROSA, C.E., LEITE, A.M., MORAES, L., PIRES, W.V., PINHO, G., MARTINS, C.M.G., ROBALDO, R.B., NERY, L.E.M., MONSERRAT, J.M., BIANCHINI, A., MARTINEZ, P.E., GERACITANO, L.A., 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*. 52, 199-206.

AMADO, L. L.; LONGARAY GARCIA, M; RAMOS, P. B.; FREITAS, R. F.; ZAFALON, B.; RIBAS FERREIRA, J. L. YUNES, J. S.; MONSERRAT, J. M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*. 407, 2115-2123.

ANDRADE, A.C.B. Biomarcadores histopatológicos e concentração de Hg em piranhas (*Serrasalmus rhombeus*) e sedimento de fundo na avaliação da qualidade ambiental de uma região de mineração da Amazônia, Brasil. 42f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2013.

ARAÚJO, C. S. Taxonomia, Morfologia e Aspectos da biologia reprodutiva dos Cymothoidae (Crustácea: Malacostraca: Isopoda) parasitas de peixes da Amazônia brasileira. 2002. 106 f. Tese de doutorado (Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior,

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Universidade do Amazonas- UA. Manaus, 2002.

BARBER, I., HOARE, D.; KRAUSE, J. 2000. The effects of parasites on fish behaviour: An evolutionary perspective. Review. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10: 1–35

BARTHEM, R. B.; FABRÉ, N. N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da amazônia. In: Ruffino, M.L. (Org.). A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia Brasileira. Manaus: Provárzea, 2004, v. p. 17-51.

BAINY, A.C.D., 1996. Antioxidant defenses and mechanism of protection against oxygen radicals, in: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. INPA, Manaus. pp. 331-335.

BERGERMAN, M., DELBONI, H., NANKRAN, M., 2009. Estudo de variabilidade e otimização do circuito de moagem SAG da Usina do Sossego. *R. Esc. Minas, Ouro Preto.* 62, 93-97.

BILLIARD, S. M.; KHAN, R. A. (2003). Chronic stress in cunner, *Tautoglabrus adspersus*, exposed to municipal and industrial effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safty.* 55 (1) 9-18.

BRÁZOVÁ, T.; TORRES, J.; EIRA, C., HANZELOVÁ, V.; MIKLISOVÁ, D., ŠALAMÚN, P. (2012). Perch and its parasites as heavy metal biomonitors in a freshwater environment: The case study of the Ružín water reservoir, Slovakia. *Sensors* 12: 3068–3081.

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. 2003. Prochilodontidae (Fannel mouth characiforms). p. 65-70. In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil.

DAUTREMEPUITS, C.; BETOULLE, S.; VERNET, G. 2002. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 4-8.

DÓREA, J. G.; BARBOSA, A.; SOUZADE, J.; FADINI, P.; JARDIM, W. F. Piranhas (*Serrasamus* spp.) as markers of mercury bioaccumulation in amazon ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.59, p.57-63, 2004.

FEARNSIDE, P. M. Environmental impacts of Brazil's Tucuruí Dam: Unlearned lessons for hydroelectric development in Amazonia. *Environmental Management* (New York), New York, v. 27, n.3, p. 377-396, 2001.

FONTANA, M.; TAKEMOTO, R. M.; MALTA, J. C. O.; MATEUS, L. A. F. Parasitism by argulids (Crustacea: Branchiura) in piranhas (Osteichthyes: Serrasalmidae) captured in the Caiçara bays, upper Paraguay River, Pantanal, Mato Grosso state, Brazil. *Neotrop. ichthyol.* 2012, vol.10, n.3 ISSN 1679-6225.

FRAGA, C. G., CAVANAGH, E., FERNANDO, C., LOTITO, S., LUCESOLI, F., OTEIZA, P.I., 1996. Antioxidant defenses and mechanism of protection against oxygen radicals, in: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. INPA, Manaus. pp. 323-330.

- FREITAS, C.E., SIQUEIRA-SOUZA, F.K., 2009. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. *Revista Agrogeoambiental*. 1, 39-45.
- GALARZA, M.A., MACAMBIRA, M.J.B., VILLAS, R.N.N., 2008. Dating and Isotopic Characteristics (Pb and S) of the Fe Oxide-Cu-Au-U-REE Igarapé Bahia Ore Deposit, Carajás Mineral Province, Pará State, Brazil. *Journal of South American Earth Sciences*. 25, 377-397.
- GALLAGHER, E.P., CANADÁ, A.T., DI GIULIO, R.T., 1992. The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquatic Toxicology*. 23, 155-168.
- GAUVIN, K.B., COSTANTINI, D., COOKE, S.J., WILLMORE, W.G., 2017. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish and Fisheries*. 1–15.
- GOERTZEN, M. M.; HAUCK, D. W.; PHIBBS, J.; WEBER, L. P; JANZ, D. M. 2012. Swimming performance and energy homeostasis in spotail shiner (*Notropis hudsonius*) collected downstream of a uranium mill. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75, 142-150.
- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 246, 7130–7139.
- HABIG, W.H., JAKOBY, W.B., 1981. Assay for differentiation of glutathione-S-transferases. *Methods in Enzymology*. 77, 398-405.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, USA.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, USA.
- HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W.; STOREY, K. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III)-xylenol orange complex formation. *Free Radical in Biology and Medicine*, 19, p. 271–280, 1995.
- JUNK, W. J.; MELO, J. A. S. 1990. N. Impactos ecológicos das represas hidrelétricas na bacia amazônica brasileira. *Estudos Avançados*, v. 4, p. 126-143.
- KASPER, D., PALERMO, E.F.A., BRANCO, C.W.C., MALM, O., 2012. Evidence of elevated mercury levels in carnivorous and omnivorous fishes downstream from an Amazon reservoir. *Hydrobiologia*. 694, 87-98.
- KASPER, D., FORSBERG, B.R., AMARAL, J.H.F., LEITÃO, R.P., PY-DANIEL, S.S., BASTOS, W.R., MALM, O., 2014. Reservoir Stratification Affects Methylmercury Levels in River Water, Plankton, and Fish Downstream from Balbina Hydroelectric Dam, Amazonas, Brazil. *Environmental Science & Technology*, v. 48, p. 1032-1040, 2014.
- KLEIN, C., LADEIRA, E.A., 2002. Petrography and Geochemistry of the least altered banded iron-formations of the of the Archean Carajás Formation, northern Brazil.

Economic Geology and the Bulletin of the Society of Economic Geologists. 97, 643-651.

LACERDA, L. D., BIDONE, E. D., GUIMARAES, A. F., AND PFEIFFER, W. C., 1994. Mercury concentrations in fish from the Itacaiunas Parauapebas River System, Carajas Region, Amazon. An. Acad. Bras. Ci. 66,373- 379.

LAFFERTY, K.D. 1997. Environmental parasitology: What can parasites tell us about human impacts on the environment? Parasitol. Today 13:251–55.

LINS, D. C; MEIRELLES, M. E.; MALM, O.; LIMA, N. R. W. 2008. Mercury concentration in the freshwater bonefish *Cyphocharax gilbert* (Curimatidae) and its parasite the crustacean *Riggia paranensis* (Cymothoidae). Neotrop. Ichthyol 6, 283–288.

LUKIN, A.; SHAROVA, J.; BELICHEVA, L.; CAMUS, L. 2011. Assessment of fish status in the Pechora River: Effects of contamination. Ecotoxicology and Environmental Safety. 74: 355-565.

MALTA, J.C.O., VARELLA, A.M., 1996. *Ergasilus yumaricus* sp. n. (Copepoda: Ergasilidae) from the gills of *Pygocentrus nattereri* (Kner, 1860), *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1819) and *Pristobrycon eigenmanni* (Norman, 1929) (Characiformes: Serrasalminidae) from the Brazilian Amazon. Acta Amazonica. 25, 93-100.

MARCOGLIESE, D. J.; BRAMBILLA, L. G.; GAGNÉ, F.; GENDRON, A. D. 2005. Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. Dis. Aquat. Org. 63, 77–84.

MARCOGLIESE, D. J.; PIETROCK, M. 2011. Combined effects of parasites and contaminants on animal health: parasites do matter. Trends in Parasitology 27:3, 123-130.

MERONA, B., SANTOS, G.M., ALMEIDA, R.G., 2000. Short term effects of Tucuruí dam (Amazonia, Brazil) on the trophic organization of fish communities. Environmental Biology of Fishes, Holanda. 60, 375-392.

MOL, J.H., 2006. Attacks on humans by the piranha *Serrasalmus rhombeus* in Suriname. Studies on Neotropical Fauna and Environment. 41, 189–195.

MONSERRAT, J.M., GERACITANO, L.A., PINHO, G.L.L., VINAGRE, T.M., FALEIROS, M., ALCIATI, J.C., BIANCHINI, A., 2003. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol Orange complex formation. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 45, 177–183.

MONTES, C.S. Uso integrado de biomarcadores para o monitoramento dos efeitos de metais em *Serrasalmus rhombeus* provenientes de rios Amazônicos. 109f. Tese (Doutorado em Ecologia Aquática e Pesca) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2016.

NEWMAN, M.C., 2015. Fundamentals of Ecotoxicology. Ann Arbor Press, Chelsea, USA.

- OLSON, k., 2002. Gill circulation: regulation of perfusion distribution and metabolism of regulatory molecules. *Journal of experimental Zoology*. 293, 320–335.
- OUELLET J. D., M. G. DUBÉ, NIYOGI, S. 2013. The influence of food quantity on metal bioaccumulation and reproduction in fathead minnows (*Pimephales promelas*) during chronic exposures to a metal mine effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 91:188-197.
- OVERSTREET, R. M. (1997). Parasitological data as monitors of environmental health. *Parassitologia* 39, 169–175.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. 2008. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Eduem, Maringá.
- PRINTRAKOON, C.; PURIVIROJKUL, W. Prevalence of *Nerocila depressa* (Isopoda, Cymothoidae) on *Sardinella albella* from a Thai estuary. *J Sea Res.* 2011, 65:322.
- PORTO, J. I. R.; ARAÚJO, C. S. O.; FELDBERG, E. 2005. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*. Nº 97. p. 287-292.
- PORVARI, P. 1995. Mercury levels of fish in Tucuruí hydroelectric reservoir and in River Mojú in Amazonia, in the state of Pará, Brazil. *The Science of the Total Environment*, 175: 109 – 117.
- RIBEIRO, D.R.G., FACCIN, H., MOLIN, T.R.D., DE CARVALHO, L.M., AMADO, L.L., 2017. Metal and metalloid distribution in different environmental compartments of the middle Xingu River in the Amazon, Brazil. *Science of The Total Environment*, 605-606, 66-74.
- ROCHA, M.S., RIBEIRO, F.R.V., 2010. A new species of *Pimelodus* LaCépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) from rio Itacaiunas, rio Tocantins basin, Brazil. *Zootaxa*. 2343, 57-65.
- ROMAN, A.P.O. Biologia reprodutiva e dinâmica populacional de *Hypancistrus Zebra* ISBRÜCKER & NIJSSEN, 1991 (Siluriformes, Loricariidae), no rio Xingu, Amazônia brasileira. 104f. Tese (Doutorado em Ecologia Aquática e Pesca) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2011.
- ROULET, M.; LUCOTTE, M., FARELLA, N.; SERIQUE, G.; COELHO, H.; SOUSA PASSOS, C. J.; JESUS DA SILVA, E.; ANDRADE, P. S.; MERGLER, D.; GUIMARÃES, J. R.; AMORIM, M. Effects of recent human colonization on the presence of mercury in Amazonian ecosystems. *Water, Air Soil Pollut* 1999;112:297]313.
- RETIEF, N. R., AVENANT-OLDEWAGE, A.; PREEZ, H. 2006. The use of cestode parasites from the largemouth yellowfish, *Labeobarbus kimberleyensis* (Gilchrist and Thompson, 1913) in the Vaal Dam, South Africa as indicators of heavy metal bioaccumulation. *Physics and Chemistry of the Earth* 31, 840–847.

- SANTOS, G. M.; JEGU, M.; MERONA, B. C. de peixes comerciais do baixo rio Tocantins; projeto Tucuruí. Manaus, ELETRONORTE/CNPqIINPA, 1984.
- SIOLI, H. Hydrochemistry and geology in the Brazilian Amazon region. *Amazoniana*. v.1, p.74-83, 1984.
- SOUZA-ARAÚJO, J. S., GIARRIZZO, T., LIMA, M.O., SOUZA, M.B.G., 2016. Mercury and methyl mercury in fishes from Bacajá River (Brazilian Amazon): evidence for bioaccumulation and biomagnification. *Journal of Fish Biology*, 1, 1-15.
- SOUZA-FILHO, P. W. M.; NASCIMENTO JR, W.R., VERSIANI DE MENDONÇA, B.R., SILVA JR, R.O., GUIMARÃES, J.T.F., DALL'AGNOL, R., SIQUEIRA, J. O., 2015. Changes in the land cover and land use of the Itacaiunas River watershed, arc of deforestation, Carajas, southeastern Amazon. *ISPRS - International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, v. XL-7/W3, p. 1491-1496.
- SURES, B.; SIDDALL, R.; TARASCHEWSKI, H. Parasites as accumulation indicators of metal pollution. *Internat. J. Parasitol.* 33: 65-70. 1999.
- Sures, B., 2003. Accumulation of heavy metals by intestinal helminths in fish: an overview and perspective. *Parasitology*. S53-S60.
- SURES, B. 2004 Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends in Parasitology*, 20, 170-177.
- SANTOS, G. M.; JEGU, M.; MERONA, B. C. de peixes comerciais do baixo rio Tocantins; projeto Tucuruí. Manaus, ELETRONORTE/CNPqIINPA, 1984.
- TELES, L. T. FURLANETTO, L. F. Z. U. L. R.; NELSON, J. S. JR. Elementos traço em peixes de interesse comercial do rio caiapó em áreas sob impacto ambiental. *Goiânia*, v. 35, n. 11/12, p. 1055-1067, nov./dez. 2008.
- THATCHER, V.E. 1993. Trematódeos Neotropicais. INPA. Manaus, Brasil. 553pp.
- THATCHER, V.E. 2006. *Amazon Fish Parasites*, 2ª Ed., Pensoft Publishers. Sofia, Bulgária. 508pp.
- VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- VIDAL-MARTÍNEZ, V. M.; PECH, D.; SURES, B.; PURUCKER, S. T. & POULIN, R. (2010). Can parasites really reveal environmental impact? *Trends in Parasitology*, Vol. 26, No. 1, (January 2010), pp. 44-51, ISSN 1471-4922
- WHO. Methylmercury in environmental health criteria 101. Geneva: World Health Organization, 1990:19.
- WINEMILLER, K.O., MCINTYRE, P.B., CASTELLO, L., FLUET-CHOUINARD, E., GIARRIZZO, T., NAM, S., BAIRD, I.G., DARWALL, W., LUJAN, N. K., HARRISON, I. STIASSNY, M. L. J. SILVANO, R. A. M. FITZGERALD, D. B.

PELICICE, F. M. AGOSTINHO, A. A. GOMES, L. C. ALBERT, J. S. BARAN, E. PETRERE, M. ZARFL, C. MULLIGAN, M. SULLIVAN, J. P. ARANTES, C. C. SOUSA, L. M. KONING, A. A., HOEINGHAUS, D.J., SABAJ, M., LUNDBERG J.G., ARMBRUSTER, J., THIEME, M.L., PETRY, P., 2016. Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong. *Science* (New York, N.Y.). 351, 128-129.

WILCKE, W.; AMELUNG, W.; MARTIUS, C.; GARCIA, M. V. B.; ZECH, W. 2000. Biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Amazonia forest. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 163: 27-30.

WINSTON, G.W., REGOLI, F., DUGAS, JR A.J., FONG, J.H., BLANCHARD, K.A., 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic Biol Med.* 24, 480–93.

**CAPÍTULO 2**

---

**Multi-tissues biomarker responses in freshwater fish with different trophic strategies from two Amazon rivers**

**Sarita Nunes Loureiro, Lílian Lund Amado, Tommaso Giarrizzo**

Artigo será submetido para a publicação no periódico Ecological Indicators.

## Respostas de biomarcadores em múltiplos tecidos de peixes de água doce com diferentes estratégias tróficas de dois rios amazônicos

Sarita Nunes Loureiro <sup>a,b,c</sup>, Lílian Lund Amado <sup>a,b</sup>, Tommaso Giarrizzo <sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Ecotoxicologia (ICB) e Laboratório de Pesquisa em Monitoramento Ambiental Marinho, Universidade Federal do Pará, Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá, Terra Firme, 66075110 Belém, Pará, Brazil.

<sup>c</sup> Laboratório de Biologia Pesqueira – Manejo dos Recursos Aquáticos (UFPA), Av. Perimetral 2651, Terra Firme, 66040170 Belém, Pará, Brazil.

### Resumo

Os ecossistemas aquáticos estão sujeitos a misturas complexas de poluentes que podem prejudicar a qualidade dos ambientes e influenciar negativamente a saúde dos organismos. Neste estudo, biomarcadores de exposição (atividade da glutathione S-transferase e capacidade antioxidante total) e de efeito (peroxidação de lipídios) foram avaliados em vários tecidos (cérebro, fígado, brânquias e músculo) de dois peixes de níveis tróficos diferentes (*Serrasalmus rhombeus* e *Prochilodus nigricans*). As coletas foram realizadas no rio Xingu (menor histórico de poluição) e rio Itacaiunas (maior histórico de influências antropogênicas de múltiplas fontes). Um total de 121 peixes foram amostrados no período seco. Como já esperado, os resultados demonstram respostas espécie-específicas e tecido-específicas. Para a espécie detritívora *P. nigricans*, verificamos uma supressão das respostas relacionadas à detoxificação e defesa antioxidante em animais do rio com maior histórico de contaminação (Itacaiunas), resultando em um maior dano oxidativo (lipoperoxidação). Já a espécie topo de cadeia *S. rhombeus*, em geral, pareceu ter uma plasticidade maior em relação aos diferentes níveis de poluição, quando avaliada com base nos biomarcadores selecionados neste estudo. Tais achados sugerem que, frente aos endpoints selecionados para a análise, *P. nigricans* seja mais sensível e que seja um bom organismo de escolha em estudos de monitoramento ambiental.

**Palavras-chave:** *P. nigricans*; *S. rhombeus*; Glutathione-S-transferase; Capacidade Antioxidante Total; Peroxidação de lipídios; guilda trófica; rios Amazônicos

## Introdução

Alguns rios amazônicos, assim como diversos rios em escala global, são alvos de influências antrópicas relacionadas às queimadas de florestas, construção de usinas hidrelétricas, perda de habitat, eutrofização, mineração, erosão de solos desmatados dentre outros (Junk e Mello, 1990; Lacerda et al., 1994; Wilcke et al., 2000; Fearnside, 2001; Trujillo-Jiménez et al., 2011; Souza-Filho et al., 2015; Souza-Araujo et al., 2016; Winemiller et al., 2016; Birnie-Gauvin et al., 2017; Ribeiro et al., 2017). Tais atividades contribuem para a contaminação e aumento da biodisponibilidade de uma série de químicos ambientais como metais e metalóides (Hg, Cd, Cr, Cu, Zn, Pb, Cu, Ni, As), elementos organometálicos (MeHg) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Lacerda et al., 1994; Aula et al., 1995; Porvari, 1995; Roulet et al., 1999; Akagi e Naganuma, 2000; Souza-Araujo et al., 2016; Ribeiro et al., 2017).

Químicos ambientais biodisponíveis podem provocar alterações no equilíbrio redox proporcionando uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no interior das células, tais como: radicais ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ácido hipocloroso (HOCl) (Halliwell e Gutteridge, 2015; Birnie-Gauvin et al., 2017). Devido à elevada instabilidade elétrica das EROs elas podem reagir com moléculas, células ou tecidos do organismo ocasionando desta forma uma lesão celular em cadeia (Fraga et al., 1996). Contudo, os organismos possuem mecanismos de defesa para prevenir e interceptar as EROs e reparar alvos oxidados, incluindo os antioxidantes enzimáticos (i.e., superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase) e não enzimáticos (i.e., metalotioneína, glutathione reduzida, vitamina A, vitamina E, beta-caroteno, vitamina C e vitaminas do complexo B) que atuarão de forma integrada para evitar que ocorram danos oxidativos nas biomoléculas (Bainy, 1996; Fraga et al., 1996; Newman, 2014; Halliwell e Gutteridge, 2015). Estas respostas de defesa antioxidante e dano oxidativo vêm sendo amplamente empregadas em estudos ecotoxicológicos como biomarcadores inespecíficos de efeito e exposição (van der Oost et al., 2003; Ippolito et al., 2016; Duarte et al., 2017).

