



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

DOUGLAS DOS SANTOS MARCELINO

**AVALIAÇÃO GENÉTICA E BIOQUÍMICA EM *Geophagus surinamensis*
(TELEOSTEI: CICHLIDAE) DE UMA ÁREA DA AMAZÔNIA HISTORICAMENTE
IMPACTADA PELA ATIVIDADE MINERADORA**

BELÉM

2023

DOUGLAS DOS SANTOS MARCELINO

**AVALIAÇÃO GENÉTICA E BIOQUÍMICA EM *Geophagus surinamensis*
(TELEOSTEI: CICHLIDAE) DE UMA ÁREA DA AMAZÔNIA HISTORICAMENTE
IMPACTADA PELA ATIVIDADE MINERADORA**

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Renata Coelho Rodrigues Noronha

Co-orientador: Prof. Dr. Adauto Lima Cardoso

BELÉM

2023

DOUGLAS DOS SANTOS MARCELINO

**AVALIAÇÃO GENÉTICA E BIOQUÍMICA EM *Geophagus surinamensis*
(TELEOSTEI: CICHLIDAE) DE UMA ÁREA DA AMAZÔNIA HISTORICAMENTE
IMPACTADA PELA ATIVIDADE MINERADORA**

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Renata Coelho Rodrigues Noronha

Co-orientador: Prof. Dr. Adauto Lima Cardoso

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Renata Coelho Rodrigues Noronha (CEABIO/PPGEAP/UFPA, presidente)

Prof^a. Dr^a. Lílian Lund Amado (CEABIO/PPGEAP/UFPA, membro interno)

Prof^o. Dr. Cesar Martins (UNESP/Botucatu, membro externo)

Prof^o. Dr. Marcelo Ricardo Vicari (UEPG, membro externo)

Prof^o. Dr. Bruno Rafael Ribeiro de Almeida (IFPA/ITAITUBA, membro externo, suplente)

Prof^a Dr. Adenilson Leão Pereira (UFPA /ALTAMIRA, membro interno, suplente)

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos amazônicos enfrentam graves problemas de degradação devido a ações antrópicas, como a mineração. Esse tipo de atividade na região do município de Barcarena, no Estado do Pará, tem envolvimento com derramamentos acidentais de rejeitos em rios, como o de caulim, que contém altas concentrações de metais capazes de afetar os organismos aquáticos. O objetivo desta pesquisa foi investigar possíveis modificações na metilação de DNA bioquímicas ocasionadas por esses metais em peixes da região de abrangência da mineração (Abaetetuba e Barcarena). Para tanto, o *Geophagus surinamensis* (Teleostei: Cichlidae) foi selecionado no estudo devido suas características adaptativas e ocorrência abundante na bacia amazônica. Os peixes foram coletados na região de abrangência de mineração e na região de Breves (ambiente historicamente não impactado por metais), e os resultados das avaliações foram comparados entre essas duas regiões. Foram avaliados os níveis da expressão de genes envolvidos com metilação do DNA (DNMTs e TETs) e dois biomarcadores de estresse oxidativo: a atividade enzimática da Glutathione S-transferase (GST) e níveis de peroxidação lipídica (LPO). Inesperadamente, Breves mostrou maior incidência de manganês em relação à Barcarena. Nessa mesma região, não houve alterações na expressão de DNMTs e TETs nas brânquias, porém, foi observado redução na atividade enzimática de GST. Em contraste, o fígado e músculo mostraram uma maior expressão de TET2, e sem alterações na avaliação de GST e LPO. Em Abaetetuba, houve redução dos níveis de LPO em fígado. Enquanto em Barcarena não houve alterações em ambas as avaliações. De modo geral, esses resultados sugerem que as brânquias demonstram ter uma defesa antioxidante suscetível ao estresse oxidativo, mas não suscetíveis à alteração na expressão gênica. Fígado e músculo, opostamente, demonstraram ter uma defesa antioxidante eficiente, mas suscetíveis a sofrer alterações na expressão gênica que favorecem a demetilação de DNA no perfil epigenético. O baixo nível de expressão genética (TET2) em pontos de alta incidência do manganês sinalizaram que outros fatores ambientais também podem ter contribuído para mudanças na expressão gênica. As alterações em pontos de maior incidência de manganês (Breves e Abaetetuba), sugerem este metal como o responsável pelas observações, porém, não deixa claro a relação direta de tais alterações com as regiões de abrangência da mineração. Por outro lado, a elevada incidência de manganês em Breves mostra que a região possar estar sendo impactada por outros tipos de atividades. Esses resultados reforçam a necessidade de monitorar a qualidade da água em áreas expostas à contaminação e a implementação de medidas preventivas para minimizar os impactos da exposição dos metais em organismos aquáticos.

Palavras-chave: metilação do DNA, estresse oxidativo, lipoperoxidação, metais, Amazônia

SUMÁRIO

SUMÁRIO	iii
1 INTRODUÇÃO	4
1.1 Ecossistemas aquáticos amazônicos e impactos ambientais	4
1.2 Considerações sobre a família Cichlidae (Ciclídeos)	5
1.3 Considerações sobre <i>Geophagus</i>	6
1.3.1 <i>Geophagus surinamensis</i>	7
1.4 Ciclo da Metilação do DNA (DNMTs e TETs)	8
1.5 Estresse oxidativo (EO) e espécies reativas de oxigênio (EROs)	10
2 OBJETIVO	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Área de estudo	14
3.2 Coleta das amostras	15
3.3 Processamento do material biológico	16
3.4 Análise da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR)	16
3.5 Análise de atividade da Glutathione-S-transferase (GST).....	17
3.6 Lipoperoxidação (LPO).....	17
3.7 Análise estatística	18
4 RESULTADOS.....	18
CAPÍTULO 1	19
5 CONCLUSÃO	34
6 REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ecossistemas aquáticos amazônicos e impactos ambientais

A Amazônia brasileira é uma região rica em recursos naturais e ecossistemas aquáticos, porém, tem enfrentado sérios problemas de impactos ambientais. Diversos rios da região têm sido afetados pela poluição aquática, o que tem gerado problemas ecológicos e sociais em diversos estados. No Pará, por exemplo, estudos realizados nos rios Arapiranga e Murucupi, localizados em Abaetetuba e Barcarena, respectivamente, identificaram pontos de coleta de água classificados como ruins devido à influência humana sobre o ambiente aquático na região (MEDEIROS, 2012). Em Santarém, também no Pará, um estudo realizado no rio Tapajós revelou níveis de metais Alumínio e Ferro acima do permitido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (SALES *et al.*, 2021). Além disso, outros estudos realizados nos rios Tapajós, Negro e Madeira, altos níveis de concentração de mercúrio foram encontrados no cabelo e no leite materno de populações ribeirinhas que utilizam peixes como fonte alimentar (OLIVEIRA *et al.*, 2010; FAIAL *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2013). Já em análises de água do Rio Negro, em Manaus, foram identificados níveis elevados de zinco e cobre dissolvidos, que ultrapassam os limites toleráveis pelo Ministério da Saúde para águas destinadas ao abastecimento público, e aumento significativo na concentração de metais que podem ser incorporados pela biota, devido seu acúmulo tanto por despejos de efluentes domésticos e industriais, quanto pela forma convencional de tratamento da água que removem resíduos em suspensão, mas que não retiram os metais dissolvidos presentes (PINTO *et al.*, 2009).

Os metais, em particular são elementos químicos que podem ser encontrados naturalmente na água, no entanto, muitas vezes, são liberados em grandes quantidades por atividades humanas, como mineração e indústrias (CHAPMAN & KIMSTACH, 1992; YABE & OLIVEIRA, 1998). A região de Barcarena por exemplo, possui um importante polo industrial de mineração, incluindo empresas como a Albras e a Alunorte (BARROS, 2009; NASCIMENTO, 2010; SANTOS, 2015), bem como empresas de diversos outros setores, como alimentício e combustíveis (SANTOS, 2015). Ao longo dos anos, essa região tem sido palco de diversos acidentes ambientais, incluindo o derramamento acidental de rejeitos de caulim, que contêm uma grande variedade de metais (FIOCRUZ, 2014). Esses metais têm a capacidade de se acumular nos organismos aquáticos, afetar a saúde da biota e dos seres humanos que se alimentam desses organismos (MORADO *et al.*, 2018; FIOCRUZ, 2014). Adicionalmente, muitos estudos têm observado que a exposição aos metais pode provocar efeitos genéticos e

bioquímicos, especialmente na biota aquática, como demonstrado por diversos autores (GABRIEL et al., 2013; RUITER et al., 2016; CRIBIU, 2018; HU et al., 2021; HARNEY et al., 2022). Portanto, é esperado encontrar alterações genéticas e bioquímica na biota da região de Barcarena e seu entorno.