Em uma escala global, a maioria dos trabalhos que investigaram as respostas de parâmetros de defesa antioxidante e dano oxidativo como biomarcadores em peixes residentes em ambientes impactados consideraram apenas uma espécie de peixe (Amado et al., 2006a; Amado et al., 2006b; Serafim et al., 2012; Dupuy et al., 2015) e

utilizaram apenas um tecido (Amado et al., 2006a; Amado et al., 2006b; Serafim et al., 2012), dois tecidos (Dupuy et al., 2015) ou usaram duas ou mais espécies de peixes, contudo o enfoque ocorreu em um ou dois tecidos (Solé et al., 2009; Pietrapiana et al., 2002; Kerambrun et al., 2011; Fonseca et al., 2011; Viana et al., 2013; Duarte et al., 2017) podendo dificultar uma clara interpretação de como está a saúde da população no ambiente. Além disso, os tecidos mais utilizados em estudos para determinar estresse oxidativo em peixes são fígado e músculo (Amado et al., 2006a; Amado et al., 2006b; Solé et al., 2009; Fonseca et al., 2011; Trujillo-Jiménez et al., 2011; Duarte et al., 2017).

A grande maioria das pesquisas realizadas em rios amazônicos que verificaram a influência de impactos ambientais sobre a ictiofauna tem focado a nível populacional ou nas assembleias de peixes (e.g., Lacerda et al., 1994; Porvari, 1995; Santos et al., 2000; Souza-Araujo et al., 2016; Ribeiro et al., 2017). Alguns trabalhos avaliaram os níveis de mercúrio e a influência desse metal na bioacumulação e/ou biomagnificação em tecidos musculares de peixes (Dórea, et al., 2003; Kasper et al., 2012; Kasper et al., 2014; Souza-Araujo et al., 2016), outros estudos verificaram impactos diretos e indiretos de construções de barragens, observando que esse tipo de empreendimento, realizados em alguns rios amazônicos, modificaram os recursos alimentares disponíveis para os peixes, além de exercerem influência na abundância, biomassa e na interrupção de rotas de migração de algumas espécies de peixes (Junk e Mello, 1990; Barthem et al., 1991; Meróna et al., 2001). Em menor nível de organização biológica existe um estudo que observou efeitos genotóxicos através do teste de micronúcleo no sangue de peixes da espécie *Prochilodus nigricans*, *Mylossoma duriventris* e *Hoplias malabaricus* e associaram esses efeitos à poluição por mercúrio (Porto et al., 2005). Um outro trabalho avaliou a qualidade ambiental em um distrito industrial no rio Pará, estuário Amazônico, e usou como ferramenta para a análise biomarcadores histológicos e a verificação da atividade da catalase no fígado de duas espécies de peixe (Viana et al., 2013). Assim, até o presente momento, são escassos os estudos que verificaram os efeitos da poluição em menores níveis de organização biológica em peixes amazônicos.

Nesse contexto, o principal objetivo do presente trabalho foi determinar os padrões de resposta de biomarcadores de exposição e efeito em diversos órgãos (i.e., brânquias, cérebro, fígado, músculo) de peixes de diferentes níveis tróficos, o carnívoro *Serrasalmus rhombeus* e o detritívoro *P. nigricans* provenientes de rios com diferentes

níveis de pressão antrópica, a fim de proporcionar uma visão mais integrada e complementar da saúde dos organismos.

## Material e métodos

### Área de estudo

O presente estudo foi realizado em um local que apresenta uma forte influência de atividades antrópicas (Rio Itacaiunas) e um local com menor histórico de poluição (Rio Xingu) (Figura 1). Os rios Xingu e Itacaiunas constituem típicos ecossistemas de águas claras da Bacia Amazônica, caracterizados por águas transparentes com baixos compostos orgânicos e baixas cargas de sedimento (Sioli, 1984).

A bacia hidrográfica do rio Itacaiunas está localizada no sudeste da região amazônica, perto da Serra de Carajás uma das maiores províncias de mineração do mundo. Na região há exploração de minérios de ferro, cobre, manganês, ouro e outros (Lacerda et al., 1994; Klein e Ladeira, 2002; Galarza et al., 2008; Rocha e Ribeiro, 2010). O rio Itacaiunas, tributário do rio Tocantins é um rio de águas claras, que recebe efluentes de mineração de ouro, além de altas taxas de desmatamento das suas margens que contribuem com a formação de novas paisagens dominadas por pastagens (Souza-Filho et al., 2015). As coletas no rio Itacaiunas foram realizadas em um ponto próximo ao mosaico de conservação de Carajás, Casa PAE, ICMBio, 5°55'44,7"S 50°43'2,6"W.

A bacia do rio Xingu origina-se no estado brasileiro de Mato Grosso e deságua na margem direita do rio Amazonas a jusante da cidade de Porto de Moz, no estado do Pará, cobrindo mais de 500.000 km<sup>2</sup>. As coletas no rio Xingu foram realizadas em um momento em que ainda não havia ocorrido a construção da barragem e foram realizadas próximo à ilha da fazenda, 3°33'56,3"S 51°55'36,55"W. No presente trabalho foi considerado o local com menor histórico de poluição, pois a ilha da Fazenda está localizada a jusante de Altamira e mais distante da cidade e do centro da pressão pesqueira (Roman, 2011, dados não publicados).

### Espécies biomonitoras

As espécies de peixes utilizadas para a avaliação do seu potencial como biomonitoras foram a *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1766) que é uma espécie carnívora, pertencente à ordem Characiformes e família Serrasalminidae; e a espécie detritívora *Prochilodus nigricans* Spix & Agassiz, 1829, pertencente à ordem

Characiformes e família Prochilodontidae. *S. rhombeus* está entre os principais predadores de ecossistema de água doce Neotropical e *P. nigricans* é considerada uma das espécies de maior importância econômica nos principais portos da Amazônia. Ambas espécies servem como fonte de alimento para a comunidade ribeirinha amazônica e podem ser usadas como biomonitoras de poluição aquática, uma vez que possuem ampla distribuição geográfica em várzeas amazônicas, apresentam características ecológicas muito bem conhecidas, são abundantes e de fácil coleta (Santos et al., 1984; Almeida et al., 1998; Castro e Vari, 2003; Dórea et al., 2004; Barthem e Fabré, 2004; Mol, 2006; Freitas et al., 2009; Froese e Pauly, 2013; Souza-Araujo et al., 2016).

#### Método de amostragens

As amostragens foram padronizadas no período de estiagem, sendo que a coleta no rio Itacaiunas foi realizada no mês de dezembro de 2013 e no rio Xingu em julho de 2014.

Durante as amostragens foram medidas variáveis físico-química da água na superfície: pH, temperatura e oxigênio dissolvido utilizando uma sonda multiparamétrica HANNA®, modelo HI9828.

Foram capturados 21 indivíduos de *S. rhombeus* no rio Itacaiunas e 20 no rio Xingu e 40 indivíduos de *P. nigricans* em cada rio totalizando 121 amostras. Nos dois rios, os peixes da espécie *S. rhombeus* foram coletados em ambientes de remanso e no canal principal do rio, já a espécie *P. nigricans* em ambientes de pedrais e corredeiras. Visando minimizar o efeito de estresse que pode ser provocado no momento da pescaria, as coletas foram padronizadas usando-se anzol para as capturas de *S. rhombeus* e tarrafa para *P. nigricans*.

Imediatamente após a captura, os peixes foram crioanestesiados, posteriormente eles foram pesados (com precisão de 0,01g) e medido o comprimento total (com precisão de 0,1 cm). A seguir, os peixes coletados foram dissecados e retirados o músculo, brânquias, fígado e cérebro de cada indivíduo. Em seguida, os tecidos foram acondicionados dentro de criotubos identificados, inseridos em nitrogênio líquido e foram levados até o laboratório e armazenados em ultrafreezer à -80°C até o momento das análises de biomarcadores bioquímicos.

## Biomarcadores de exposição e efeito

### Biomarcadores de exposição

As amostras de cada órgão foram homogeneizadas (1:4, p/v) em tampão Tris-HCl (100 mM), EDTA (2 mM) e MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (5 mM), com pH ajustado para 7,75 (Gallagher et al., 1992) em diluição específica para cada tecido conforme protocolo padronizado para as espécies em estudo. As amostras foram então processadas em agitador mecânico, tipo Potter, e centrifugadas à 20.000 xg durante 20 min a 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi separado em alíquotas de 200 µL e acondicionado a -80 °C até o momento dos ensaios de atividade da glutathione S-transferase (GST) e da Capacidade antioxidante total (ACAP). Em cada etapa, separaram-se alíquotas adicionais para análise do teor de proteína presentes nos extratos obtidos. A medição do teor de proteínas totais (550 nm) foi efetuada com kit comercial Doles (Ltda, Brasil) baseado no método de Biureto (citrato trissódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21M e sulfato de cobre 0,01M). Todas as respostas de biomarcadores foram determinadas em espectrofluorímetro (modelo Victor X3, Perkin Elmer, USA) com leitora de microplacas e cada leitura foi feita em triplicata.

### Determinação da atividade da glutathione-S-transferase (GST)

A determinação da atividade da glutathione S-transferase foi baseada nos métodos propostos nos trabalhos de Habig et al., (1974) e Habig & Jakoby (1981). A metodologia consiste em avaliar a conjugação de 1mM de GSH (Sigma) com 1mM do reagente 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB, Sigma), processo catalisado pela GST. É utilizado o tampão fosfato 0,1 M, pH 7,00 como meio de reação. O complexo conjugado formado possui absorvância máxima em 340 nm (o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) utilizado para a formação do conjugado CDNB-GSH foi 9,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). As leituras foram realizadas em espectrofluorímetro (Victor X3, Perkin Elmer, USA) com leitora de microplacas e cada leitura foi feita em triplicata. Os resultados são expressos em UGST/ mg de proteína que representa a quantidade necessária da enzima para conjugar 1 µMol de CDNB/ min/mg de proteína, a 25°C e pH 7,0.

### Determinação da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil

A capacidade antioxidante total foi determinada conforme Amado et al. (2009). Este ensaio é baseado na capacidade total da amostra (enzimática e não enzimática) de capturar os radicais peroxil. A ACAP foi analisada através da determinação da

concentração de espécies ativas de oxigênio (EAO) nas amostras com e sem exposição a um gerador de radicais peroxil. O princípio deste método é que amostras com maior capacidade antioxidante terão menor formação de radicais. Os radicais peroxil foram produzidos por termólise (37°C) do reagente 2'2'-azobis-2-metilpropilamida dihidroclorato (ABAP, 4mM; Sigma-Aldrich) (Winston et al., 1998). As leituras (em triplicata) foram realizadas em leitora de microplaca de fluorescência (485 e 530 para excitação e emissão respectivamente) durante uma hora (Victor X3, Perkin Elmer, USA), em um meio contendo 30 mM de HEPES (pH 7,2), 200 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 µM H<sub>2</sub>DCF-DA com e sem a adição de ABAP. O incremento de fluorescência de cada amostra ao longo de uma hora de leitura foi plotado e a área sob a reta formada foi calculada. A diferença relativa entre as áreas com e sem ABAP foram consideradas como medida da capacidade antioxidante total, onde a maior área significa uma menor capacidade antioxidante, uma vez que uma alta fluorescência foi obtida após adição de ABAP, indicando baixa competência para neutralizar radicais peroxil (Amado et al., 2009). A capacidade antioxidante total foi expressa pelo inverso da área relativa.

Biomarcador de efeito

Lipoperoxidação (LPO) - Ensaio FOX modificado

O conteúdo de lipídeos peroxidados foi determinado segundo o método FOX, descrito por Hermes-Lima et al. (1995) e adaptado por Monserrat et al. (2003). Este ensaio é baseado na oxidação do Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> por hidroperóxidos lipídicos presentes na amostra, em pH ácido. Sob condições de pH ácido o Fe<sup>3+</sup> formado se complexa ao corante laranja de xilenol (Fe III-complexante). As amostras foram homogeneizadas (1:6 p/v) em metanol 100% à frio (4°C). Os homogeneizados foram centrifugados a 1000x g, durante 10 min à 4°C e o sobrenadante foi utilizado para determinação da lipoperoxidação. A presença de hidroperóxidos lipídicos nas amostras é avaliada espectrofotometricamente em 550 nm. O hidroperóxido de cumeno (CHP) (um hidroperóxido lipídico adicionado em concentração conhecida) foi utilizado como padrão. As leituras do ensaio (em triplicata) foram realizadas em leitora de microplaca multimodal (Victor X3, Perkin Elmer, USA). O aumento na absorbância causado pela formação do conjugado Fe<sup>3+</sup>-laranja de xilenol foi registrado a 550 nm após o tempo de incubação específico para cada extrato de tecido (determinado por padronizações

prévias). O conteúdo de peróxidos lipídicos foi expresso como equivalentes de 1nM CHP/g de tecido úmido.

#### Análise estatística

Os dados de comprimento total (CT) e peso para cada espécie amostrada nos dois rios foram testados quanto a normalidade (teste de Shapiro-Wilks) e homocedasticidade (teste de Levene) das variâncias e a transformação log<sub>10</sub> foi aplicada quando necessário. O Teste t-student ou Mann-Whitney (sempre que a normalidade e/ou homocedasticidade não foram atendidas) foram aplicados em ordem para detectar diferenças significativas entre o CT e peso dos peixes do rio Xingu e Itacaiunas.

A matriz que reuniu os descritores bioquímicos, para cada espécie, por rio, foi utilizada para calcular a matriz de semelhança de distância euclidiana. Por sua vez, essa matriz de similaridade foi simplificada através do cálculo da distância entre os centroides considerando o fator composto rios & tecido. As duas matrizes triangulares foram ordenadas pela Análise de Coordenadas Principais (PCO) (Anderson e Willis, 2003). A análise permutacional baseada em distância de variância (PERMANOVA; Anderson, et al., 2008) foi empregada para testar as respostas bioquímicas dos biomarcadores (GST, ACAP e LPO) ao fator espécie (com dois níveis fixos: *S. rhombeus* e *P. nigricans*), fator rios (com dois níveis fixos: rio Xingu e rio Itacaiunas) e fator tecidos (com quatro níveis fixos: cérebro, fígado, brânquias e músculo). Foi usada a distância Euclidiana com a permutação irrestrita dos dados brutos, soma dos quadrados do tipo III e 9999 permutações. Posteriormente, o teste de comparação a posteriori pair-wise foi aplicado usando a PERMANOVA estatística t, objetivando verificar diferenças entre tecidos de cada espécie para um mesmo rio e diferenças entre rios para um mesmo tecido de cada espécie. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão [n].

O nível de significância que foi adotado foi de 0.05 para todos os testes e as análises foram realizadas utilizando os programas Estatística 6.0 e PRIMER v7 (Anderson et al., 2008).

## Resultados

Os valores médios para todos os parâmetros medidos foram similares entre os dois rios ( $p > 0.05$ ), o pH da água foi de 7,3 no rio Itacaiunas e 6,2 no rio Xingu, os valores temperatura foi de 29,6 no rio Itacaiunas e 30,3 no rio Xingu e oxigênio dissolvido de 6,9 no rio Itacaiunas e 7,1 no rio Xingu.

Os peixes da espécie *S. rhombeus* capturados no rio Itacaiunas apresentaram um comprimento total médio ( $\pm$  desvio padrão) de  $21,1 \pm 4,12$  cm variando entre 12,5 e 31,7 cm e com um peso médio de  $220,8 \text{ g} \pm 180,5$  variando de 30 e 700 g. Já no rio Xingu os peixes dessa espécie apresentaram um comprimento total médio de  $23,4 \pm 3,60$  cm variando entre 17,7 e 29,2 cm e com um peso médio de  $287,1 \text{ g} \pm 149,1$  variando de 80 e 560 g. Não foram verificadas diferenças significativas em relação ao comprimento total ( $t = -1.898$ ;  $p > 0.05$ ) e o peso ( $t = -1.796$ ;  $p > 0.05$ ) dos espécimes de *S. rhombeus* coletados nos dois rios.

Os peixes da espécie *P. nigricans* capturados no rio Itacaiunas apresentaram um comprimento total médio de  $31,2 \pm 3,8$  cm, variando entre 22,3 e 38,7 cm e com um peso médio de  $471,3 \text{ g} \pm 165,0$  variando de 130 e 800 g. Já no rio Xingu os peixes dessa espécie apresentaram um comprimento total médio de  $29,8 \pm 4,8$  variando entre 16,3 e 38,4 cm e com um peso médio de  $431,5 \text{ g} \pm 214,1$  variando de 70 e 1020 g. Não foram verificadas diferenças significativas entre os rios em relação ao comprimento total ( $U = 693$ ;  $p > 0.05$ ) e o peso ( $t = -0.931$ ;  $p > 0.05$ ) dos peixes *P. nigricans* coletados.

O plot da PCO, indicou uma clara separação das duas espécies ao longo do primeiro eixo com um percentual de explicação da variação de 49,8%, segregando no lado direito da ordenação as amostras de *P. nigricans* e no lado esquerdo as amostras de *S. rhombeus* (Fig. 2a). Verificou-se também uma clara separação entre os tecidos ao longo do eixo 2 com 32% de variabilidade explicada onde as brânquias ficaram na parte inferior, o músculo e o cérebro na parte intermediária e o fígado na parte superior da ordenação (Fig. 2a). Quando ordenados os centroides das espécies de acordo com os rios e tecidos, foi observada na representação da PCO, uma clara simetria no eixo 1 e no eixo 2, verificando-se que as espécies estão separadas ao longo do eixo 1 (60,4%). Já a separação entre tecidos e rios se demonstra mais evidente ao longo do eixo 2 (30,1%) (Fig. 2b). Os resultados gráficos observados nas PCOs foram comprovados com a

análise PERMANOVA que detectou diferenças significativas entre espécies (Pseudo-F= 311.70,  $p < 0.01$ ), tecidos (Pseudo-F= 76.86,  $p < 0.001$ ), rios (Pseudo-F= 3.40,  $p < 0.05$ ) e as suas interações (Tabela 1).

Na ordenação dos tecidos para cada espécie separadamente nos dois rios, foi verificado que o fígado, músculo, brânquias e cérebro dos peixes *S. rhombeus* são perfeitamente separados ao longo do primeiro eixo de acordo com os dois rios (Fig. 3a, 3b, 3c, 3d). A espécie *P. nigricans* também apresentou uma clara segregação na ordenação dos tecidos entre os rios Itacaiunas e Xingu (Fig. 3e, 3f, 3g, 3h). Esses padrões de separações para cada espécie corroboraram o encontrado na análise PERMANOVA onde verificou-se diferenças significativas para os tecidos de *P. nigricans* (PERMANOVA: Pseudo-F= 6.49,  $p < 0.01$ ) (Tabela 1) e de *S. rhombeus* (PERMANOVA: Pseudo-F= 6.07,  $p < 0.01$ ) (Tabela 1).

Na comparação para verificar diferenças entre rios em um mesmo tecido, observou-se que para a espécie *S. rhombeus* houve uma maior atividade da GST nas brânquias dos peixes do rio Itacaiunas ( $35,02 \pm 1,47$  UGST.g de proteína<sup>-1</sup>) em relação a esse mesmo tecido nos peixes do rio Xingu ( $10,40 \pm 0,72$  UGST.g de proteína<sup>-1</sup>) (Tabela 3, Fig. 4a). Já em *P. nigricans*, verificou-se que a atividade da GST foi maior no cérebro ( $14,76 \pm 0,68$  UGST.g de proteína<sup>-1</sup>), no fígado ( $58,05 \pm 2,52$  UGST.g de proteína<sup>-1</sup>), nas brânquias ( $1,50 \pm 0,10$  UGST.g de proteína<sup>-1</sup>) e no músculo ( $7,85 \pm 0,62$  UGST.g de proteína<sup>-1</sup>) dos peixes do rio Xingu em relação ao cérebro ( $12,34 \pm 0,81$  UGST.g de proteína<sup>-1</sup>), fígado ( $22,45 \pm 2,44$  UGST.g de proteína<sup>-1</sup>), brânquias ( $0,93 \pm 0,10$  UGST.g de proteína<sup>-1</sup>) e músculo ( $6,06 \pm 0,36$  UGST.g de proteína<sup>-1</sup>) dos peixes do rio Itacaiunas (Tabela 3, Fig. 4d).

Em uma análise geral, na comparação entre os tecidos para uma mesma espécie e um mesmo rio, verificou-se que a atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST) foi maior no fígado das duas espécies de ambos os rios em relação aos outros tecidos analisados (Tabela 4, Fig. 4a, 4d).