Na literatura, alterações nos padrões da metilação de DNA em peixes e outros organismos aquáticos têm culminado em implicações na hereditariedade, sobrevivência e nos processos evolutivos das espécies (PUTNAM, 2016; HARNEY et al., 2022; LI et al., 2017; BURGERHOUT et al., 2017). Enquanto a ocorrência de estresse oxidativo, tem demonstrado causar danos a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, podendo causar disfunções metabólicas e apoptose (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015). Dessa forma, verificar os possíveis efeitos da exposição de metais sobre os genes que regulam os padrões de metilação de DNA e sobre o estresse oxidativo é fundamental para avaliar os riscos ambientais e apontar a necessidade de medidas efetivas de prevenção e controle da contaminação em ambientes aquáticos.

1.2 Considerações sobre a família Cichlidae (Ciclídeos)

A família Cichlidae é um grupo monofilético (KAUFMAN & LIEM, 1982) que pertence à ordem Cichliformes na abordagem filogenética (BETANCUR-R *et al.*, 2013). Está subdividida nas subfamílias Etroplinae (Índia e Madagascar), Ptychochrominae (Madagascar), e dos grupos irmãos Cichlinae (região neotropical) e Pseudocrenilabrinae (África) (SPARKS, 2004). Os ciclídeos se distribuem pelos ambientes de água doce da África, o Vale do Jordão no Oriente Médio, o Irã, o sul da Índia, Sri Lanka, Madagascar, Cuba e Hispaniola, a América do Norte, América Central ístmica e a América do Sul, continente onde são conhecidas 291 espécies válidas em 39 gêneros, e com mais da metade delas ocorrendo na bacia amazônica (KULLANDER, 1998;2003). No Brasil, representam cerca de 6% da fauna de peixes de água doce, e com ampla distribuição em território nacional, ocorrendo desde o Norte até o Rio Grande do Sul. Na Amazônia brasileira são peixes muito comuns, e com grande número de espécies, sendo alguns de grande importância na alimentação de populações humanas, tal como o tucunaré (*Cichla* sp.) e o apaiari (*Astronotus* sp.) (FELDBERG, 1985a).

Os ciclídeos são tidos como um grupo natural que se destaca pelo seu grande sucesso evolutivo, e pela elevada taxa de especiação e especialização (KOCHER, 2004). E embora ocorram ocasionalmente em água salgada (NELSON et al., 2016), são considerados peixes dulcícolas, e os mais diversificados do mundo (KULLANDER, 2003), o que para alguns autores é resultado de sua rápida radiação adaptativa, que inclusive, tem como a mais notável ocorrida

entre os vertebrados e dos ciclídeos africanos nos grandes lagos de Malawi, Victoria e Tanganyika, onde em pelo menos 10 milhões de anos surgiram cerca de 2.000 espécies a partir de um único ancestral (KOCHER, 2004; GANTE & SALZBURGER, 2012).

Os ciclídeos neotropicais variam fortemente em comportamento e ecologia (NELSON, 2006), e grande parte apresenta características sexuais dimórficas, além de cuidado parental, com os ovos, e com os filhotes juvenis (KULLANDER, 2003). São predadores territorialistas encontrados nos mais variados habitats, como em margens de rios e igarapés, corredeiras, lagos e florestas alagadas, e quase sempre apresentam preferência por ambientes lênticos (LOWE-MCCONNELL, 1969; 1991).

1.3 Considerações sobre *Geophagus*

Ciclídeos do gênero *Geophagus* possuem ampla distribuição, e estão presentes em diversos países da América do Sul, como Brasil, Uruguai, Guiana, Suriname, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia, e ocorrendo no Panamá (América Central). No Brasil, ocorre nos afluentes da Bacia Amazônica, no rio Xingu desde Cachoeira von Martius até Belo Monte, na bacia do rio Curuá, rio Itapicuru e rio Paraguaçu na costa do estado da Bahia, e ao longo do rio Solimões até ao rio Trombetas (KULLANDER, 2003).

A alimentação das espécies do gênero *Geophagus* é bastante variada, e sua dieta inclui principalmente detritos vegetais, sementes, algas, copépodes (crustáceos), cladóceros (crustáceos) e larvas de dípteros (insetos), que geralmente são encontrados por eles ao fundo e as margens dos ambientes em que vive, dessa forma, não apresentam especialização quanto ao tipo de alimento, e por isso são classificados como organismos eurípagos quanto sua alimentação, entretanto, com predominância alimentar sendo de origem vegetal (HONDA, 1972).