Para a espécie *S. rhombeus*, o cérebro ( $10,08 \pm 1,48$ ) e o músculo ( $6,13 \pm 1,12$ ) dos peixes do rio Xingu apresentaram uma competência maior contra radicais peróxil em relação aos mesmos tecidos ( $6,04 \pm 1,28$  e  $1,89 \pm 0,77$ , para cérebro e músculo, respectivamente) dos peixes do rio Itacaiunas (Tabela 3, Fig. 4b). Contudo, um padrão

oposto foi encontrado em fígado ( $2,71 \pm 0,46$ ) dos peixes do rio Itacaiunas que apresentaram uma elevada competência contra radicais peróxido em relação ao fígado ( $1,52 \pm 0,27$ ) dos peixes do rio Xingu (Tabela 3, Fig. 4b). Já para a espécie *P. nigricans*, foi verificada uma certa tendência de um ACAP menor para os peixes do rio Itacaiunas em relação aos peixes do rio Xingu, contudo diferenças significativas foram observadas somente para o fígado ( $1,78 \pm 0,33$ ) e brânquias ( $4,08 \pm 0,73$ ) dos peixes do rio Xingu (Tabela 3, Fig. 4e) que apresentaram um inverso da área relativa maior em relação ao fígado ( $0,53 \pm 0,05$ ) e brânquias ( $2,13 \pm 0,29$ ) dos peixes do rio Itacaiunas (Tabela 3, Fig. 4e).

De modo geral, verificou-se uma maior capacidade antioxidante total (ACAP) nas brânquias ( $31,01 \pm 8,48$ ) de *S. rhombeus* do rio Itacaiunas em relação aos outros tecidos analisados dos peixes desse rio (Tabela 4, Fig. 4e). Já nos peixes *S. rhombeus* do rio Xingu observou-se uma ACAP maior no cérebro ( $10,08 \pm 1,48$ ) e nas brânquias ( $21,95 \pm 9,02$ ) em comparação aos outros tecidos analisados (Tabela 4, Fig. 4b). Em relação à espécie *P. nigricans* observou-se que as brânquias dos peixes de ambos os rios apresentam uma maior ACAP do que os outros tecidos analisados (Tabela 4, Fig. 4e).

Na comparação entre rios para um mesmo tecido, verificou-se que o músculo ( $118,71 \pm 11,99$  nmol CHP/g tecido úmido) de *S. rhombeus* do rio Xingu apresentou valores maiores de LPO em relação ao músculo ( $68,34 \pm 3,74$  nmol CHP/g tecido úmido) dos peixes do rio Itacaiunas (Tabela 3, Fig. 4c). Já em relação à *P. nigricans*, verificou-se valores elevados de LPO no cérebro ( $603,73 \pm 23,80$  nmol CHP/g tecido úmido) e músculo ( $610,29 \pm 16,07$  nmol CHP/g tecido úmido) dos peixes do rio Itacaiunas em relação ao cérebro ( $477,20 \pm 29,69$  nmol CHP/g tecido úmido) e músculo ( $525,46 \pm 11,58$  nmol CHP/g tecido úmido) dos peixes do rio Xingu (Tabela 3, Fig. 4f).

Na análise de lipoperoxidação (LPO) em geral as brânquias dos peixes das duas espécies e de ambos os rios apresentaram um menor conteúdo de LPO em relação aos outros tecidos (Tabela 4; Fig. 4c e 4f). Sendo que o valor de LPO observado em cérebro de *S. rhombeus* do rio Itacaiunas foi similar ao observado em brânquias e músculo dos peixes do mesmo rio (Tabela 4, Fig. 4c). E os músculos dos peixes dessa espécie do rio Xingu apresentaram um maior conteúdo de LPO em relação aos outros tecidos dos peixes nesse rio (Tabela 4, Fig. 4c). Para a espécie *P. nigricans* verificou-se que o cérebro e o músculo dos peixes do rio Itacaiunas apresentaram um maior conteúdo de

LPO em relação aos outros tecidos analisados nos peixes desse mesmo rio e este mesmo padrão foi verificado para os peixes do rio Xingu (Tabela 4, Fig. 4f.).

## **Discussão**

Os resultados do presente estudo forneceram não apenas informações relacionadas às diferentes respostas dos biomarcadores bioquímicos em vários tecidos (cérebro, fígado, brânquias e músculo) de peixes com distintos níveis tróficos, mas também permitiram a identificação de respostas tecido-específicas e espécie-específicas conforme os biomarcadores utilizados. Estes resultados elucidam quais tecidos e organismos são mais ou menos responsivos, em termos de estresse oxidativo a uma mistura complexa de poluentes. Sendo resultados importantes para uma melhor seleção de espécies e tecidos alvos em estudos de avaliação da qualidade ambiental.

De maneira geral, os resultados do presente estudo confirmam que espécies de diferentes níveis tróficos, sendo *S. rhombeus* carnívora e *P. nigricans* detritívora, respondem de forma distinta à poluição no ambiente. Este fato já é bem conhecido na literatura uma vez que as diferentes estratégias de ocupação e uso do habitat tornam as espécies residentes mais ou menos expostas a contaminantes biodisponíveis (Fonseca et al., 2011; Duarte et al., 2017). Fonseca et al. (2011) verificaram diferenças interespecíficas nas respostas de biomarcadores, frente às influências antropogênicas, de três espécies de peixes estuarinas com diferentes características e estratégias de vidas (i.e., *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis*, *Pomatoschistus microps*), e sugeriram que as respostas desiguais podem ocorrer devido aos diferentes tipos de comportamentos alimentares, ciclo de vida e usos do habitat dessas espécies. E em uma outra abordagem comparativa usando algumas espécies de peixes e de macroinvertebrados foi detectada, através da escala multidimensional (MDS), uma distinção entre as espécies e foi proposto que os diferentes traços funcionais das espécies, tais como o uso do habitat, estágio de vida, a alimentação ou a fisiologia são fatores que podem contribuir nas rotas de exposição e influenciar nas respostas dos biomarcadores (Duarte et al., 2017).

Tendo em vista os distintos órgãos analisados registrou-se que, em termos de biomarcadores de exposição analisados (GST e ACAP), os órgãos mais responsivos para as duas espécies foram o fígado (GST) e as brânquias (ACAP). A maior

capacidade de defesa destes órgãos, conferida por um maior potencial de detoxificação no fígado e uma maior capacidade antioxidante nas brânquias leva à ausência de danos oxidativos nestes órgãos nas duas espécies, mesmo considerando espécimes residentes no ambiente mais impactado. Além de brânquias e fígado, a espécie *S. rhombeus* também não apresentou danos oxidativo no cérebro, ao contrário de *P. nigricans*. É possível que esse resultado no cérebro seja devido à alta atividade da GST também neste órgão em *S. rhombeus*, ao contrário do observado em *P. nigricans*. A GST é uma enzima de biotransformação de fase II, que envolve a reação de conjugação do composto xenobiótico oxidado com moléculas endógenas (e.g. ácido glicurônico e glutathione reduzida) e tais produtos conjugados geralmente são menos tóxicos e rapidamente excretados, fazendo com que esta enzima possua um papel fundamental no processo de detoxificação (Andersson e Förlin, 1992; Newman, 2015; Halliwell e Gutteridge, 2015). Além disso, a GST também tem papel importante na defesa antioxidante por facilitar a eliminação de produtos de dano oxidativo como hidroperóxidos lipídicos (Halliwell e Gutteridge, 2015). A atividade desta enzima é geralmente maior no fígado, por este órgão ser o principal local de detoxificação, apresentando alta concentração da glutathione (GSH) que atua como co-substrato da GST, o que favorece os altos níveis de sua atividade (Elia et al., 2003; Almeida et al., 2005; Camargo et al., 2006; Newman, 2015; Halliwell e Gutteridge, 2015). Estas respostas relacionadas aos diferentes potenciais de detoxificação em diferentes tecidos foi verificado em um trabalho prévio, como por exemplo, o estudo que constatou a presença de metais (Zn, Cu, Cd, As e Pb) em tecidos do bagre africano (*Clarias gariepinus*) do rio Ogun na Nigéria e observou que os níveis de atividade da GST foram maiores no fígado, rim e coração e diminuiu nas brânquias (Farombi et al., 2007).

Apesar das diferentes especificidades dos órgãos, as respostas dos biomarcadores em todos os tecidos da espécie *P. nigricans* seguiram um padrão. Observa-se que *P. nigricans* do rio Itacaiunas apresentou uma clara supressão de biomarcadores de exposição (GST e ACAP). Todos os órgãos analisados apresentaram menor capacidade de detoxificação (menor atividade da GST) em organismos coletados no rio Itacaiunas. Em relação a capacidade antioxidante o mesmo padrão foi observado, apesar da diferença estatística significativa ter sido evidente apenas em fígado e brânquias. É provável que o hábito alimentar detritívoro desta espécie a deixe mais

expostas a contaminantes biodisponíveis e concentrados no sedimento. Outros trabalhos realizados com o peixe neotropical de água doce de mesmo gênero, *Prochilodus lineatus*, mostraram que essa espécie pode ser usada como biomonitora de poluição, pois devido ao seu hábito alimentar detritívoro, apresentam uma maior sensibilidade à componentes tóxicos no sedimento e água (Mazon e Fernandes, 1999; Cerqueira e Fernandes, 2002; Martinez e Souza, 2002; Da Silva et al., 2004; Martinez et al., 2004; Almeida et al., 2005; Camargo e Martinez, 2006; Camargo e Martinez, 2007; Pérez et al., 2018).

Em um estudo prévio realizado no período seco no rio Itacaiunas, no mesmo ponto amostrado do presente estudo, verificou uma concentração média de  $0.077 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de THg no sedimento em relação aos outros pontos amostrados ao longo do rio (Andrade *et al.*, dados não publicados, 2013). Em outro trabalho, tanto no período seco quanto no chuvoso foram verificados valores significativos de Cd e Cu nas águas do rio Itacaiunas e em amostras de sedimento verificaram elevados valores de Zn, Mn e Cu no período seco e de Cu no período chuvoso (Montes et al., dados não publicados, 2016). Os metais redox ativos, como o ferro, o cobre e o cromo, são submetidos a ciclos redox, enquanto os metais redox inativos (*i.e.* chumbo, cádmio, mercúrio e zinco) esgotam os principais agentes antioxidantes nas células, sobretudo os antioxidantes que contém o grupo thiol e enzimas (Winston e Di Giulio, 1991; Ercal et al., 2001). Os metais redox-ativos ou redox-inativos podem causar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) tais como o radical hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ), o radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ou o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Di Giulio et al., 1989; Ercal et al., 2001). Levando em consideração os estudos supracitados, sugere-se que os cenários do presente estudo podem ser respostas frente à exposição de químicos ambientais que estão biodisponíveis ao longo do rio Itacaiunas.

O padrão de resposta dos biomarcadores de exposição nos tecidos de *P. nigricans* pode ser devido ao fato de que a GST e algumas das principais defesas antioxidantes têm natureza proteica e como tal podem ser danificadas/oxidadas em decorrência a exposição crônica a poluentes o que ocasiona a queda na sua atividade biológica (Elia et al., 2003; Vieira et al., 2009; Fonseca et al., 2011). Como, por exemplo, a depleção verificada nos níveis de glutathione e das enzimas catalase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase e da glutathione reductase verificada em

cérebro de *Liza aurata*, e tais resultados foram associados com os níveis acumulados de THg nesse tecido (Mieiro et al., 2010). Elia et al., (2003) destacou também que a depleção da GSH em organismos expostos à metais parece ser acompanhada da variação na atividade da GST e que as diferentes respostas são associadas ao tempo de exposição, à concentração do estressante e depende das diferentes espécies analisadas. Além da já citada diminuição da capacidade antioxidante e de detoxificação, que já mostram efeitos tóxicos, evidências de oxidação de biomoléculas foram encontradas nos resultados de LPO, onde verificou-se lipoperoxidação em cérebro e músculo dos animais de Itacaiunas, indicando que a supressão da detoxificação e defesa antioxidante nestes órgãos se traduz em danos oxidativos.

Diferentemente de *P. nigricans*, com exceção do cérebro e músculo (ACAP), as respostas bioquímicas de *S. rhombeus* não apresentaram um padrão semelhante em relação às respostas de defesas antioxidantes e de detoxificação nos demais tecidos. Os níveis observados da GST significativamente maiores em brânquias e da capacidade antioxidante total (ACAP) em fígado de *S. rhombeus* do rio Itacaiunas, sugerem que essa espécie seja mais resistente frente aos químicos ambientais presentes no ambiente ou que o seu uso do habitat a torne exposta a concentrações de contaminantes biodisponíveis não tão altas como *P. nigricans*, havendo a possibilidade de resposta apropriada de defesas antioxidantes e de vias de detoxificação. Este resultado corrobora o observado em um outro estudo, onde tanto as respostas oxidativas quanto o potencial antioxidante variaram entre os tecidos de peixes e foi sugerido que a diferença encontrada seja inerente ao tipo de habitat das espécies e do seu comportamento alimentar (Ahmad et al., 2000).

Ao contrário do fígado, os baixos níveis de GST e uma alta competência antioxidante nas brânquias de *P. nigricans* dos dois rios em comparação aos outros tecidos, sugerem uma resposta tecido-específica, já a indução da GST e elevado ACAP em brânquias de *S. rhombeus* do rio Itacaiunas indicam que seja tanto uma resposta tecido-específica como espécie-específica. Provavelmente à exposição aos diferentes tipos de metais no rio Itacaiunas podem estar elevando os níveis de (EROS) nas brânquias, sugerindo que tais respostas bioquímicas para ambas espécies do presente estudo sejam uma estratégia metabólica das brânquias para protegê-las de danos oxidativos e que provavelmente favoreceu no processo de detoxificação de

hidroperóxidos lipídicos, fazendo com que não fosse observado efeitos em nível de LPO nesse tecido para as duas espécies dos dois rios. Este resultado é esperado, já que as brânquias apresentam um elevado maquinário metabólico de defesa. As brânquias funcionam como principal interface reguladora entre o ambiente interno e externo, além de ser o principal sistema de respiração dos peixes, sendo realizado várias funções simultaneamente, como por exemplo, a troca de íons inorgânico e a água, balanço ácido-base e a excreção de compostos nitrogenados (Olson 2002; Evans, 2005). As brânquias também são alvos da ação tóxica do cobre, podendo ocorrer deteriorações das funções respiratórias e distúrbios ionoregulatórios devido a mudanças estruturais, estudos mostram que a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase encontrada nas células epiteliais das brânquias, pode ser alterada havendo um aumento da permeabilidade iônica do epitélio branquial e a inibição de sua atividade (Wilson e Taylor., 1996; Li et al., 1998). Complementarmente, alguns trabalhos sugerem que as brânquias funcionam como um local para o metabolismo e excreção de toxinas (Miller et al., 1989; Wilhelm Filho et al., 1995; Olson 2002; Evans et al., 2005). A indução de enzimas do citocromo P450 ocorreu nas brânquias de *Stenotomus chrysops* frente à exposição a hidrocarbonetos e foi sugerido que a atividade dessa enzima neste órgão tem função adaptativas, alterando a natureza e a quantidade de xenobióticos (Miller et al., 1989), contudo o próprio aumento da atividade do citocromo P450 promove um aumento de EROS (Halliwell e Gutteridge, 2015). É sugerido também, que as brânquias sejam envolvidas no processo de biotransformação, facilitando a depuração de alguns compostos nas células pilares de lamelas branquiais tornando os xenobióticos mais solúveis em água e sendo facilmente eliminados (Miller et al., 1989; Evans et al., 2005). Um outro fator que pode ter contribuído para o cenário de proteção das brânquias das duas espécies no presente estudo, pode estar relacionado ao fato de que existe um mecanismo complementar para manter baixos níveis de peróxido de hidrogênio através de sua excreção passiva que ocorre nas brânquias, como o observado pela espécie *Poecilia velligera* que libera o  $\text{H}_2\text{O}_2$  aparentemente por difusão branquial (Wilhelm Filho et al., 1994).

A lipoperoxidação em cérebro de *P. nigricans* do rio Itacaiunas indica um início de efeitos neurodegenerativos que podem possibilitar o surgimento de consequências negativas para à saúde dos peixes da espécie *P. nigricans* nesse rio. Os estímulos dos

peixes são percebidos por estruturas sensoriais especializadas e convertidos em sinais elétricos e assim conduzidos ao sistema nervoso central. Assim, atividades comportamentais, tais como natação, busca de alimentos, reconhecimento de predadores, migração podem ser fortemente afetados quando ocorrem lesões em elementos ligados ao sistema nervoso central (Baatrup, 1991). Uma possível hipótese desse resultado no cérebro, pode ser devido ao fato de que este é um órgão que está propenso a sofrer danos oxidativos frente a um excesso de EROs, pois existe um elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados nas suas membranas celulares, associada à uma elevada taxa metabólica e à baixos níveis de enzimas antioxidantes (Oruc e Uner, 2004; Balu et al., 2005).

O processo de dano oxidativo em músculos de *S. rhombeus* do rio Xingu foi evidente, a priori, um resultado não esperado. O mesmo foi observado em músculo de *P. nigricans* do rio Itacaiunas. Sugere-se que estes resultados nos músculos possam estar associados ao modo de vida dessas duas espécies, pois os peixes da família Serrasalmidae, que se encaixam na categoria de espécies ativas, possuem uma elevada proporção de músculos vermelhos e a espécie *P. nigricans* apresenta fibras musculares oxidativas, semelhante ao músculo vermelho e de contração lenta (Almeida Val et al., 2005). O músculo vermelho é composto por lipídios na forma de fosfolipídios e colesterol, que são os componentes essenciais das membranas celulares e mitocôndrias, mas abrange muito mais lipídios na forma de triacilgliceróis, que são o principal modo em que a forma energética é estocada, tais componentes apresentam ácidos graxos altamente insaturados e que são fortemente suscetíveis ao processo oxidativo (Gonçalves e Soares, 1998). Associado aos fatores supracitados, uma outra possível explicação para danos em músculos de *S. rhombeus* do rio Xingu, pode estar relacionada a um maior estoque de gordura associado à atividade em busca de alimento no período seco, o que pode ter favorecido ao aumento dos níveis de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas das células musculares provocando à lipoperoxidação. As coletas do presente estudo foram realizadas no período seco e neste período segundo Ferreira et al., (2014) as presas se concentram no canal principal do rio tornando-se dessa forma mais disponíveis para os predadores, aumentando a diversidade e a abundância dos itens alimentares e colaborando para uma maior atividade alimentar dos peixes carnívoros como as piranhas. Em um trabalho realizado no açude Lima Campo,

Icó Ceará, verificou-se que a espécie *S. rhombeus* se alimenta melhor no verão diferentemente do que ocorre em outras espécies de peixe (Braga, 1954). Constatou-se através do índice de repleção que o período de maior atividade alimentar no peixe *Serrasalmus maculatus* foi nas estações quentes do ano (Villares Junior et al., 2008). Um outro estudo demonstrou que os estômagos das espécies *Pygocentrus nattereri* e *Serrasalmus marginatus* foram significativamente mais pesados durante a estação seca para ambas as espécies de piranhas e associaram este resultado ao fato da atividade alimentar ter sido mais intensa neste período (Ferreira et al., 2014).

### **Conclusão**

Uma abordagem usando vários tecidos de peixes de distintos níveis tróficos para avaliar a influência de locais com diferentes níveis de poluição nas respostas dos biomarcadores bioquímicos, pode providenciar uma visão mais integrada e complementar da saúde dos organismos. Os resultados demonstraram respostas espécie-específicas e tecido-específicas. Ao incluir *P. nigricans* em programas de monitoramento ambiental essa espécie pode ser considerada mais sensível a uma mistura complexa de químicos ambientais do que *S. rhombeus*. Já, a espécie topo de cadeia *S. rhombeus*, em geral, parece ter uma plasticidade maior em relação aos diferentes níveis de poluição, quando avaliada com base nos biomarcadores selecionados neste estudo. Tais achados sugerem que, frente aos endpoints selecionados para a análise, *P. nigricans* seja mais sensível e que seja um bom organismo de escolha em estudos de monitoramento ambiental.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a todos os colegas que ajudaram nas amostragens e no processamento das amostras de peixes. A FAPESPA pela concessão da bolsa de estudo. Ao ICMBIO, pela licença para a realização da pesquisa concedida nas áreas de estudo. Ao ICMBIO e Norte Energia pelo apoio logístico de campo.

### **Referências**

Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch)

is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1523, 37-48.

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*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 140, 356 – 363.

Almeida-Val, V.M.F., Gomes, A.R.C., Lopes, N.P., 2005. Metabolic and physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fish of the Amazon. In: Kappor, B.G., Val, A.L. (Org.). *The physiology of Tropical Fish.*: Elsevier, 21, 443-500.

Anderson, M. J., Gorley, R. N. & Clarke, K. R., 2008. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide 435 to software and statistical methods. Primer-E, Plymouth, U.K.

Andersson, T., Förlin, L., 1992. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquatic Toxicology*. 24, 1-20.

Andrade, A.C.B. Biomarcadores histopatológicos e concentração de Hg em piranhas (*Serrasalmus rhombeus*) e sedimento de fundo na avaliação da qualidade ambiental de uma região de mineração da Amazônia, Brasil. 42f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2013.

Almeida, V.L.L., Hahn, N.S., Agostinho, C.S., 1998. Stomach contents of juvenile and adult piranhas (*Serrasalmus marginatus*) in the Paraná floodplains, Brazil. *Stud Neotrop Fauna & Environm.* 33, 100–105.

Amado, L.L., Rosa, C.E., Leite, A.M., Moraes, L., Pires, W.V., Pinho, G., Martins, C.M.G., Robaldo, R.B., Nery, L.E.M., Monserrat, J.M., Bianchini, A., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., 2006a. 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*. 52, 199-206.

Amado, L.L., Robaldo, R.B., Geracitano, L., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2006b. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Marine Pollution Bulletin*. 52, 207-213.

Amado, L. L.; Longaray Garcia, M.; Ramos, P. B.; Freitas, R. F.; Zafalon, B.; Ribas Ferreira, J. L. Yunes, J. S.; Monserrat, J. M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*. 407, 2115-2123.

Akagi, H., Naganuma, A., 2000. Human exposure to Mercury and the accumulation of methylmercury that is associated with gold mining in the Amazon Basin, Brazil. *J Health Sci*. 46, 323-8.

Aula, I., Braunschweiler, H., Malin, I., 1995. The watershed flux of mercury examined with indicators in the Tucuruí reservoir in Pará Brazil. *The Science of the Total Environment*. 175, 97-107.

- Bainy, A.C.D., 1996. Antioxidant defenses and mechanism of protection against oxygen radicals, in: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. INPA, Manaus. pp. 331-335.
- Balu, M., Sangeetha, P., Haripriya, D., Panneerselvam, C., 2005. Rejuvenation of the antioxidant system in the central nervous system of aged rats by grape seed extract. *Neurosci. Lett.* 383, 295–300.
- Barthem, R. B., Fabré, N.N. *Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da amazônia*. In: Ruffino, M.L. (Org.). *A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia Brasileira*. Manaus: Provárzea. 2004, v. p. 17-51.
- Barthem, R.B., Ribeiro, M.C.L.B., Petrere, J.R.M., 1991. Life strategies of some long distance migratory catfishes in face of hidroelectric dams in the Amazon Basin. *Biological Conservation, Essex.* 55, 339-345.
- Baatrup, E., 1990. Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 100, X3-257.
- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S.J, Willmore, W.G., 2017. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish Fish.* 00, 1–15.
- Braga, R.A., 1954. Alimentação de pirambema, *Serrasalmus rhombeus* (L., 1766) Lacépède, 1803, no açude Lima Campos, Icó, Ceará (Ostariophysi, Characidae, Serrasalmidae). *Rev. Brasil. Biol.* 14, 477-792.
- 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. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 21, 61–69.
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in na urban stream. *Neotropical Ichthyology.* 5, 327-336.
- Castro, R.M.C., VARI, R.P., 2003. Prochilodontidae (Fannel mouth characiforms). p. 65-70. In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil.
- Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill tissue recovery after Cooper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus Scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 83–91.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R. J., Winston, G.W., Jewell, C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmenral Toxicology and Chemistry.* 8, 1103-1 123.
- Dórea, J.G., Barbosa, A., Souza, J., Fadini, P., Jardim, W.F., 2004. Piranhas (*Serrasamus* spp.) as markers of mercury bioaccumulation in amazon ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 59, 57-63.
- Duarte, I.A., Reis-Santos, P., França, S., Cabral, H., Fonseca, V. F. 2017. Biomarker responses to environmental contamination in estuaries: A comparative multi-taxa approach. *Aquatic Toxicology.* 189, 31–41.

- Dupuy, C., Galland, C., Pichereau, V., Sanchez, W., Riso, R., Labonne, M., Amara, R., Charrier, G., Fournier, M., Laroche, J., 2015. Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Marine Pollution Bulletin*. 95, 634–645.
- 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. *Physiol Ver.* 85, 97–177.
- Farombi, E.O., Adelowo, O.A., Ajimoko, Y.R., 2007. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 4, 158-165.
- Fearnside, P. M., 2001. Environmental impacts of Brazil's Tucuruí Dam: Unlearned lessons for hydroelectric development in Amazonia. *Environmental Management* (New York), New York. 27, 377-396.
- Ferreira, F.S., Vicentin, W., COSTA, F.E.S., Suárez, Y.R., 2014. Trophic ecology of two piranha species, *Pygocentrus nattereri* and *Serrasalmus marginatus* (Characiformes, Characidae), in the floodplain of the Negro River, Pantanal. *Acta Limnologica Brasiliensia*. 26, 381-391.
- Fraga, C. G., Cavanagh, E., Fernando, C., Lotito, S., Lucesoli, F., Oteiza, P.I., 1996. Antioxidant defenses and mechanism of protection against oxygen radicals, in: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. INPA, Manaus. pp. 323-330.
- Freitas, C.E., Siqueira-Souza, F.K., 2009. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. *Revista Agrogeoambiental*. 1, 39-45.
- Fonseca, V.F., França, S., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquat.Toxicol.* 102, 216–227.
- Galarza, M.A., Macambira, M.J.B., Villas, R.N.N., 2008. Dating and Isotopic Characteristics (Pb and S) of the Fe Oxide-Cu-Au-U-REE Igarapé Bahia Ore Deposit, Carajás Mineral Province, Pará State, Brazil. *Journal of South American Earth Sciences*. 25, 377-397.
- Gallagher, E.P., Canadá, A.T., Di Giulio, R.T., 1992. The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquatic Toxicology*. 23, 155-168.
- Gonçalves, A.A., Soares, L.A.S., 1998. Lípidios em peixes. *Vetor*. 8, 35-53.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 246, 7130–7139.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assay for differentiation of glutathione-S-transferases. *Methods in Enzymology*. 77, 398-405.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, USA.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of the lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine*. 19, 271-280.
- Ippolito, A., Giacchini, R., Parenti, P., Vighi, M., 2016. Natural variability of enzymatic biomarkers in freshwater invertebrates. *Environ Sci Pollut Res*. 24, 732-742.
- Junk, W. J., Melo, J. A. S., 1990. N. Impactos ecológicos das represas hidrelétricas na bacia amazônica brasileira. *Estudos Avançados*. 4, 126-143.
- Kasper, D., Palermo, E.F.A., Branco, C.W.C., Malm, O., 2012. Evidence of elevated mercury levels in carnivorous and omnivorous fishes downstream from an Amazon reservoir. *Hydrobiologia*. 694, 87-98.
- Kasper, D., Forsberg, B.R., Amaral, J.H.F., Leitão, R.P., PY-Daniel, S.S., Bastos, W.R., Malm, O., 2014. Reservoir Stratification Affects Methylmercury Levels in River Water, Plankton, and Fish Downstream from Balbina Hydroelectric Dam, Amazonas, Brazil. *Environmental Science & Technology*, v. 48, p. 1032-1040, 2014.
- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, F., Amara, R., 2011. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour?. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 154, 187–195.
- Klein, C., Ladeira, E.A., 2002. Petrography and Geochemistry of the least altered banded iron-formations of the of the Archean Carajás Formation, northern Brazil. *Economic Geology and the Bulletin of the Society of Economic Geologists*. 97, 643-651.
- Lacerda, L. D., Bidone, E. D., Guimaraes, A. F., and Pfeiffer, W. C., 1994. Mercury concentrations in fish from the Itacaiunas Parauapebas River System, Carajas Region, Amazon. *An. Acad. Bras. Ci.* 66,373- 379.
- Li, J., Quabius, E.S., Wendelaar Bonga, S., Flik, G., Lock, R.A.C., 1998. Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquat. Toxicol.* 43, 1–11.
- Martinez, C.B.R., Souza, M.M., 2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comp. Biochem. Physiol., A* 133, 151– 160.
- Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2004. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.* 64, 797– 807.
- Mazon, A.F., Fernandes, M.N., 1999. Toxicity and Differential Tissue Accumulation of Copper in the Tropical Freshwater Fish, *Prochilodus scrofa* (*Prochilodontidae*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 797—804.

- Mieiro, C. L., Ahmad, I., Pereira, M.E., Duarte, A.C., Pacheco, M., 2010. Antioxidant system breakdown in brain of feral golden grey mullet (*Liza aurata*) as an effect of mercury exposure. *Ecotoxicology*. 19, 1034–1045.
- Merona, B., Santos, G.M., Almeida, R.G., 2000. Short term effects of Tucuruí dam (Amazonia, Brazil) on the trophic organization of fish communities. *Environmental Biology of Fishes*, Holanda. 60, 375-392.
- Miller, M.R, Hinton, D.E., Stegeman, J.J., 1989. Cytochrome P-450E induction and localization in gill pillar (endothelial) cells of scup and rainbow trout. *Aquatic Toxicology*. 14, 307-322.
- Mol, J.H., 2006. Attacks on humans by the piranha *Serrasalmus rhombeus* in Suriname. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 41, 189–195.
- Montes, C.S. Uso integrado de biomarcadores para o monitoramento dos efeitos de metais em *Serrasalmus rhombeus* provenientes de rios Amazônicos. 109f. Tese (Doutorado em Ecologia Aquática e Pesca) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2016.
- Monserrat, J.M., Geracitano, L.A., Pinho, G.L.L., Vinagre, T.M., Faleiros, M., Alciati, J.C., Bianchini, A., 2003. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylene Orange complex formation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 45, 177–183.
- Newman, M.C., 2015. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Ann Arbor Press, Chelsea, USA.
- Olson, k., 2002. Gill circulation: regulation of perfusion distribution and metabolism of regulatory molecules. *Journal of experimental Zoology*. 293, 320–335.
- Oruc, E.O., Uner, Y.S.N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 137, 43–51.
- 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.
- Pietrapiana, D., Modena, M., Guidetti, P., Falugi, C., Vacchi, M., 2002. Evaluating the genotoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish species: a case study in the Ligurian Sea (NW-Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin*. 44, 238–243.
- Porto, J.I.R., Araújo, C.S.O., Feldberg, E., 2005. Mutagenic effects of Mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*. Nº 97. p. 287-292.
- Porvari, P., 1995. Mercury levels of fish in Tucuruí hydroelectric reservoir and in River Moju in Amazonia, in the state of Pará, Brazil. *Sci. Total Environ*. 175, 109-117.

- Ribeiro, D.R.G., Faccin, H., Molin, T.R.D., De Carvalho, L.M., Amado, L.L., 2017. Metal and metalloid distribution in different environmental compartments of the middle Xingu River in the Amazon, Brazil. *Science of The Total Environment*, 605-606, 66-74.
- Rocha, M.S., Ribeiro, F.R.V., 2010. A new species of *Pimelodus* LaCépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) from rio Itacaiunas, rio Tocantins basin, Brazil. *Zootaxa*. 2343, 57-65.
- Roman, A.P.O. *Biologia reprodutiva e dinâmica populacional de Hypancistrus Zebra* ISBRÜCKER & NIJSSEN, 1991 (Siluriformes, Loricariidae), no rio Xingu, Amazônia brasileira. 104f. Tese (Doutorado em Ecologia Aquática e Pesca) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2011.
- Roulet, M., Lucotte, M., Farella, N., Serique, G., Coelho, H., Sousa Passos, C. J., Silva, J. D.E., Andrade, P.S., Mergler, D., Guimarães, J.R.D., Amorim, M., 1999. Effects of recent human colonization on the presence of Mercury in Amazonian ecosystems. *Water Air Soil Poll* 1999: 112: 297–313.
- Santos, G. M.; Jegu, M.; Merona, B. C. de peixes comerciais do baixo rio Tocantins; projeto Tucuruí. Manaus, ELETRONORTE/CNPqIINPA, 1984.
- Santos, L.N., Muller, R.C.S., Sarkis, J.E.S., Alves, C.N., Brabo, E. S., Santos, E.O., Bentes, M.H.S., 2000. Evaluation of total mercury concentrations in fish consumed in the municipality of Itaituba, Tapajós River Basin, Pará, Brazil. *The Science of the Total Environment*. 261, 1-8.
- Sioli, H. *Hydrochemistry and geology in the Brazilian Amazon region*. Amazoniana. v.1, p.74-83, 1984.
- Solé, M., Rodríguez, S., Papiol, V., Maynou, F., Cartes, J.E., 2009. Xenobiotic metabolismo markers in marine fish with different trophic strategies and their relationship to ecological variables. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 149, 83–89.
- Souza-Araujo, J. S., Giarrizzo, T., Lima, M.O., Souza, M.B.G., 2016. Mercury and methyl mercury in fishes from Bacajá River (Brazilian Amazon): evidence for bioaccumulation and biomagnification. *Journal of Fish Biology*, 1, 1-15.
- Souza-Filho, P. W. M.; Nascimento JR, W.R., Versiani de Mendonça, B.R., Silva JR, R.O., Guimarães, J.T.F., Dall’agnol, R., Siqueira, J. O., 2015. Changes in the land cover and land use of the Itacaiunas River watershed, arc of deforestation, Carajas, southeastern Amazon. *ISPRS - International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, v. XL-7/W3, p. 1491-1496.
- Trujillo-Jiménez, P., Sedeño-Díaz, J.E., Camargo, J.A., Elías, J.A., López-López, E., 2011. Assessing environmental conditions of the Río Champotón (México) using diverse indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). *Ecological Indicators*. 11, 1636-1646.
- Winemiller, K.O., McIntyre, P.B., Castello, L., Fluet-Chouinard, E., Giarrizzo, T., Nam, S., Baird, I.G., Darwall, W., Lujan, N. K., Harrison, I. Stiassny, M. L. J. Silvano, R. A.

- M. Fitzgerald, D. B. Pelicice, F. M. Agostinho, A. A. Gomes, L. C. Albert, J. S. Baran, E. Petrere, M. Zarfl, C. Mulligan, M. Sullivan, J. P. Arantes, C. C. Sousa, L. M. Koning, A. A., Hoeninghaus, D.J., Sabaj, M., Lundberg J.G., Armbruster, J., Thieme, M.L., Petry, P., 2016. Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong. *Science* (New York, N.Y.). 351, 128-129.
- Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Fonseca, V.F., França, S., Vasconcelos, R.P., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2012. Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese. *Ecological Indicators*. 19, 215-225.
- Taylor, E.W., Beaumont, M.W., Butler, P.J., Mujallid, M.S.I., 1996. Lethal and sub-lethal effects copper upon fish: a role for ammonia toxicity. In: Taylor, E.W. (Ed.), *Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Cellular and Molecular Approaches*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 85 –113.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149.
- Viana, A.P., Lucena, F.F., Montes, C. S., Rocha, R.M., 2013. Fish histopathology and catalase activity as biomarkers of the environmental quality of the industrial district on the Amazon estuary, Brazil - *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 35, 395-401.
- Villares Junior, G.A., Gomiero, L.M., Goitein, R., 2008. Alimentação de *Serrasalmus maculatus* (Kner, 1858) (Characiformes; Serrasalminidae) no trecho inferior bacia do rio Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Acta Sci. Biol. Sci.* 30, 267-273.
- Wilcke, W., Amelung, W., Martius, C., Garcia, M.V.B., Zech, W., 2000. Biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Amazonia forest. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 163, 27-30.
- Wilhelm Filh, D., Giulivi, C., Boveris, A. 1995. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 2879-82.
- Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, Jr A.J., Fong, J.H., Blanchard, K.A., 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic Biol Med.* 24, 480–93.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*. 19, 137-161.

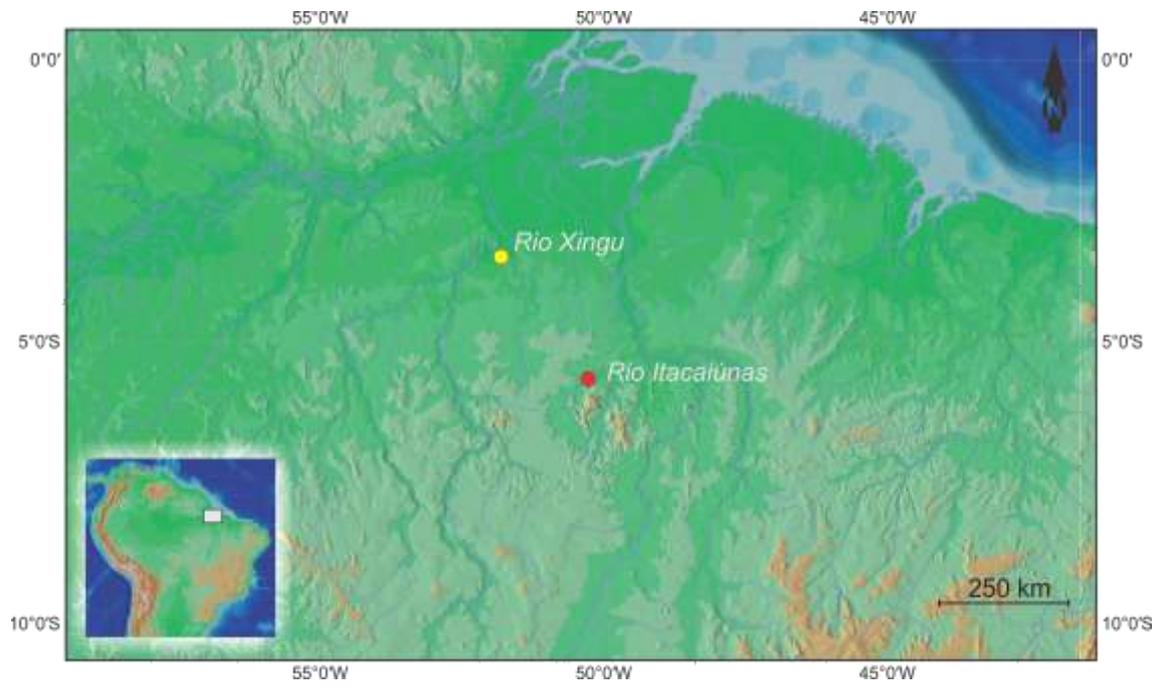
## FIGURE CAPTIONS

**Fig. 1.** Mapa da área de estudo que indica os dois rios estudados no presente estudo, com o ponto vermelho indicando o rio Itacaiunas e amarelo, indicando o rio Xingu.

**Fig. 2.** Análise de coordenadas principais (PCO) (a) e PCO em centroides (b) de respostas biomarcadoras de cérebro (vermelho), fígado (laranja), brânquia (azul) e músculo (verde) para *Serrasalmus rhombeus* (triângulo) e *Prochilodus nigricans* (círculo) de Itacaiunas (forma fechada) e Xingu (forma aberta) na estação seca.

**Fig. 3.** Análise de coordenadas principais (PCO) de respostas de biomarcadores de cérebro (vermelho), fígado (laranja), brânquia (azul) e músculo (verde) para *Serrasalmus rhombeus* (triângulo) (a, b, c e d) e *Prochilodus nigricans* (círculo) (e, f, g e h) de Itacaiunas (forma fechada) e Xingu (forma aberta) na estação seca.

**Fig. 4.** Respostas de biomarcadores em cada órgão alvo (cérebro, fígado, brânquia e músculo) de *S. rhombeus* (a, b e c) e *P. nigricans* (d, f e g) coletados em período seco no rio Itacaiunas e Xingu (histogramas preto e branco, respectivamente). Histograma com média e erro padrão de respostas de biomarcadores: atividades de glutathione S-transferase (GST), capacidade contra radicais de peróxido (ACAP) e peroxidação lipídica (LPO). O número em cima do histograma significa o número analisado de cada biomarcador por amostra. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os rios, a ausência indica que não foram observadas diferenças significativas. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes nos testes post hoc, entre os vários órgãos testados para cada rio.