Muitas espécies desse gênero são incubadoras de ovos, e são classificados de acordo com a forma de incubação, podendo ser incubador de substrato ou incubador bucal. Os incubadores de substrato comumente depositam os ovos em ninhos no substrato e ambos os pais cuidam da prole por várias semanas, e até por um tempo quando já atingiram a capacidade de nado. Na incubação bucal o cuidado também é biparental, e os ovos são guardados no substrato, entretanto, somente até a iminência de eclosão, a partir do qual se inicia a incubação bucal dos ovos e posteriormente de larvas. Esta última classificação é bastante observada na maioria das espécies de *Geophagus* (REIS et al., 2003).

1.3.1 *Geophagus surinamensis*

A espécie *Geophagus surinamensis* (**Figura 1**), conhecida pelo nome popular de Acará-tinga (ICMBIO, 2015) é endêmica da América do Sul (PAGE & BURR, 1991), possui distribuição em rios e lagos da bacia amazônica da região norte a nordeste do Brasil (HAUSER & LOPEZ-FERNANDEZ, 2013), apresenta valor comercial destinado a alimentação em muitos estados brasileiros, com importância também no comércio de peixes ornamentais (SOUSA *et al.*, 2020).

O *Geophagus surinamensis* é um animal de hábito diurno (NÚNES & WEIBEZAHN, 1986), considerado sedentário e reconhecido como espécie que não realiza movimentos migratórios (POULSEN & VALBO-JØRGENSEN, 2000; SILVANO *et al.* 2006; NUNES, 2014). Atinge cerca de 30 centímetros de comprimento, apresenta na fase jovem coloração menos intensa em comparação a coloração de sua fase adulta, e habita águas levemente profundas com temperaturas na faixa de 22° e 25°C (PAGE & BURR, 1991). A espécie apresenta dimorfismo sexual secundário com relação a região externa da papila urogenital que é distinta entre os sexos, muito semelhante ao observado nas Tilápias do Nilo (*O. niloticus*), onde na fêmea a papila possui duas aberturas distintas (orifício urinário e a saída do oviduto) enquanto nos machos há somente uma, com função de liberação de sêmen e excreção da urina (SOUSA *et al.*, 2020). O comportamento de *Geophagus surinamensis* em interações agonísticas são diversificadas, sendo o ataque bilateral a única interação que não segue os padrões dos ciclídeos, que consiste basicamente em movimentos rápidos e sucessivos por cima e por baixo de seus oponentes que o permite atacar de diversos ângulos (TERESA & GONÇALVES-DE-FREITAS, 2003).



Figura 1. Exemplar de *Geophagus surinamensis* (Acará-tinga). Fonte: autor

1.4 Ciclo da Metilação do DNA (DNMTs e TETs)

A metilação de DNA é uma marca epigenética relacionada com regulação da expressão gênica, e desempenha função na organização da cromatina, e na inativação de inúmeros genes (MIRANDA & JONES, 2007). A metilação do DNA consiste na adição de grupos metil à citosina de dinucleotídeos CpG, através de reações químicas catalisadas por enzimas DNA metiltransferases (DNMT's), que são classificados como metiltransferases de manutenção (DNMT1), responsáveis por manter o padrão de metilação já existentes no DNA durante a replicação, ou metiltransferases de novo (DNMT3a e DNMT3b), que realizam novas metilações. Quando ocorre em regiões promotoras de genes geralmente reprimem a transcrição e inibem a expressão gênica (CHHABRA, 2015).

Nos dinucleotídeos CpG os padrões de metilação são estabelecidos e mantidos através das DNMT's, que reconhecem os dinucleotídeos CpG hemimetilados, após a replicação do DNA (FEINBERG, 2001). Regiões do DNA muito ricas nessas sequências dinucleotídicas CpG, são denominadas de ilhas CpG (CAIAFA; ZAMPIERI, 2005), e são caracterizadas como regiões genômicas com mais de 500 pares de bases e mais de 55% delas sendo dinucleotídeos GCs (TAKAI; JONES, 2002). Essas ilhas são localizadas majoritariamente em regiões promotoras de genes (BIRD, 2002).