**Fig. 1.**

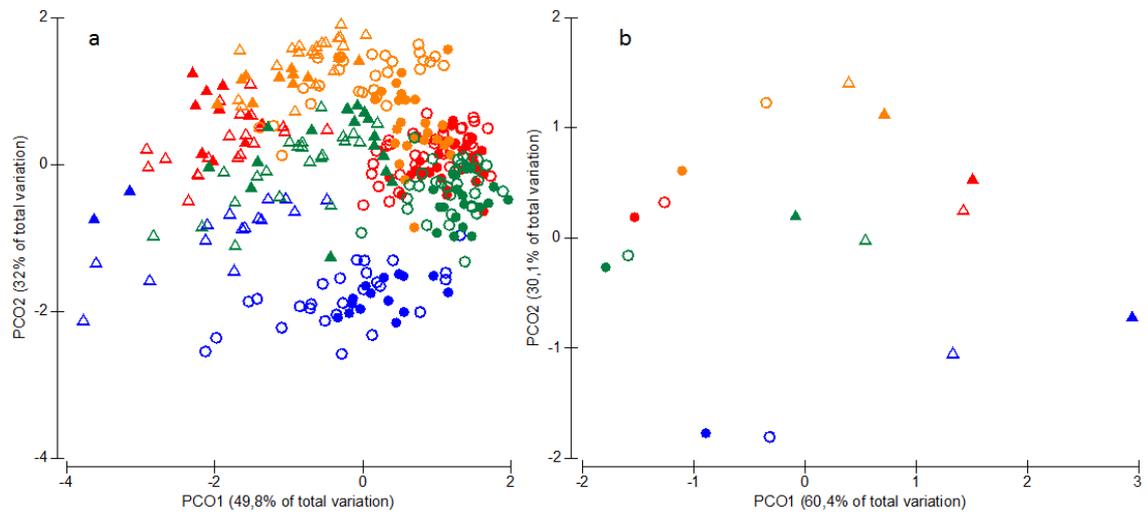
**Fig. 2.**

Fig. 3.

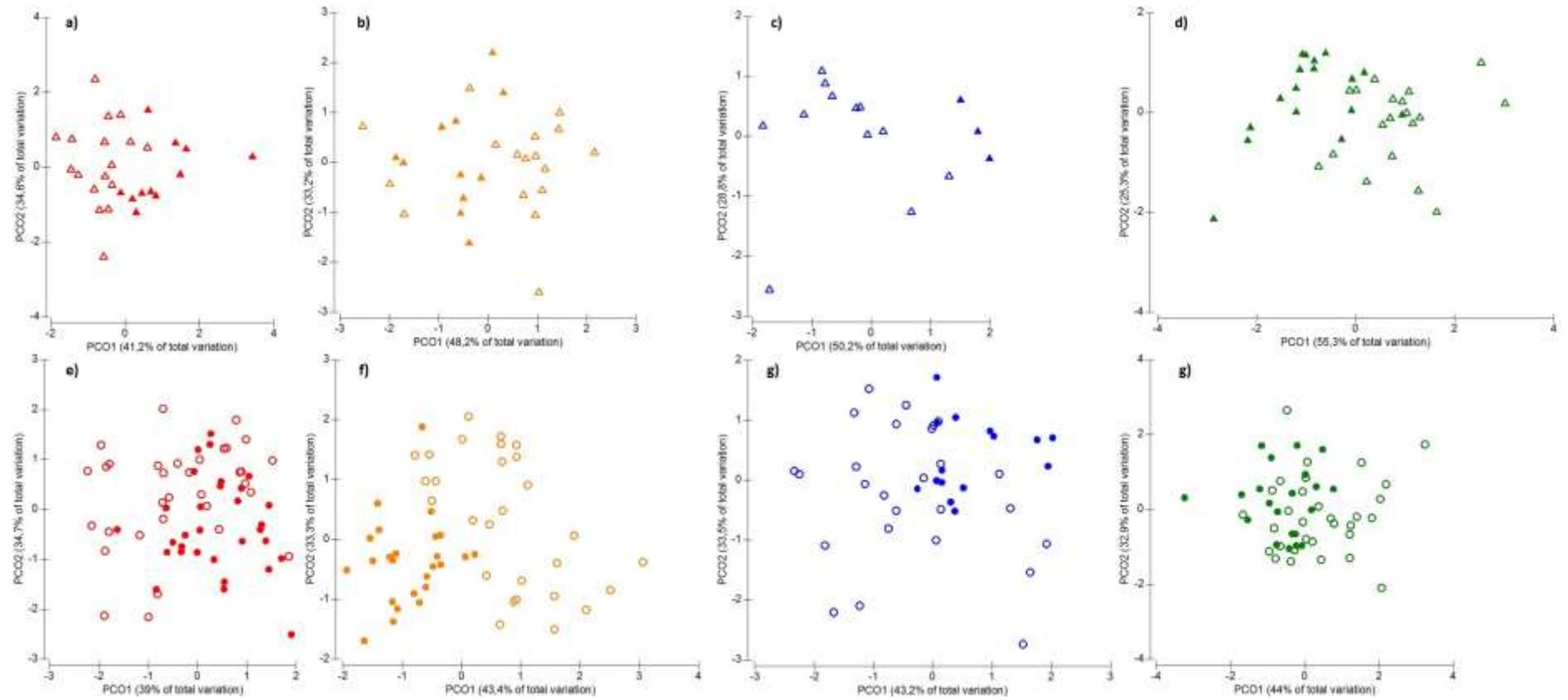
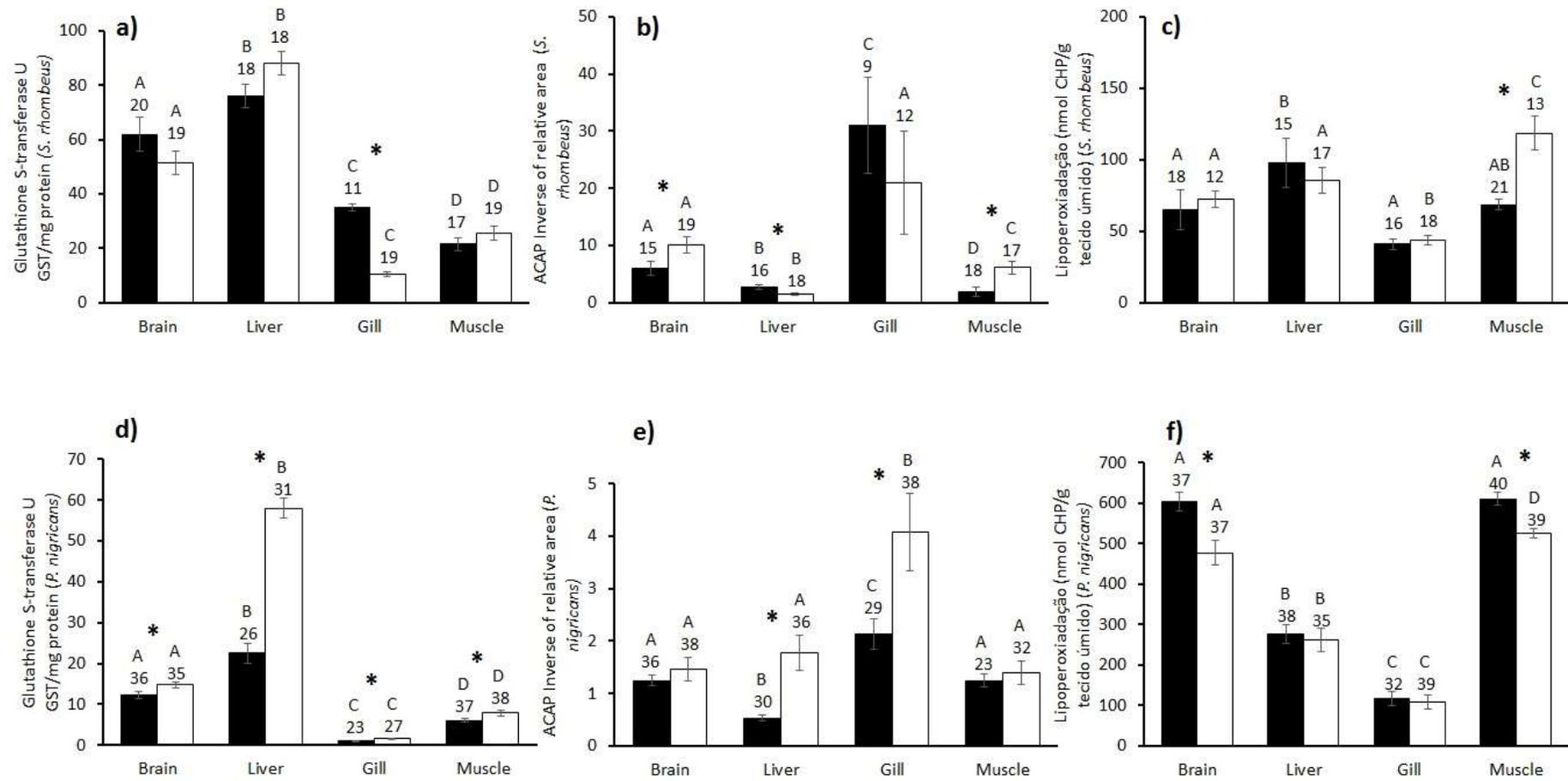


Fig. 4.



## LISTA DE TABELAS

TABELA I: Resumo dos testes de PERMANOVA de dois fatores para testar os efeitos dos fatores espécies (Sp, fixo, 2 níveis), rios (Ri, fixo, 2 níveis) e tecidos (Te, fixo, 4 níveis), do rio Itacaiunas e Xingu no seco estação.

TABELA II: Resumo do teste de PERMANOVA de dois fatores para avaliar o efeito do fator rio (Ri, fixo, 2 níveis) de *P. nigricans* e *S. rhombeus*, do rio Itacaiunas e Xingu na estação seca.

TABELA III: Resultados para a comparação da atividade de glutathione-S-transferase, Capacidade Antioxidante Total e peroxidação lipídica entre rios para cada órgão (cérebro, fígado, brânquias e músculo) de *S. rhombeus* e *P. nigricans*. As interações entre os rios foram baseadas em testes Pairwise, valor P com base em PERMANOVA (perm). Resultados significativos estão em negrito.

TABELA IV: Resultados para a comparação da atividade da glutathione-S-transferase, capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica entre cérebro, fígado, brânquias e músculos em *P. nigricans* e *S. rhombeus* para cada rio. As interações entre órgãos foram baseadas em testes Pairwise, valor P com base em PERMANOVA (perm). Resultados significativos estão em negrito.

TABELA I.

<b>Biomarcadores</b>	<b>d.f.</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>Pseudo- F</b>	<b>p-value</b>
Sp	1	250.98	250.98	311.70	<b>0.001</b>
Te	3	185.66	61.89	76.86	<b>0.0001</b>
Ri	1	2.74	2.74	3.40	<b>0.02</b>
Sp v. Te	3	41.74	13.91	17.28	<b>0.0001</b>
Sp v. Ri	1	9.89	9.89	12.28	<b>0.0001</b>
Ri v. Te	3	14.09	4.70	5.83	<b>0.0001</b>
Sp v. Ri v. Te	3	29.95	9.98	12.40	<b>0.0001</b>
Residual	311	250.41	0.81		
<b>Total</b>	<b>326</b>	<b>978.00</b>			

TABELA II.

Source	d.f.	SS	MS	Pseudo- <i>F</i>	p-value
<i>P. nigricans</i>					
Ri	1	18.97	18.97	6.49	<b>0.001</b>
Residual	208	608.03	2.92		
Total	209	627.00			
<i>S. rhombeus</i>					
Ri	1	17.39	17.39	6.07	<b>0.001</b>
Residual	105	300.61	2.86		
Total	106	318.00			

TABELA III.

PAIR-WISE TESTS								
Comparação entre rios	<i>Serrasalmus rhombeus</i>				<i>Prochilodus nigricans</i>			
	t	P (perm)	Unique perms	P (MC)	t	P (perm)	Unique perms	P (MC)
<b>Glutathiona S-transferase</b>								
Itac_brain vs Xing_brain	1.030	0,329	997	0,332	2.653	<b>0,009</b>	998	0,013
Itac_liver vs Xing_liver	1.696	0,092	999	0,102	9.414	<b>0,001</b>	996	0,001
Itac_gill vs Xing_gill	13.200	<b>0,001</b>	996	0,001	4.011	<b>0,001</b>	998	0,001
Itac_muscle vs Xing_muscle	1.411	0,161	996	0,169	2.133	<b>0,034</b>	999	0,034
<b>Capacidade Antioxidante Total</b>								
Itac_brain vs Xing_brain	2.330	<b>0,031</b>	995	0,025	0.172	0,879	998	0,865
Itac_liver vs Xing_liver	2.835	<b>0,016</b>	996	0,01	4.053	<b>0,001</b>	996	0,001
Itac_gill vs Xing_gill	1.778	0,108	994	0,098	2.058	<b>0,043</b>	996	0,032
Itac_muscle vs Xing_muscle	4.591	<b>0,001</b>	996	0,001	0.147	0,898	998	0,863
<b>Lipoperoxidação</b>								

Itac_brain vs Xing_brain	1.512	0,146	997	0,148	3.313	<b>0,002</b>	998	0,003
Itac_liver vs Xing_liver	0.456	0,65	997	0,652	1.127	0,266	997	0,26
Itac_gill vs Xing_gill	0.663	0,511	998	0,512	1.536	0,148	997	0,123
Itac_muscle vs Xing_muscle	4.739	<b>0,001</b>	995	0,001	4.351	<b>0,001</b>	997	0,001

---

TABELA IV.

PAIR-WISE TESTS	<i>Serrasalmus rhombeus</i>				<i>Prochilodus nigricans</i>			
	t	P (perm)	Unique perms	P (MC)	t	P (perm)	Unique perms	P (MC)
Comparação entre tecidos								
<b>Glutathione S-transferase</b>								
Itac_brain vs Itac_liver	1.953	<b>0,056</b>	995	0,054	4.233	<b>0,001</b>	998	0,003
Itac_brain vs Itac_gills	3.119	<b>0,006</b>	996	0,004	22.187	<b>0,001</b>	999	0,001
Itac_brain vs Itac_muscle	5.928	<b>0,001</b>	998	0,001	8.086	<b>0,001</b>	998	0,001
Itac_liver vs Itac_gills	6.815	<b>0,001</b>	998	0,001	18.902	<b>0,001</b>	994	0,001
Itac_liver vs Itac_muscle	7.993	<b>0,001</b>	996	0,001	10.228	<b>0,001</b>	999	0,001
Itac_gill vs Itac_muscle	3.182	<b>0,003</b>	996	0,002	16.755	<b>0,001</b>	997	0,001
Xing_brain vs Xing_liver	5.894	<b>0,001</b>	997	0,001	21.472	<b>0,001</b>	999	0,001
Xing_brain vs Xing_gills	14.982	<b>0,001</b>	994	0,001	29.660	<b>0,001</b>	996	0,001
Xing_brain vs Xing_muscle	5.878	<b>0,001</b>	996	0,001	7.532	<b>0,001</b>	996	0,001
Xing_liver vs Xing_gills	24.751	<b>0,001</b>	999	0,001	52.421	<b>0,001</b>	999	0,001
Xing_liver vs Xing_muscle	11.980	<b>0,001</b>	996	0,001	22.616	<b>0,001</b>	996	0,001

Xing_gill vs Xing_muscle	7.463	<b>0,001</b>	997	0,001	13.307	<b>0,001</b>	999	0,001
<b>Total antioxidant capacity</b>								
Itac_brain vs Itac_liver	3.907	<b>0,001</b>	997	0,001	6.999	<b>0,001</b>	997	0,001
Itac_brain vs Itac_gills	5.646	<b>0,001</b>	995	0,001	2.858	<b>0,003</b>	997	0,012
Itac_brain vs Itac_muscle	4.927	<b>0,001</b>	996	0,001	6.886	0,944	996	0,942
Itac_liver vs Itac_gills	8.732	<b>0,001</b>	997	0,001	6.857	<b>0,001</b>	994	0,001
Itac_liver vs Itac_muscle	2.464	<b>0,021</b>	996	0,027	5.973	<b>0,001</b>	997	0,001
Itac_gill vs Itac_muscle	7.969	<b>0,001</b>	996	0,001	2.384	<b>0,018</b>	997	0,018
Xing_brain vs Xing_liver	8.531	<b>0,001</b>	999	0,001	0.423	0,669	997	0,661
Xing_brain vs Xing_gills	0.713	0,495	999	0,471	4.077	<b>0,001</b>	992	0,001
Xing_brain vs Xing_muscle	2.333	<b>0,026</b>	998	0,034	4.892	0,961	996	0,968
Xing_liver vs Xing_gills	5.864	<b>0,001</b>	998	0,001	3.350	<b>0,005</b>	998	0,005
Xing_liver vs Xing_muscle	5.450	<b>0,001</b>	994	0,001	0.455	0,645	995	0,652
Xing_gill vs Xing_muscle	2.155	<b>0,026</b>	996	0,039	3.947	<b>0,001</b>	996	0,001
<b>Lipid peroxidation</b>								
Itac_brain vs Itac_liver	2.257	<b>0,025</b>	999	0,032	9.485	<b>0,001</b>	999	0,001
Itac_brain vs Itac_gills	1.180	0,265	997	0,268	16.816	<b>0,001</b>	995	0,001
Itac_brain vs Itac_muscle	1.753	0,106	997	0,09	0.627	0,564	996	0,524

Itac_liver vs Itac_gills	4.419	<b>0,001</b>	997	0,002	7.414	<b>0,001</b>	997	0,001
Itac_liver vs Itac_muscle	1.583	0,118	995	0,125	11.272	<b>0,001</b>	997	0,001
Itac_gill vs Itac_muscle	5.209	<b>0,001</b>	997	0,001	19.346	<b>0,001</b>	998	0,001
Xing_brain vs Xing_liver	0.490	0,63	998	0,651	5.453	<b>0,001</b>	998	0,001
Xing_brain vs Xing_gills	4.384	<b>0,001</b>	997	0,001	11.687	<b>0,001</b>	996	0,001
Xing_brain vs Xing_muscle	3.328	<b>0,001</b>	994	0,003	2.306	<b>0,023</b>	997	0,022
Xing_liver vs Xing_gills	3.911	<b>0,001</b>	999	0,001	5.880	<b>0,001</b>	995	0,001
Xing_liver vs Xing_muscle	2.118	<b>0,058</b>	996	0,047	8.071	<b>0,001</b>	995	0,001
Xing_gill vs Xing_muscle	8.183	<b>0,001</b>	996	0,001	14.624	<b>0,001</b>	997	0,001

---

### **CAPÍTULO 3**

---

#### **Peixes parasitados de um rio poluído estão mais suscetíveis ao estresse oxidativo? Uma abordagem em vários tecidos**

**Sarita Nunes Loureiro, LÍlian Lund Amado, Tommaso Giarrizzo**

Artigo será submetido para a publicação no periódico *Fish and Shellfish Immunology*.

## Peixes parasitados de um rio poluído estão mais suscetíveis ao estresse oxidativo? Uma abordagem em vários tecidos

Sarita Nunes Loureiro <sup>a,b,c</sup>, Lílian Lund Amado <sup>a,b</sup>, Tommaso Giarrizzo <sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Ecotoxicologia, Laboratório de Pesquisa em Monitoramento Ambiental Marinho, Universidade Federal do Pará, Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá, Terra Firme, 66075110 Belém, Pará, Brazil.

<sup>c</sup> Laboratório de Biologia Pesqueira – Manejo dos Recursos Aquáticos (UFPA), Av. Perimetral 2651, Terra Firme, 66040170 Belém, Pará, Brazil.

### Resumo

Os ecossistemas aquáticos estão sujeitos à influência de diversos tipos de químicos ambientais. O objetivo deste estudo foi investigar parâmetros de estresse oxidativo no cérebro, fígado, brânquias e músculo em peixes da espécie *Serrasalmus rhombeus* parasitados e não parasitados pelos crustáceos ectoparasitas *Vanamea* sp. (isopoda). Foram capturados 29 indivíduos de *Serrasalmus rhombeus*, sendo 8 parasitados e 21 não parasitados. Os Isópodos foram encontrados exclusivamente nas brânquias. A prevalência do parasitismo foi de 27.5%, a intensidade média 1.13 e a abundância de 0.31. A atividade da GST foi mais elevada no fígado dos peixes parasitados e não parasitados em comparação com outros tecidos analisados. Verificou-se uma maior capacidade antioxidante total (ACAP) nas brânquias dos peixes parasitados e dos peixes não parasitados em comparação aos outros tecidos analisados. Na análise de lipoperoxidação (LPO) houve diferenças entre os peixes parasitados e não parasitados no fígado e no músculo sendo que os peixes parasitados apresentaram um maior conteúdo de lipoperoxidação tanto no fígado quanto no músculo em relação aos peixes não parasitados. Estes resultados indicam que influência do ectoparasitismo associado a uma maior exposição desses organismos aos químicos ambientais biodisponíveis no rio Itacaiunas geram um efeito sinérgico na indução de estresse oxidativo em *S. rhombeus*.

**Palavras-chave:** *S. rhombeus*; *Vanamea* sp; glutathione-S-transferase; capacidade antioxidante total; peroxidação de lipídios; ectoparasita

## **Introdução**

Os ecossistemas aquáticos são expostos a diversos tipos de químicos ambientais (Fonseca et al., 2011; Souza-Araujo et al., 2016; Duarte et al., 2017; Gauvin et al., 2017; Ribeiro et al., 2017). Os xenobióticos biodisponíveis podem ser facilmente absorvidos atingindo órgãos alvo (Bainy, 1996; Fonseca et al., 2011; Duarte et al., 2017). Ao entrarem em contato com os organismos os xenobióticos sofrem processos de biotransformação e provocam mudanças no equilíbrio redox proporcionando o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no interior das células que, dependendo da concentração e tempo de exposição, leva a efeitos negativos para a saúde da biota de diversos ecossistemas aquáticos (Bainy, 1996; Dórea et al., 2004; Newman, 2015; Halliwell e Gutteridge, 2015; Souza-Araujo et al., 2016).

Em adição aos químicos ambientais, os parasitas nos organismos aquáticos funcionam como estressantes naturais podendo afetar também a homeostase de seus hospedeiros (Sures, 2004; Marcogliese e PieTrock, 2011). Algumas pesquisas levaram em consideração o parasitismo, com o objetivo de buscar indicadores de impacto humano no ambiente (Overstreet, 1997; Sures et al., 1999; 2001; 2003). Estudos em peixes de populações naturais têm observado que o parasitismo pode influenciar na biologia reprodutiva e alimentar, crescimento, estrutura e distribuição de algumas espécies de peixes comercialmente e ecologicamente importantes (Barber et al., 2000; Aloo et al., 2004; Fontana et al., 2012).

Desta forma, estudos ecotoxicológicos tem usado medidas de biomarcadores em menor nível de organização biológica, visto que são consideradas ferramentas sensíveis que fornecem sinais e alertam precocemente sobre a exposição e efeitos biológicos nos organismos, frente às condições de estresse associados a uma mistura complexa de xenobióticos e/ou a presença de parasitas (Van der Oost et al., 2003; Marcogliese et al., 2005; Amado et al., 2006a; 2006b; Minguez et al., 2009; Marcogliese et al., 2010; Sures et al., 2017). Pois, além da biodisponibilidade de xenobióticos, o parasitismo influencia as respostas bioquímicas (indução ou supressão nas atividades do sistema antioxidante, tais como, catalase, glutathione redutase, glutathione s-transferase além da verificação de dano oxidativos) e fisiológicas (defesa celular ou regulação endócrina) de seus hospedeiros (Dautremepuits et al., 2002; Marcogliese et al., 2005; Marcogliese et al., 2010).

É crescente o número de trabalhos que tem investigado somente a influência de parasitas ou do efeito combinado do parasitismo e da poluição na saúde de peixes em menor nível de organização celular (bioquímico) (e.g., Belló et al., 2000; Dautremepuits et al., 2003; Horton e Okamura, 2003; Marcogliese et al., 2005; 2010; Frank et al., 2011; 2013; Mozhdeganloo e Heidarpour, 2013). A grande parte dos trabalhos verificou a influência de endoparasitas em peixes e observaram o status da saúde dos peixes focando em apenas um ou dois tecidos no hospedeiro (Belló et al., 2000; Dautremepuits et al., 2002; 2003; Marcogliese et al., 2005). Estudos que avaliaram a influência de crustáceos ectoparasitas Isopoda na saúde dos organismos aquáticos em nível bioquímico avaliaram crustáceos como hospedeiros (Neves et al., 2000; 2004). Já os trabalhos de ectoparasitas Isopodas em peixes são mais relacionados a taxonomia, interação ecológica entre hospedeiro e parasita ou associados às diferentes concentrações de metais entre o parasita e hospedeiro (Carvalho et al., 2004; Lins et al., 2008; Acácio et al., 2012).

Dentro da ordem Isopoda encontram-se os ectoparasitas da família Cymothoidae, que podem ser encontrados nas regiões branquiais, bucais e ao longo do corpo do hospedeiro tanto na forma imatura quanto na forma adulta (Marcogliese e Pietrock, 2011; Loureiro et al., 2012; Tavares-Dias et al., 2014). Os Isopodas possuem o corpo segmentado e dorsoventralmente achatado e exibem garras que são adaptadas para a fixação no hospedeiro (Thatcher, 2007). Alguns estudos sugerem que os Isopodas podem se alimentar das células sanguíneas, epiteliais e mucosas do hospedeiro e algumas vez podem perfurar a pele do hospedeiro (Horton e Okamura, 2003; Carvalho et al., 2004; Thatcher, 2007; Tavares-Dias et al., 2014). Consequentemente, são reportados por afetar a eficiência respiratória, o crescimento normal dos peixes, causar anemia e as lesões expostas podem tornar os peixes mais suscetíveis a infecções secundárias por vírus, fungos e bactérias (Horton e Okamura, 2003; Thatcher, 2007; Ravichandran et al., 2009).

Estudos em rios amazônicos que levaram em consideração a influência de impactos ambientais sobre a ictiofauna tem focado em nível populacional ou nas assembleias de peixes (e.g., Lacerda et al., 1994; Porvari, 1995; Santos et al., 2000; Souza-Araujo et al., 2016; Ribeiro et al., 2017). Um estudo observou efeitos genotóxicos através do teste de micronúcleo no sangue de peixes da espécie

*Prochilodus nigricans*, *Mylossoma duriventris* e *Hoplias malabaricus* e associaram esses efeitos à poluição por mercúrio (Porto et al., 2005). Já em relação ao parasitismo de peixes em ambientes aquáticos amazônicos, a maioria das pesquisas deram ênfase apenas em relação ao parasitismo em algumas espécies de peixes e grande parte da literatura focaram somente na taxonomia do parasita, nos índices parasitários ou nas relações entre parasitas e hospedeiros (Thatcher, 1993; Malta e Varella, 1996; Acácio et al., 2012).

A espécie carnívora *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1766) pertence à ordem Characiformes e família Serrasalminidae (Almeida et al., 1998; Dórea et al., 2004; Mol, 2006). Os peixes dessa espécie servem como fonte de alimento para a comunidade ribeirinha amazônica e podem ser usados como biomonitores de poluição aquática, uma vez que possuem uma ampla distribuição geográfica em várzeas amazônicas, apresentam características ecológicas muito bem conhecidas, são abundantes e de fácil coleta (Santos et al., 1984; Almeida et al., 1998; Castro e Vari, 2003; Dórea et al., 2004; Barthem e Fabré, 2004; Mol, 2006; Freitas et al., 2009; Souza-Araujo et al., 2016).

Nesse contexto, o presente estudo pretende fornecer informações sobre os índices parasitológicos e verificar em nível bioquímico, através do uso de biomarcadores de exposição e de efeito, se a geração de estresse oxidativo em *S. rhombeus* sobre diversos tecidos (brânquias, cérebro, fígado e músculo), pode ou não ser influenciada pela presença do ectoparasita Isopoda *Vanamea* sp. em um rio com histórico de poluição ambiental.

## **Material e métodos**

### Área de estudo

O presente estudo foi realizado no rio Itacaiunas, um local que apresenta uma forte influência de atividades antrópicas. O rio Itacaiunas constitui um típico ecossistema de águas claras da Bacia Amazônica, caracterizado por águas transparentes com baixos compostos orgânicos e baixas cargas de sedimento (Sioli, 1984).

A bacia hidrográfica do rio Itacaiunas está localizada no sudeste da região amazônica, perto da Serra de Carajás uma das maiores províncias de mineração do mundo, explorando minérios de ferro, cobre, manganês, ouro e outros (Lacerda et al.,

1994; Klein & Lacerda, 2002; Galarza et al., 2008; Rocha e Ribeiro, 2010). Elevadas taxas de desmatamento das margens do rio Itacaiunas contribuem para formação de novas paisagens dominadas por pastagens (Souza-Filho et al., 2015). As coletas no rio Itacaiunas foram realizadas em um ponto próximo ao mosaico de conservação de Carajás, Casa PAE, ICMBio, 5°55'44,7"S 50°43'2,6"W.

#### Método de amostragens

As amostragens foram realizadas no período de estiagem, no mês de dezembro de 2013.

Foram capturados 29 indivíduos de *S. rhombeus* no rio Itacaiunas. Os peixes foram coletados em ambientes de remanso e no canal principal do rio. Visando minimizar o efeito de estresse inerentes às capturas dos peixes, as coletas foram padronizadas usando-se anzol para as capturas de *S. rhombeus*.

Imediatamente após a captura, os peixes foram crioanestesiados, posteriormente pesados (com precisão de 0,01g), medidos o comprimento total (com precisão de 0,1 cm), e dissecados para a retirada do músculo, brânquias, fígado e cérebro de cada indivíduo. Em seguida, os tecidos foram acondicionados dentro de criotubos identificados, inseridos em nitrogênio líquido e foram levados até o laboratório e armazenados em ultrafreezer à -80°C até o momento das análises de biomarcadores bioquímicos.

Durante as amostragens foram medidas variáveis físico-química da água na superfície: pH, temperatura e oxigênio dissolvido utilizando uma sonda multiparamétrica HANNA®, modelo HI9828.

#### Coleta e identificação das espécies de ectoparasitos

Em campo, cada espécime de *S. rhombeus* foram examinadas: a superfície externa do corpo, a base das nadadeiras, cavidade bucal e branquial e a parede interna do opérculo para verificar a presença de ectoparasitas crustáceos.

Os crustáceos Isopodas foram removidos dos hospedeiros com pincéis, finos estiletos e pinças e posteriormente inseridos em tubos identificados e foram conservados em etanol 70%. As amostras de parasito foram identificadas utilizando bibliografias específicas de acordo com Araújo (2002) Thatcher (1993; 2006).

#### Biomarcadores de exposição e efeito

### Biomarcadores de exposição

As amostras de cada órgão foram homogeneizadas (1:4, p/v) em tampão Tris-HCl (100 mM), EDTA (2 mM) e MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (5 mM), com pH ajustado para 7,75 (Gallagher, 1992), em diluição específica para cada tecido conforme protocolo padronizado para as espécies em estudo. As amostras foram então processadas em agitador mecânico, tipo Potter, e centrifugadas à 20.000 xg durante 20 min a 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi separado em alíquotas de 200 µL e acondicionado a -80 °C até o momento dos ensaios de atividade da glutathione S-transferase (GST) e da Capacidade antioxidante total (ACAP). Em cada etapa, separaram-se alíquotas adicionais para análise do teor de proteína presentes nos extratos obtidos. A medição do teor de proteínas totais (550 nm) foi efetuada com kit comercial Doles (Ltda, Brasil) baseado no método de Biureto (citrato trissódico 0,114M, carbonato de sódio 0,21M e sulfato de cobre 0,01M). Todas as respostas de biomarcadores foram determinadas em espectrofluorímetro (Victor X3, Perkin Elmer, USA) com leitora de microplacas e cada leitura foi feita em triplicata.

### Determinação da atividade da glutathione-S-transferase (GST)

A determinação da atividade da glutathione S-transferase foi baseada nos métodos propostos nos trabalhos de Habig et al. (1974) e Habig & Jakoby (1981). A metodologia consiste em avaliar a conjugação de 1mM de GSH (Sigma) com 1mM do reagente 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB, Sigma), processo catalisado pela GST. É utilizado o tampão fosfato 0,1 M, pH 7,00 como meio de reação. O complexo conjugado formado possui absorvância máxima em 340 nm (o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) utilizado para a formação do conjugado CDNB-GSH foi 9,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). As leituras foram realizadas em espectrofluorímetro (Victor X3, Perkin Elmer, USA) com leitora de microplacas e cada leitura foi feita em triplicata. Os resultados são expressos em UGST/mg de proteína que representa a quantidade necessária da enzima para conjugar 1 µMol de CDNB/ min/mg de proteína, a 25°C e pH 7,0.

### Determinação da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil

A capacidade antioxidante total foi determinada conforme Amado et al. (2009). Este ensaio é baseado na capacidade total da amostra (enzimática e não enzimática) de capturar os radicais peroxil. A ACAP foi analisada através da determinação da

concentração de espécies ativas de oxigênio (EAO) nas amostras com e sem exposição a um gerador de radicais peroxil. O princípio deste método é que amostras com maior capacidade antioxidante terão menor formação de radicais. Os radicais peroxil foram produzidos por termólise (37°C) do reagente 2'2'-azobis-2-metilpropilamida dihidroclorato (ABAP, 4mM; Sigma-Aldrich) (Winston et al., 1998). As leituras (em triplicata) foram realizadas em leitora de microplaca de fluorescência (485 e 530 para excitação e emissão respectivamente) durante uma hora (Victor X3, Perkin Elmer, USA), em um meio contendo 30 mM de HEPES (pH 7,2), 200 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 µM H<sub>2</sub>DCF-DA com e sem a adição de ABAP. O incremento de fluorescência de cada amostra ao longo de uma hora de leitura foi plotado e a área sob a reta formada foi calculada. A diferença relativa entre as áreas com e sem ABAP foram consideradas como medida da capacidade antioxidante total, onde a maior área significa uma menor capacidade antioxidante, uma vez que uma alta fluorescência foi obtida após adição de ABAP, indicando baixa competência para neutralizar radicais peroxil (Amado et al., 2009). A capacidade antioxidante total foi expressa pelo inverso da área relativa.

Biomarcador de efeito

Lipoperoxidação (LPO) - Ensaio FOX modificado

O conteúdo de lipídeos peroxidados foi determinado segundo o método FOX, descrito por Hermes-Lima et al. (1995) e adaptado por Monserrat et al. (2003). Este ensaio é baseado na oxidação do Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> por hidroperóxidos lipídicos presentes na amostra, em pH ácido. Sob condições de pH ácido o Fe<sup>3+</sup> formado se complexa ao corante laranja de xilenol (Fe III-complexante). As amostras foram homogeneizadas (1:6 p/v) em metanol 100% à frio (4°C). Os homogeneizados foram centrifugados a 1000x g, durante 10 min à 4°C e o sobrenadante foi utilizado para determinação da lipoperoxidação. A presença de hidroperóxidos lipídicos nas amostras é avaliada espectrofotometricamente em 550 nm. O hidroperóxido de cumeno (CHP) (um hidroperóxido lipídico adicionado em concentração conhecida) foi utilizado como padrão. As leituras do ensaio (em triplicata) foram realizadas em leitora de microplaca multimodal (Victor X3, Perkin Elmer, USA). O aumento na absorbância causado pela formação do conjugado Fe<sup>3+</sup>-laranja de xilenol foi registrado a 550 nm após o tempo de incubação específico para cada extrato de tecido (determinado por padronizações

prévias). O conteúdo de peróxidos lipídicos foi expresso como equivalentes de 1nM CHP/g de tecido úmido.

#### Análise estatística

Os índices parasitológicos, tais como prevalência (número de hospedeiros infestados/número de hospedeiros examinados  $\times$  100), intensidade média (número total de parasitas/número de hospedeiros infestados) e abundância (número total de parasitas na amostra / número total de hospedeiros examinados) foram calculados (Bush et al., 1997).

Os dados de comprimento total (CT) e peso de *S. rhombeus* amostrada foram testados quanto a normalidade (teste de Shapiro-Wilks) e homocedasticidade (teste de Levene) das variâncias e a transformação log<sub>10</sub> foi aplicada quando necessário. O Teste t-student ou Mann-Whitney (sempre que a normalidade e/ou homocedasticidade não foram atendidas) foram aplicados para detectar diferenças significativas entre o CT e peso dos peixes parasitados e não parasitados.

O efeito do parasitismo em *S. rhombeus* em nível bioquímico foi avaliado através de uma PERMANOVA univariada. Para tal foi criada uma matriz triangular com a distância Euclidiana dos dados brutos de biomarcadores e 9999 permutações. As hipóteses nulas testadas foram: i) não existe diferença significativa entre os peixes parasitados e não parasitados para um mesmo tecido; ii) não existe diferença significativa entre os tecidos analisados dos peixes parasitados e dos peixes não parasitados. Posteriormente, o teste de comparação a posteriori pair-wise foi aplicado usando a estatística t, objetivando verificar diferenças entre tecidos para uma mesma condição (parasitada ou não parasitada) e diferenças entre peixes parasitados e não parasitados para um mesmo tecido. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão [n].

O nível de significância que foi adotado foi de 0.05 para todos os testes e as análises foram realizadas utilizando os programas Estatística 6.0 e PRIMER v7 (Anderson et al., 2008).

## Resultados

Foram coletados 29 espécimes de *S. rhombeus*, sendo que 8 indivíduos estavam parasitados por ectoparasita Isopoda *Vanamea* sp. e 21 não parasitados. Os peixes parasitados apresentaram um comprimento total médio de  $20,7 \pm 4,85$  cm (média  $\pm$  desvio padrão) variando entre 13,7 e 28,5 cm e com um peso médio de  $224,7 \text{ g} \pm 185$  (média  $\pm$  desvio padrão) variando de 50 e 600 g. Os peixes não parasitados apresentaram um comprimento total médio de  $20,6 \pm 4,12$  cm (média  $\pm$  desvio padrão) variando entre 12,5 e 31,7 cm e com um peso médio de  $192,6 \text{ g} \pm 165$  (média  $\pm$  desvio padrão) variando de 30 e 700 g. Não houve diferença entre o comprimento total ( $F=0.0062$ ;  $p>0.05$ ) e o peso (Mann-Whitney teste-U= 79.5,  $> 0.05$ ) dos peixes parasitados e não parasitados.

No presente estudo, 29% de todos os peixes da espécie *S. rhombeus* examinados tiveram as brânquias infectadas pelo Isopoda ectoparasita *Vanamea* sp. Um total de 9 espécimes de Isopoda ectoparasita *Vanamea* sp. foram coletados. Do total de peixes *S. rhombeus* capturados no rio Itacaiunas 8 foram infectados somente por Isopoda, apresentando uma prevalência de 27,59, abundância média de 0,31 e intensidade média de 1,13.

Na comparação para verificar diferenças entre peixes parasitados e não parasitados em um mesmo tecido observou-se que não houve diferença na atividade da enzima Glutationa-S-transferase (GST) e na capacidade antioxidante total (ACAP) (Tabela 1, Fig. 1a e 1b). Também não foi verificada diferença no LPO de cérebro e brânquias de *S. rhombeus* entre as duas condições (Tabela 1, Fig. 1c).

Contudo, foram verificadas diferenças entre os peixes parasitados e não parasitados em relação ao LPO de fígado e músculo (Tabela 1, Fig. 1c), sendo que os peixes parasitados apresentaram um maior conteúdo de lipoperoxidação tanto no fígado ( $130,86 \pm 24,15$  nmol CHP/g tecido úmido) quanto no músculo ( $105,59 \pm 11,34$  nmol CHP/g tecido úmido) em relação aos peixes não parasitados ( $98,02 \pm 8,06$  nmol CHP/g tecido úmido e  $68,34 \pm 3,74$  nmol CHP/g tecido úmido para fígado e músculo, respectivamente) (Tabela 1, Fig. 1c).

A atividade GST foi maior no fígado dos peixes parasitados ( $70,93 \pm 5,59$  UGST/ mg de proteína) e dos peixes não parasitados ( $75,98 \pm 4,21$  UGST/ mg de

proteína) em relação aos outros tecidos analisados em cada condição ( $45,94 \pm 9,93$  UGST/ mg de proteína para cérebro;  $37,76 \pm 2,73$  UGST/ mg de proteína para brânquias e  $23,40 \pm 3,14$  UGST/ mg de proteína para músculo) dos peixes parasitados e ( $61,97 \pm 6,37$  UGST/ mg de proteína, para cérebro;  $35,02 \pm 1,47$  UGST/ mg de proteína, para brânquias e  $21,48 \pm 2,53$  UGST/ mg de proteína para músculo) dos peixes não parasitados (Tabela 2, Fig. 2a).

A capacidade antioxidante total (ACAP) foi maior nas brânquias ( $24,00 \pm 2,97$ ) dos peixes parasitados e nas brânquias ( $31,01 \pm 8,48$ ), dos peixes não parasitados em comparação aos outros tecidos analisados ( $1,88 \pm 0,77$ , para fígado e  $1,49 \pm 0,60$  para músculo, dos peixes parasitados e  $6,04 \pm 1,28$ , para cérebro;  $2,71 \pm 0,46$ , para fígado e  $1,89 \pm 0,77$  para músculo, dos peixes não parasitados) (Tabela 2, Fig. 2b).

Na análise de lipoperoxidação (LPO) as brânquias tanto dos peixes parasitados ( $29,38 \pm 3,82$  nmol CHP/g tecido úmido) como os dos não parasitados ( $32,94 \pm 2,54$  nmol CHP/g tecido úmido) apresentaram um menor conteúdo de LPO em relação aos outros tecidos ( $64,77 \pm 15,76$  nmol CHP/g tecido úmido para cérebro,  $130,86 \pm 24,15$  nmol CHP/g tecido úmido para fígado e  $105,59 \pm 11,34$  nmol CHP/g tecido úmido para músculo, dos peixes parasitados e  $67,21 \pm 13,28$  nmol CHP/g tecido úmido para cérebro,  $98,02 \pm 8,06$  nmol CHP/g tecido úmido para fígado e  $68,34 \pm 3,74$  nmol CHP/g tecido úmido para músculo, dos peixes não parasitados) (Tabela 2; Fig. 2c).