O processo de metilação se inicia com a adição do grupo metil na posição C5 do anel de citosina, levando à formação de 5-metilcitosina (5mc) (CAIAFA; ZAMPIERI, 2005; FAN et al., 2009; KLOSE & BIRD, 2006), também conhecida como 5-metilcitosina (MAIA &

SILVA, 2020), e pode agir como um repressor transcricional do gene através de alguns mecanismos. O primeiro está baseado na adição do radical metil nas citosinas que, por sua vez, modifica o reconhecimento da dupla-hélice pela maquinaria de transcrição, dificultando que as variadas proteínas dessa maquinaria reconheçam as regiões promotoras e demais pontos onde precisam se ligar para a transcrição ocorrer (MAIA & SILVA, 2020). E um segundo mecanismo, é que apesar dos fatores de transcrição (AP-2, cMYC/ MYN, CREB, E2F e NFκB), não se ligarem aos sítios de ligação que iniciam a transcrição, por não a reconhecerem, estes podem ser ocupados por certas proteínas (tal como MeCP-2, MBD1, MBD2, MBD3 e MBD4), que se ligam às citosinas metiladas e promovem a condensação da cromatina, dessa forma, inativando o gene (CAIAFA; ZAMPIERI, 2005; WILSON et al., 2007).

A demetilação do DNA é o mecanismo reverso da metilação, e pode ocorrer de forma ativa ou passiva. A demetilação ativa envolve enzimas desmetilases que ativam genes específicos ou apagam marcas epigenéticas durante o desenvolvimento ou em respostas a estímulos ambientais. As enzimas desmetilases da família *Ten-eleven translocation*, denominadas TET's (TET1, TET2 e TET3), são muito conhecidas por atuarem nesse processo ativo de demetilação (MAIA & SILVA, 2020), processo que consiste na oxidação da 5mc, que leva respectivamente à formação das moléculas hidroximetilcitosina (5hmC), formilcitosina (5fC) e carboxilcitosina (5caC) (HUANG & RAO, 2012). A forma passiva de demetilação não envolve ação de desmetilases, e ocorre quando a manutenção pelas metiltransferases (DNMT's) são inativas durante o ciclo celular (MAIA & SILVA, 2020). O ciclo de metilação e demetilação ocorre conforme ilustrado na **Figura 2**.

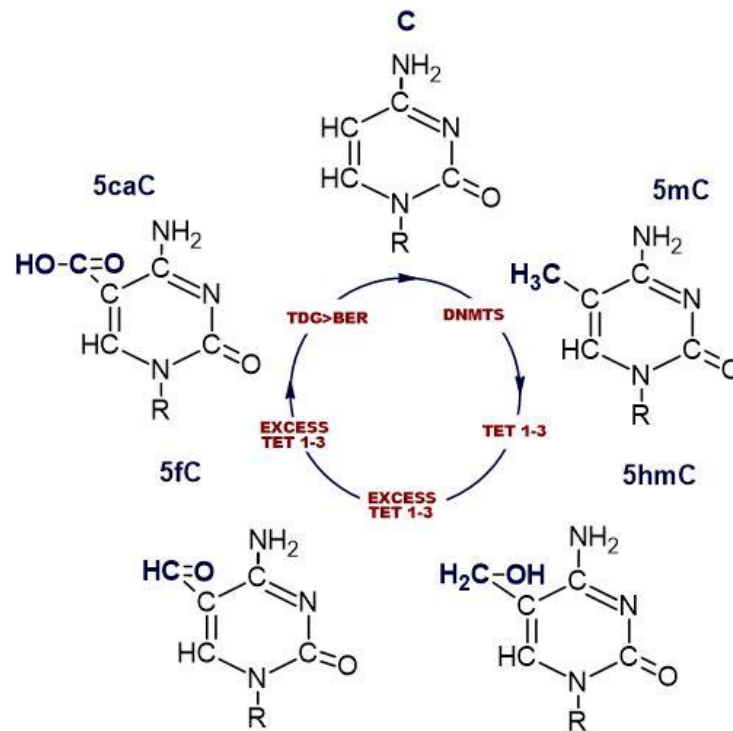


Figura 2. Representação esquemática do ciclo de metilação do DNA indicando a citosina em suas diferentes formas, e enzimas envolvidas no processo. Adaptado de Ivanov et al. (2011)

1.5 Estresse oxidativo (EO) e espécies reativas de oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas naturalmente no organismo ou em eventos patológicos, e são reguladas por um sistema de defesa antioxidante no organismo que inclui mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (STOREY, 1996; MACHADO et al., 2009). No entanto, o desequilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes pode levar à produção excessiva de EROs, resultando no estresse oxidativo (SIES, 1985; PAVANATO & LLESUY, 2008; SIES, 2015). O estresse oxidativo pode causar danos celulares significativos, como a peroxidação lipídica (LPO), na qual os ácidos graxos insaturados das membranas celulares são oxidados, resultando na formação de produtos que danificam o DNA e as proteínas (FORMAN et al., 2008; POLI et al., 2008)