Os valores médios ( $\pm$  desvio padrão) da química da água mensurados no momento da coleta dos peixes no rio Itacaiunas foram de pH  $7,30 \pm 0,5$ , oxigênio dissolvido  $6,90 \pm 0,71$  mg l<sup>-1</sup> e temperatura  $29,6^\circ\text{C} \pm 0,2$ , os dados abióticos não foram relacionados com os dados de biomarcadores.

## Discussão

Os resultados do presente estudo fornecem informações sobre o status da saúde dos peixes da espécie *S. rhombeus*, em baixos níveis de organização biológica (bioquímico), em termos de estresse oxidativo, frente à uma mistura complexa de poluentes que se encontram no rio Itacaiunas e a presença do Isopoda ectoparasita *Vanamea* sp. em brânquias dos peixes dessa espécie. Adicionalmente, elucidam quais tecidos (cérebro, fígado, brânquias e músculo) de *S. rhombeus* estão mais susceptíveis ao estresse oxidativo frente a esses estressantes antropogênicos e naturais.

Existe uma constatação de um elevado desmatamento associado à abertura de estrada e uma grande formação de áreas dominadas por pastagens em áreas de influência da bacia do rio Itacaiunas (Souza-Filho et al., 2015). Além disso, estudos sobre a verificação de qualidade ambiental confirmam o histórico de poluição neste rio (Lacerda et al., 1994; Andrade *et al.*, dados não publicados, 2013; Montes *et al.*, dados não publicados, 2013). Foi constatado em um estudo realizado no rio Itacaiunas no período seco, no mesmo ponto amostrado do presente estudo, uma elevada concentração média  $0.077 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de THg no sedimento em relação aos outros pontos amostrados ao longo do rio (Andrade *et al.*, dados não publicados, 2013). E em outro trabalho, tanto no período seco quanto no chuvoso foram verificados valores significativos de Cd e Cu nas águas do rio Itacaiunas e em amostras de sedimento constataram elevados valores de Zn, Mn e Cu no período seco e de Cu no período chuvoso (Montes *et al.*, dados não publicados, 2013).

No presente estudo, não houve diferença na atividade da GST entre peixes parasitados e não parasitados em todos os tecidos analisados. Resultado oposto foi constatado por Frank et al. (2011) que verificaram que os endoparasitas *Schistocephalus solidus* e *Ligula intestinalis* (Cestoda) podem atuar como moduladores e provocar uma redução na atividade da GST no fígado de três espécies de peixes (*Gasterosteus aculeatus*, *Rutilus rutilus*, *Leuciscus cephalus*) em relação aos peixes não parasitados. Já um outro estudo verificou um aumento na atividade da GST no fígado do peixe (*Cyprinus carpio* L.) parasitado pelo endoparasita por *Ptychobothrium* sp. (Cestoda) em relação aos não parasitados (Dautremepuits et al., 2003).

Os maiores níveis na capacidade de detoxificação (atividade da glutathione S-transferase) em fígado dos peixes parasitados e dos não parasitados em relação aos outros tecidos analisados é um resultado esperado, uma vez que neste órgão ocorrem processos de biotransformação de xenobióticos. A GST é uma enzima de biotransformação de fase II e conjuga a glutathione reduzida (GSH) com moléculas de xenobióticos orgânicos ou com produtos de danos oxidativos como hidroperóxidos lipídicos deixando-os menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem excretados (Van der Oost et al., 2003; Newman, 2015). Além disso, os níveis elevados desta enzima em fígado de peixe têm sido reportados em outros estudos que verificaram a influência de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, de água contaminada por

resíduos domésticos, de metais e de locais com fortes influências antropogênicas em peixes (Ahmad et al., 2000; Van der Oost et al., 2003; Ahmad et al., 2004).

A maior indução da GST em fígado de *S. rhombeus* em comparação aos outros tecidos analisados, independente da influência ou não do ectoparasita, podem ser um reflexo frente à uma mistura complexa de químicos ambientais presentes e que estão biodisponíveis nas águas e sedimentos do rio Itacaiunas. Contudo, uma alta atividade da enzima GST no fígado (em relação aos demais tecidos) não foi o suficiente para evitar lipoperoxidação em peixes parasitados. Um outro trabalho feito no mesmo ponto de amostragem do presente estudo, foi constatada uma maior frequência de alterações hepáticas (i.e., infiltração leucocitária, degeneração gordurosa, aumento de gotículas de lipídeos) em peixes da espécie *S. rhombeus* e tais resultados foram associados à uma alta concentração média de THg no fígado desses peixes em comparação com os espécimes de outros pontos amostrados ao longo do rio Itacaiunas (Andrade *et al.*, dados não publicados, 2013).

Estressantes associados à poluição presente no rio Itacaiunas e ao ectoparasitismo pelo Isopoda *Vanamea* sp. podem ter favorecido ao cenário de maior conteúdo de lipídios oxidados em fígado e músculo de *S. rhombeus* parasitados, sugerindo que os peixes parasitados estão mais susceptíveis aos efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROS) do que os espécimes não parasitados. A peroxidação de lipídios além de ser considerada uma medida de estresse oxidativo, pode também servir como uma medida de estresse geral e indica como se encontra a saúde dos peixes (Marcogliese et al., 2005).

Alguns estudos constataram que parasitas induzem biomarcadores de estresse oxidativo no sistema hospedeiro-parasita e podem favorecer a lipoperoxidação em tecidos de peixes parasitados (Belló et al., 2000; Marcogliese et al., 2005; Mozhdeganloo e Heidarpour, 2013). Um estudo evidenciou que os peixes *Perca flavescens*, expostos a níveis subletais de vários tipos de metais, apresentaram um maior conteúdo de lipoperoxidação em fígado quando estão parasitados pelo nematoda *Raphidascaris acus* e foi sugerido que parasitas e tóxicos podem atuar em conjunto e elevar o estresse oxidativo nos hospedeiros (Marcogliese et al., 2005). Foram constatados também elevados níveis de peroxidação lipídica nos peixes da espécie *Carassius auratus* e isso foi associado ao dano branquial provocado pelo ectoparasita

monogenoidea *Dactylogyrus* spp (Mozhdeganloo e Heidarpour, 2013). Ou como foi relatado por Belló et al. (2000) que verificaram que a quimioluminescência iniciada por hidroperóxido de tert-butilo, uma medida da peroxidação lipídica, foi quase 2 vezes maior no músculo de peixes *Rhamdia quelen* parasitados com *Clinostomum detrunctatum* do que nos músculos dos peixes não parasitados.

Em adição aos poluentes tais resultados do presente estudo podem também estar associados à uma influência do parasitismo na resposta imune inespecíficas dos hospedeiros. Isso porque na tentativa de eliminação dos parasitos há um aumento na indução dos agentes pró-oxidantes podendo provocar o estresse celular e a liberação de espécies reativas de oxigênio (Kumar et al., 2017).

Carrapatos ectoparasitos hematófagos, por exemplo, possuem mecanismos que modulam alguns processos fisiológicos de seus hospedeiros, e apresentam substâncias com efeitos vasodilatadores e imunossupressores que auxiliam na sua fixação e alimentação, afetando a resposta imunológica dos hospedeiros, e permitindo que o sangue flua sem que ocorra uma resposta fisiológica positiva do organismo parasitado (Parizi et al., 2007). Foi sugerido um cenário similar ao gerado pelo parasitismo por carrapatos, para o ectoparasita Isopoda Gnathiidae, hematófago de peixes, onde o Isopoda deva evadir as diferentes respostas de defesa do hospedeiro abrangendo a homeostasia que reduz a perda de sangue por vasoconstrição, agregação de plaquetas e coagulação de sangue (Ribeiro e Francischetti, 2003; Singh e Girschick, 2003; Manship et al., 2011). Manship et al. (2011), por exemplo, sugeriram que as glândulas salivares do ectoparasita (Isopoda: Gnathiidae) *Paragnathia formica* podem produzir compostos farmacológicos como anticoagulantes e inibidores de tripsina que provavelmente levam à supressão de respostas hemostáticas, inflamatórias e imunológicas do hospedeiro durante a alimentação. Além disso, o parasitismo por Isopoda indiretamente pode atuar como vetores de doenças causadas por vírus e bactérias (Carvalho et al., 2004; Thatcher, 2006).

As lesões nos hospedeiros devido ao ataque de parasitas (Carvalho et al., 2004; Marcusso et al., 2017) e/ou a influência da poluição podem ocasionar situações de estresse e alterar o sistema imune inato dos peixes (Kumar et al., 2017). Como, por exemplo, o aumento de células fagocitárias, que é um dos principais mecanismos de defesa contra agentes infecciosos e parasitários, e que atuam nas inflamações causadas

pelo dano nos tecidos, contudo envolve processos de explosão respiratória onde há um aumento na produção de EROS (i.e., o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , radical hidroxila ( $HO\cdot$ )) que são altamente reativas (Secombes e Fletcher, 1992; Marcusso et al., 2017).

No mesmo ponto de amostragem do presente estudo no rio Itacaiunas, foram encontrados baixos valores de THg no músculo de *S. rhombeus* (Andrade et al. dados não publicados, 2013). Contudo, os baixos níveis de GST e menor competência antioxidante em músculo de *S. rhombeus* e provavelmente outros fatores associados à composição química inerentes aos músculos e à biologia dessa espécie podem ter favorecido para o alto nível de lipoperoxidação verificado nesse tecido dos peixes parasitados. Segundo Almeida Val et al. (2006) os peixes da família Serrasalmidae se enquadram na categoria de espécies ativas e devido a isso possuem uma elevada proporção de músculos vermelhos (Almeida Val et al., 2006; Gonçalves e Soares, 1998). Esse tipo de músculo em peixes, diferentemente do branco, possui uma maior concentração de lipídios, na forma de triacilgliceróis que são necessários como reserva energética para a natação, mas que contêm uma grande quantidade de ácidos graxos altamente insaturados (PUFA) e que tendem a se alvos do processo oxidativo (Gonçalves e Soares, 1998). Um fator adicional pode estar relacionado a um maior estoque de gordura associado à atividade em busca de alimento no período seco, visto que estudos mostram que durante este período as presas de peixes carnívoros como as piranhas concentram-se no canal principal do rio proporcionando uma maior atividade alimentar (Braga, 1954; Villares Junior et al., 2008; Ferreira et al., 2014) que pode ter favorecido ao aumento dos níveis de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas das células musculares provocando à lipoperoxidação.

O cérebro é um órgão propenso a sofrer danos oxidativos, pois possui uma elevada taxa metabólica, alto teor de ácidos graxos poliinsaturados e níveis baixos de antioxidantes (Cardozo-Pelaez et al., 2000; Balu et al., 2005). No entanto, no presente estudo o cérebro dos peixes parasitados foi o segundo órgão mais responsivo na tentativa de detoxificação (dos peixes nas duas condições) e nos níveis de ACAP. Tais resultados podem ter contribuído para a ausência de danos em lipídios no cérebro dos peixes parasitados indicando respostas adaptativas no sistema de defesa redox neste órgão. Este resultado pode estar associado também ao sistema imune e à neuroproteção

relacionada à barreira hematoencefálica que existe no cérebro (Gilgun-Sherki et al., 2001; Halliwell e Gutteridge, 2015). Adicionalmente, pode ser que os níveis de antioxidantes inerentes à dieta de *S. rhombeus* possam ser suficientes e estar favorecendo para proteger o cérebro de danos relacionados ao estresse oxidativo que poderia ser provocado pelo ectoparasitismo e poluição no rio Itacaiunas. O tipo de dieta já foi mencionado por ser um dos fatores que podem ajudar a proteger o cérebro de EROS, como foi verificado nos peixes *Corydoras paleatus* com uma dieta rica em ácido lipóico com elevado potencial antioxidante, apresentaram uma neuroproteção do cérebro diferentemente dos indivíduos que não receberam esse tipo de dieta (Monserrat et al., 2008).

A presença do ectoparasitismo por Isopoda em peixes tem sido citada como um dos fatores que podem afetar negativamente as brânquias. Os ectoparasitas se alimentam do sangue das brânquias e conseqüentemente os peixes parasitados tendem a perder tecido e sangue, pode haver a redução de filamentos branquiais e uma redução da eficiência respiratória (Carvalho et al., 2004; Lins et al., 2008). As brânquias funcionam como principal interface reguladora entre o ambiente interno e externo, é o principal sistema de respiração dos peixes, sendo realizadas várias funções simultaneamente, como por exemplo, a troca de íons inorgânico e a água, balanço ácido-base e a excreção de compostos nitrogenados (Olson 2002; Evans, 2005). Além da pressão natural por parasitas, as brânquias de peixes tendem a receber uma influência antrópica, pois este é o principal órgão alvo na ação tóxica do cobre, podendo ocorrer deteriorações das funções respiratórias e distúrbios ionoregulatórios devido a mudanças estruturais. Estudos mostram que a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase encontrada nas células epiteliais das brânquias, pode ser alterada havendo um aumento da permeabilidade iônica do epitélio branquial e a inibição de sua atividade (Wilson e Taylor., 1996; Li et al., 1998). Contudo, os resultados do presente estudo mostraram que as brânquias tanto dos peixes parasitados como nos do não parasitados foi o órgão que apresentou uma maior competência antioxidante o que pode ter favorecido significativamente na observação de um menor conteúdo de LPO em relação aos outros tecidos analisados, sugerindo uma grande resistência deste tecido em *S. rhombeus* ao parasitismo e aos químicos ambientais presentes e biodisponíveis no rio Itacaiunas, visto que as brânquias foram os órgãos preferenciais para estes parasitas.

## Conclusão

Os resultados do presente estudo indicam que a influência do ectoparasitismo associado a uma maior exposição desses organismos aos químicos ambientais biodisponíveis no rio Itacaiunas geram um efeito sinérgico na indução de estresse oxidativo em *S. rhombeus*. Apesar de existir uma certa resistência na tentativa de detoxificação no órgão onde foi encontrado os parasitas (brânquias), outros órgãos (fígado e músculo) de peixes parasitados podem ser mais responsivos e estarem mais susceptíveis ao estresse oxidativo. Sugere-se que os próximos estudos de impacto ambiental levem em consideração o parasitismo visando obter uma determinação mais clara sobre a influência de impactos de contaminantes nos ecossistemas naturais e nos organismos aquáticos que nele se encontram.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os colegas que ajudaram nas amostragens e no processamento das amostras de peixes. A FAPESPA pela concessão da bolsa de estudo. Ao ICMBIO, pela licença para a realização da pesquisa concedida nas áreas de estudo. Ao ICMBIO e Norte Energia pelo apoio logístico de campo.

## Referências

- Acácio, M., Varella, A.M.B., Malta, J.C.O., 2012. The parasitic crustaceans of *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1776) (Characiformes: Serrasalminidae) from floodplain lakes of the Solimões River, Central Amazon, Brazil. *Neotropical Helminthology*. 6, 179 – 184.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1523, 37-48.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57, 290–302.
- Almeida, V.L.L., Hahn, N.S., Agostinho, C.S., 1998. Stomach content of juvenile and adult piranhas (*Serrasalmus marginatus*) in the Paraná floodplains, Brazil. *Stud Neotrop Fauna & Environm.* 33, 100–105.
- Almeida-Val, V.M.F., Gomes, A.R.C., Lopes, N.P., 2006. Metabolic and physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fish of the amazon. In: Kappor, B.G., Val, A.L. (Org.). *The physiology of Tropical Fish.*: Elsevier, 21, 443-500.

Anderson, M. J., Gorley, R. N. & Clarke, K. R., 2008. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide 435 to software and statistical methods. Primer-E, Plymouth, U.K.

Andrade, A.C.B. Biomarcadores histopatológicos e concentração de Hg em piranhas (*Serrasalmus rhombeus*) e sedimento de fundo na avaliação da qualidade ambiental de uma região de mineração da Amazônia, Brasil. 42f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aquática e Pesca) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2013.

Amado, L.L., Rosa, C.E., Leite, A.M., Moraes, L., Pires, W.V., Pinho, G., Martins, C.M.G., Robaldo, R.B., Nery, L.E.M., Monserrat, J.M., Bianchini, A., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., 2006a. 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*. 52, 199-206.

Amado, L.L., Robaldo, R.B., Geracitano, L., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2006b. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Marine Pollution Bulletin*. 52, 207-213.

Amado, L. L.; Longaray Garcia, M; Ramos, P. B.; Freitas, R. F.; Zafalon, B.; Ribas Ferreira, J. L. Yunes, J. S.; Monserrat, J. M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*. 407, 2115-2123.

Aloo, P.A., Anam, R. O., Mwangi, J. N., 2004. Metazoan Parasites of Some Commercially Important Fish along the Kenyan Coast. *Western Indian Ocean J. Mar. Sci.* 3, 71–78.

Araújo, C.S. Taxonomia, Morfologia e Aspectos da biologia reprodutiva dos Cymothoidae (Crustácea: Malacostraca: Isopoda) parasitas de peixes da Amazônia brasileira. 2002. 106 f. Tese de doutorado (Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Universidade do Amazonas- UA. Manaus, 2002.

Barber, I., Hoare, D., Krause, J. 2000. The effects of parasites on fish behaviour: An evolutionary perspective. *Review. Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 131–165.

Bainy, A.C.D., 1996. Antioxidant defenses and mechanism of protection against oxygen radicals, in: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. INPA, Manaus. pp. 331-335.

Balu, M., Sangeetha, P., Haripriya, D., Panneerselvam, C., 2005. Rejuvenation of the antioxidant system in the central nervous system of aged rats by grape seed extract. *Neurosci. Lett.* 383, 295–300.

Barthem, R. B., Fabr e, N.N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da amazônia. In: Ruffino, M.L. (Org.). A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia Brasileira. Manaus: Provárzea. 2004, v. p. 17-51.

- Belló, A., Fortes, E., Klein, A.B., Belló, A.A., Llesuy, S., Robaldo, R.B., Bianchini, A. 2000. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum det truncatum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 42, 233-236.
- Braga, R.A., 1954. Alimentação de pirambeba, *Serrasalmus rhombeus* (L., 1766) Lacépède, 1803, no açude Lima Campos, Icó, Ceará (Ostariophysi, Characidae, Serrasalminidae). *Rev. Brasil. Biol.* 14, 477-792.
- Cardozo-Pelaez, F., Brooks, P.J., Stedeford, T., Song, S., Sanchez-Ramos, J., 2000. DNA damage, repair, and antioxidant systems in brain regions: a correlative study, *Free Radic. Biol. Med.* 28, 779–785.
- Carvalho, L.N., Arruda, R., Del-Claro, K., 2004. Host-parasite interactions between the piranha *Pygocentrus nattereri* (Characiformes: Characidae) and isopods and branchiurans (Crustacea) in the rio Araguaia basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 2, 93-98.
- Castro, R.M.C., VARI, R.P., 2003. Prochilodontidae (Fannel mouth characiforms). p. 65-70. In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil.
- Dautremepuits, C., Betoulle, S.; Vernet, G., 2002. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochim. Biophys. Acta*. 1573, 4-8.
- Dautremepuits, C., Betoulle, S., Vernet, G., 2003. Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Fish & Shellfish Immunology*. 15, 467–471.
- Dórea, J.G., Barbosa, A., Souza, J., Fadini, P., Jardim, W.F., 2004. Piranhas (*Serrasalmus* spp.) as markers of mercury bioaccumulation in amazon ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 59, 57-63.
- Duarte, I.A., Reis-Santos, P., França, S., Cabral, H., Fonseca, V. F. 2017. Biomarker responses to environmental contamination in estuaries: A comparative multi-taxa approach. *Aquatic Toxicology*. 189, 31–41.
- 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. *Physiol Ver.* 85, 97–177.
- Frank, S.N., Faust, S., Kalbe, M., Trubiroha, A., Kloas, W., Sures, B., 2011. Fish hepatic glutathione-S-transferase activity is affected by the cestode parasites *Schistocephalus solidus* and *Ligula intestinalis*: evidence from field and laboratory studies. *Parasitology*. 138, 939–944.
- Ferreira, F.S., Vicentin, W., COSTA, F.E.S., Suárez, Y.R., 2014. Trophic ecology of two piranha species, *Pygocentrus nattereri* and *Serrasalmus marginatus* (Characiformes, Characidae), in the floodplain of the Negro River, Pantanal. *Acta Limnologica Brasiliensia*. 26, 381-391.

- Freitas, C.E., Siqueira-Souza, F.K., 2009. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. *Revista Agrogeoambiental*. 1, 39-45.
- Fonseca, V.F., França, S., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquat.Toxicol.* 102, 216–227.
- Fontana, M., Takemoto, R.M., Malta, J.C.O., Mateus, L.A.F., 2012. Parasitism by argulids (Crustacea: Branchiura) in piranhas (Osteichthyes: Serrasalminidae) captured in the Caiçara bays, upper Paraguay River, Pantanal, Mato Grosso state, Brazil. *Neotrop. ichthyol.* 10, 1679-6225.
- Galarza, M.A., Macambira, M.J.B., Villas, R.N.N., 2008. Dating and Isotopic Characteristics (Pb and S) of the Fe Oxide-Cu-Au-U-REE Igarapé Bahia Ore Deposit, Carajás Mineral Province, Pará State, Brazil. *Journal of South American Earth Sciences*. 25, 377-397.
- Gallagher, E.P., Canadá, A.T., Di Giulio, R.T., 1992. The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquatic Toxicology*. 23, 155-168.
- Gauvin, K.B., Costantini, D., Cooke, S.J., Willmore, W.G., 2017. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish and Fisheries*. 1–15.
- Gonçalves, A.A., Soares, L.A.S., 1998. Lípidios em peixes. *Vetor*. 8, 35-53.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 246, 7130–7139.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assay for differentiation of glutathione-S-transferases. *Methods in Enzymology*. 77, 398-405.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, USA.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of the lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine*. 19, 271-280.
- Horton, T., Okamura, B., 2003. Post-haemorrhagic anaemia in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), caused by blood feeding of *Ceratothoa oestroides* (Isopoda: Cymothoidae). *Journal of Fish Diseases*. 26, 401–406.
- Klein, C., Ladeira, E.A., 2002. Petrography and Geochemistry of the least altered banded iron-formations of the Archean Carajás Formation, northern Brazil. *Economic Geology and the Bulletin of the Society of Economic Geologists*. 97, 643-651.
- Kumar, S., Raman, R.P., Prasad, K.P., Srivastava, P.P., Kumar, S., Rajendran, K.V., 2017. Modulation of innate immune responses and induction of oxidative stress

biomarkers in *Pangasianodon hypophthalmus* following an experimental infection with dactylogyrid monogeneans. *Fish & Shellfish Immunology*. 63, 334-343.

Lacerda, L. D., Bidone, E. D., Guimaraes, A. F., and Pfeiffer, W. C., 1994. Mercury concentrations in fish from the Itacaiunas Parauapebas River System, Carajas Region, Amazon. *An. Acad. Bras. Ci.* 66,373- 379.

Li, J., Quabius, E.S., Wendelaar Bonga, S., Flik, G., Lock, R.A.C., 1998. Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquat. Toxicol.* 43, 1–11.

Lins, D.C., Meirelles, M.E., Malm, O., Lima, N.R.W., 2008. Mercury concentration in the freshwater bonefish *Cyphocharax gilbert* (Curimatidae) and its parasite the crustacean *Riggia paranensis* (Cymothoidae). *Neotrop. Ichthyol.* 6, 283–288.

Loureiro, S.N., Videira, M.N., Giarrizzo, T., 2012. Interação hospedeiro-parasita entre a sardinha *Cetengraulis edentulus* (Cuvier, 1829) e o isópode parasita *Livoneca desteroensis* (Isopoda, Cymothoidae) em um estuário do norte do Brasil. *Rev. Pan-Amaz. Saúde.* 3, 25-31.

Malta, J.C.O., Varella, A.M., 1996. *Ergasilus yumaricus* sp. n. (Copepoda: Ergasilidae) from the gills of *Pygocentrus nattereri* (Kner, 1860), *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1819) and *Pristobrycon eigenmanni* (Norman, 1929) (Characiformes: Serrasalmidae) from the Brazilian Amazon. *Acta Amazonica.* 25, 93-100.

Marcogliese, D.J., Brambilla, L.G., Gagné, F., Gendron, A.D., 2005 Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. *Dis. Aquat. Org.* 63, 77–84.

Marcogliese, D.J., Dautremepuits, C., Gendron, A., Fournier, M., 2010. Interactions between parasites and pollutants in yellow perch (*Perca flavescens*) in the St. Lawrence River, Canada: implications for resistance and tolerance to parasites. *Can. J. Zool.* 88, 247–258.

Marcogliese, D.J., Pietroock, M., 2011. Combined effects of parasites and contaminants on animal health: Parasites do matter. *Trends in Parasitology.* 27, 123–130.

Marcusso, P.F., Salvador, R., Marinho-Neto, F.A., 2017. Infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages.* 16, 165-169.

Manship, B.M., Walker, A.J., Davies, A.J., 2011. Brooding and embryonic development in the crustacean *Paragnathia formica* (Hesse, 1864) (Peracarida: Isopoda: Gnathiidae). *Arthropod Structure & Development.* 40, 135-145.

Minguez, L., Meyer, A., Molloy, D.P., Giambérini, L., 2009. Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissenapolyomorpha*): Importance in ecotoxicological studies. *Environmental Research.* 109, 843–850.

Mol, J.H., 2006. Attacks on humans by the piranha *Serrasalmus rhombeus* in Suriname. *Studies on Neotropical Fauna and Environment.* 41, 189–195.

- Montes, C.S. Uso integrado de biomarcadores para o monitoramento dos efeitos de metais em *Serrasalmus rhombeus* provenientes de rios Amazônicos. 109f. Tese (Doutorado em Ecologia Aquática e Pesca) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2016.
- Monserrat, J.M., Geracitano, L.A., Pinho, G.L.L., Vinagre, T.M., Faleiros, M., Alciati, J.C., Bianchini, A., 2003. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol Orange complex formation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 45, 177–183.
- Monserrat, J.M., Lima, J.V., Ferreira, J.L.R., Acosta, D., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Moraes, T.B., Dos Santos, L.C., Amado, L.L., 2008. Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology*. 148, 287-292.
- Mozhdeganloo, Z., Heidarpour, M., 2013. Oxidative stress in the gill tissues of goldfishes (*Carassius auratus*) parasitized by *Dactylogyrus* spp. *J Parasit Dis*. 38, 269–272.
- Neves, C.A., Santos, E.A., Bainy, A.C.D., 2000. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palaemonidae) infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Diseases of Aquatic Organism*. 39, 155-158.
- Neves, C.A., Pastor, M.P.S., Nery, L.E.M., Santos, E.A., 2004. Effects of the parasite *Probopyrus ringueleti* (Isopoda) on glucose, glycogen and lipid concentration in starved *Palaemonetes argentinus* (Decapoda). *Diseases of Aquatic Organism*. 58, 209–213.
- Newman, M.C., 2015. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Ann Arbor Press, Chelsea, USA.
- Olson, k., 2002. Gill circulation: regulation of perfusion distribution and metabolism of regulatory molecules. *Journal of experimental Zoology*. 293, 320–335.
- Overstreet, R.M., 1997. Parasitological data as monitors of environmental health. *Parassitofogia*. 39, 169-175.
- Parizi, L.F., Masuda, A., Vaz-Junior, I.S., 2007. Modulação da resposta imune do hospedeiro pelos carrapatos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35, 285-294.
- Porto, J. I. R.; ARAÚJO, C. S. O.; FELDBERG, E. 2005. Mutagenic effects of Mercury pollution as revealed by micronucleus test in three Amazonian fish species. *Environmental Research*. Nº 97. p. 287-292.
- Porvari, P., 1995. Mercury levels of fish in Tucuruí hydroelectric reservoir and in River Moju in Amazonia, in the state of Pará, Brazil. *Sci. Total Environ*. 175, 109-117.
- Ravichandran, S., Rameshkumar, G., Mahesh Babu, B., Kumaravel, K., 2009. Infestation of *Rastrelliger kanagurta*, with Cymothoid Isopod, *Joryma brachysoma* in the Colachel Environment of Southwest Coast of India. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2, 80-84.

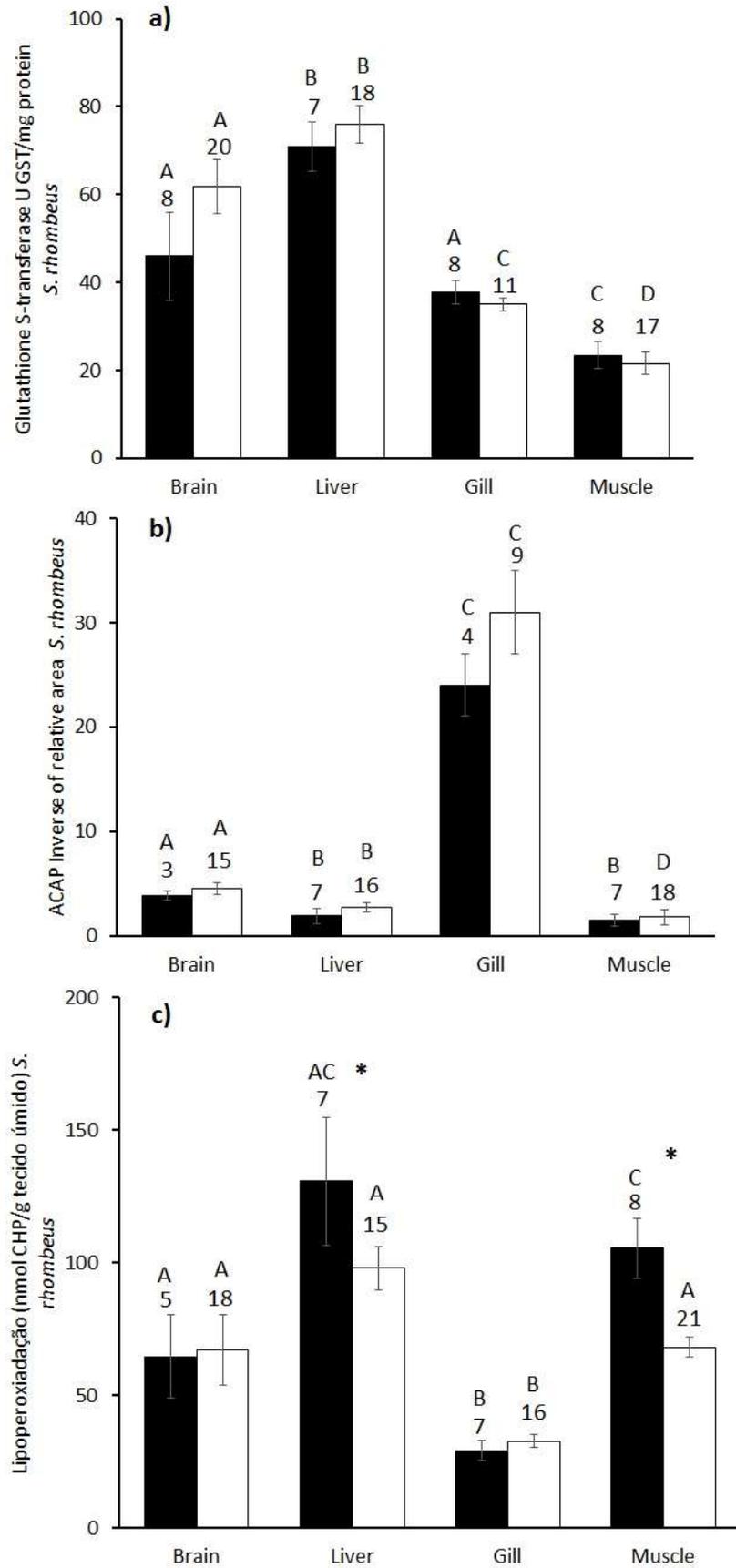
- Ribeiro, D.R.G., Faccin, H., Molin, T.R.D., De Carvalho, L.M., Amado, L.L., 2017. Metal and metalloid distribution in different environmental compartments of the middle Xingu River in the Amazon, Brazil. *Science of The Total Environment*, 605-606, 66-74.
- Rocha, M.S., Ribeiro, F.R.V., 2010. A new species of *Pimelodus* LaCépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) from rio Itacaiunas, rio Tocantins basin, Brazil. *Zootaxa*. 2343, 57-65.
- Santos, G. M.; Jegu, M.; Merona, B. C. de peixes comerciais do baixo rio Tocantins; projeto Tucuruí. Manaus, ELETRONORTE/CNPqIINPA, 1984.
- Santos, L.N., Muller, R.C.S., Sarkis, J.E.S., Alves, C.N., Brabo, E. S., Santos, E.O., Bentes, M.H.S., 2000. Evaluation of total mercury concentrations in fish consumed in the municipality of Itaituba, Tapajós River Basin, Pará, Brazil. *The Science of the Total Environment*. 261, 1-8
- Secombes, C.J., Fletcher, T.C., 1992. The role of phagocytes in the protective mechanism of fish. *Annual Rev. of Fish Diseases*. 53-71.
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D., 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*. 40, 959-975.
- Singh, S.K., Girschick, H.J., 2003. Tick-host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases. *Current Science*. 85, 1284-1298.
- Sioli, H. Hydrochemistry and geology in the Brazilian Amazon region. *Amazoniana*. v.1, p.74-83, 1984.
- Souza-Araujo, J. S., Giarrizzo, T., Lima, M.O., Souza, M.B.G., 2016. Mercury and methyl mercury in fishes from Bacajá River (Brazilian Amazon): evidence for bioaccumulation and biomagnification. *Journal of Fish Biology*, 1, 1-15.
- Souza-Filho, P. W. M.; Nascimento JR, W.R., Versiani de Mendonça, B.R., Silva JR, R.O., Guimarães, J.T.F., Dall'agnol, R., Siqueira, J. O., 2015. Changes in the land cover and land use of the Itacaiunas River watershed, arc of deforestation, Carajas, southeastern Amazon. *ISPRS - International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, v. XL-7/W3, p. 1491-1496.
- Sures, B., Siddall, R., Taraschewski, H., 1999. Parasites as Accumulation Indicators of Heavy Metal Pollution. *Parasitology Today*. 15, 16-21.
- Sures, B., 2001. The use of fish parasites as bioindicators of heavy metals in aquatic ecosystems: a review. *Aquatic Ecology*. 35, 245-255.
- Sures, B., 2003. Accumulation of heavy metals by intestinal helminths in fish: an overview and perspective. *Parasitology*. S53-S60.
- Sures, B., 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends in Parasitology*. 20, 170-177.

- Sures, B., Nachev, M., Selbach, C., Marcogliese, D.J., 2017. Parasite responses to pollution: what we know and where we go in 'Environmental Parasitology'. *Parasites & Vectors*. 10:65
- Tavares-Dias, M., Araújo, C.S.O., Barros, M.S., Viana, G.M., 2014. New hosts and distribution records of *Braga patagonica*, a parasite cymothoidae of fishes from the Amazon. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*. 18, 91-97.
- Thatcher, V.E. 1993. *Trematódeos Neotropicais*. INPA. Manaus, Brasil. 553pp.
- Thatcher, V.E., 2006. *Amazon Fish Parasites*, 2<sup>a</sup> Ed., Pensoft Publishers. Sofia, Bulgária. 508pp.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Villares Junior, G.A., Gomiero, L.M., Goitein, R., 2008. Alimentação de *Serrasalmus maculatus* (Kner, 1858) (Characiformes; Serrasalmidae) no trecho inferior bacia do rio Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Acta Sci. Biol. Sci.* 30, 267-273.

## FIGURAS

**Fig. 1.** Respostas de biomarcadores em cada órgão alvo (cérebro, fígado, brânquia e músculo) de *S. rhombeus* parasitados e não parasitados (histograma preto e branco, respectivamente) coletados em período seco no rio Itacaiunas. Histograma com média e erro padrão de respostas de biomarcadores: (a) atividade de glutathione S-transferase (GST), (b) Capacidade Antioxidante Total (ACAP) e (c) peroxidação lipídica (LPO). O número em cima do histograma significa o número analisado de cada biomarcador por amostra. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os peixes parasitados e não parasitados, a ausência indica que não foram observadas diferenças significativas. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os vários órgãos testados para cada condição.

Fig. 1.



## LISTA DE TABELAS

**TABELA I: Resultados para a comparação da atividade da glutathione-S-transferase, capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica entre *S. rhombeus* parasitado ou não parasitado em um mesmo órgão (cérebro, fígado, brânquias e músculo). As interações entre peixes parasitados ou não parasitados foram baseadas nos testes Pairwise, valor P com base em PERMANOVA (perm). Resultados significativos estão em negrito.**

**TABELA II: Resultados para a comparação da atividade de glutathione-S-transferase, capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica entre diferentes órgãos (cérebro, fígado, brânquias e músculos) de *S. rhombeus* parasitado ou não parasitado. As interações entre órgãos foram baseadas em testes Pairwise, valor P com base em PERMANOVA (perm). Resultados significativos estão em negrito.**

TABELA I.

Biomarker	Comparison conditions	between	t	<i>P</i> (perm)	Unique perms	P (MC)
GST	paras_brain vs np_brain		1.603	0.13	996	0.128
	paras_liver vs np_liver		0.332	0.79	997	0.736
	paras_gill vs np_gill		0.797	0.45	992	0.439
	paras_muscle vs np_muscle		0.718	0.49	996	0.474
	paras_brain vs np_brain		0.654	0.52	216	0.486
ACAP	paras_liver vs np_liver		1.611	0.134	997	0.113
	paras_gill vs np_gill		1.480	0.202	311	0.158
	paras_muscle vs np_muscle		0.231	0.825	993	0.834
	paras_brain vs np_brain		0.303	0.764	987	0.75
LPO	paras_liver vs np_liver		2.318	<b>0.042</b>	988	0.03
	paras_gill vs np_gill		0.948	0.325	983	0.372
	paras_muscle vs np_muscle		3.835	<b>0.003</b>	996	0.001

TABELA II.

PAIR-WISE TESTS	<i>Serrasalmus rhombeus</i>			
	t	P (perm)	Unique perms	P (MC)
Comparison between tissues				
<b>Glutathione S-transferase</b>				
paras_brain vs paras_liver	2.573	<b>0.027</b>	925	0.019
paras_brain vs paras_gills	0.421	0.667	924	0.666
paras_brain vs paras_muscle	2.637	<b>0.026</b>	916	0.03
paras_liver vs paras_gills	5.771	<b>0.001</b>	921	0.001
paras_liver vs paras_muscle	7.340	<b>0.001</b>	931	0.001
paras_gill vs paras_muscle	3.440	<b>0.01</b>	916	0.009
np_brain vs np_liver	1.986	<b>0.054</b>	995	0.044
np_brain vs np_gills	3.214	<b>0.005</b>	996	0.003
np_brain vs np_muscle	6.091	<b>0.001</b>	995	0.001
np_liver vs np_gills	6.815	<b>0.001</b>	998	0.001
np_liver vs np_muscle	7.993	<b>0.001</b>	997	0.001
np_gill vs np_muscle	3.182	<b>0.003</b>	998	0.004
<b>Total antioxidant capacity</b>				
paras_brain vs paras_liver	2.009	0.085	120	0.088
paras_brain vs paras_gills	1.800	<b>0.054</b>	35	0.119
paras_brain vs paras_muscle	2.133	0.066	120	0.069
paras_liver vs paras_gills	3.796	<b>0.009</b>	311	0.007
paras_liver vs paras_muscle	0.535	0.597	745	0.577
paras_gill vs paras_muscle	3.845	<b>0.006</b>	319	0.01
np_brain vs np_liver	3.002	<b>0.008</b>	995	0.011
np_brain vs np_gills	6.227	<b>0.001</b>	961	0.001
np_brain vs np_muscle	3.781	<b>0.001</b>	996	0.002
np_liver vs np_gills	8.701	<b>0.001</b>	993	0.001
np_liver vs np_muscle	2.641	<b>0.017</b>	998	0.017
np_gill vs np_muscle	7.093	<b>0.001</b>	995	0.001
<b>Lipid peroxidation</b>				
paras_brain vs paras_liver	2.158	0.067	558	0.059
paras_brain vs paras_gills	2.709	<b>0.016</b>	571	0.018
paras_brain vs paras_muscle	2.430	<b>0.032</b>	693	0.035
paras_liver vs paras_gills	5.800	<b>0.002</b>	747	0.001
paras_liver vs paras_muscle	0.596	0.568	918	0.558
paras_gill vs paras_muscle	7.994	<b>0.001</b>	916	0.001
np_brain vs np_liver	1.423	0.14	996	0.161

np_brain vs np_gills	2.051	<b>0.055</b>	993	0.052
np_brain vs np_muscle	1.502	0.139	998	0.148
np_liver vs np_gills	5.558	<b>0.001</b>	998	0.001
np_liver vs np_muscle	0.547	0.588	998	0.59
np_gill vs np_muscle	7.498	<b>0.001</b>	998	0.001