As espécies reativas de oxigênio podem ser moléculas orgânicas ou inorgânicas que possuem átomos com um ou mais elétrons não pareados, e são denominados radicais livres ou EROs pela sua capacidade de existir de maneira independente (WINSTON, 1991; ABDALLA, 1993; FRIDOVICH, 1995). Entre os principais EROs conhecidos tem-se o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($HO\bullet$) que se formam naturalmente pela respiração aeróbica. Em excesso podem causar danos estruturais a biomoléculas como

lipídeos de membrana, DNA, proteínas, carboidratos, entre outros (HAYES, 2005; OLIVEIRA & SCHOFFEN, 2010), contudo, são extremamente importantes no organismo. O superóxido (O_2^-), por exemplo, atua na defesa celular contra infecções oriundas de vírus, bactérias e fungos durante processos inflamatórios (FERREIRA et al., 1997; BARREIROS et al., 2006). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é utilizado por fagócitos na síntese de ácidos hipoalogenosos, que são oxidantes muito efetivos no combate a vírus e bactérias (BARREIROS et al., 2006). E o radical hidroxila ($HO\bullet$) tem papel de defesa contra infecções, quando bactérias estimulam os neutrófilos a produzirem EROs na tentativa de destruir microrganismos (FERREIRA et al., 1997).

Frente aos efeitos danosos de EROs as células dispõem de dois mecanismos principais de defesa antioxidante, uma enzimática e outra não enzimática. A primeira compreende a várias enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e glutaciona-S-transferase (GST). A SOD participa da reação de dismutação do ânion superóxido (O_2^-) convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FRIDOVICH, 1974; BABIOR, 1997). A CAT atua na dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água (BOVERIS & CHANCE, 1973; BARREIROS et al., 2006). O sistema composto por GSH, GPx, em conjunto com GR, também atua na dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, com a glutaciona alternando entre a sua forma oxidada e sua forma reduzida (BARREIROS et al., 2006), conforme a **figura 4**.

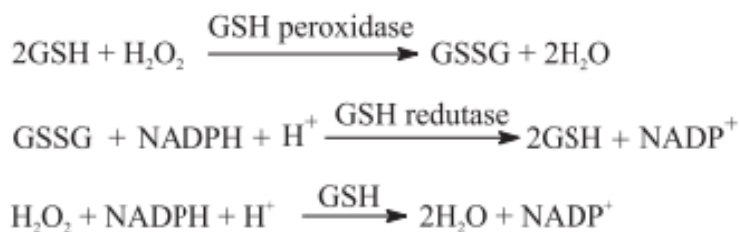


Figura 3. Representação da equação de redução do H_2O_2 a H_2O pela GSH na presença de GPx, e alternância de GSH no processo (Fonte: BARREIROS et al., 2006).

A enzima glutaciona-S-transferase (GST) tem importante papel na detoxificação de xenobióticos e EROs (BAEZ et al., 1997; AWASTHI, 2006; DANTAS, 2010; DI PIETRO et al., 2010). Catalisa a conjugação de GSH com diversificados compostos que são *produzidos in vivo* na presença de stresse oxidativo (FRANKLIN, 2010). Tem ação antioxidante quando

promove conjugação entre radicais livres e a glutatona reduzida (GSH), e de detoxificação quando catalisa a conjugação entre uma molécula exógena de caráter hidrofóbico e GSH no objetivo de aumentar a hidrossolubilidade, fácil excreção e formação de compostos menos tóxicos para o organismo (LEE et al., 2006; OAKLEY, 2011).

Com relação ao mecanismo não enzimático, os antioxidantes são moléculas que atuam bloqueando ou neutralizando a produção dos radicais livres. Destacam-se a glutatona (GSH), a vitamina E (α -tocoferol) e a vitamina C (ácido ascórbico). Destas, a glutatona é a principal, pode ser encontrada na forma de glutatona reduzida (monomérica - GSH) e na forma oxidada (dimérica - GSSG) (MARTINEZ, 2006), conforme a **figura 4**. A GSH é um tripeptídeo formado de ácido γ -glutâmico, cisteína e glicina, atua como co-substrato da GPx na redução de peróxidos orgânicos, tem função no metabolismo da vitamina C, preservando e reduzindo grupos -SH de moléculas endógenas, impedindo a toxicidade de metais como substrato da GST, e evitando danos oxidativos (GIBSON et al., 1993).

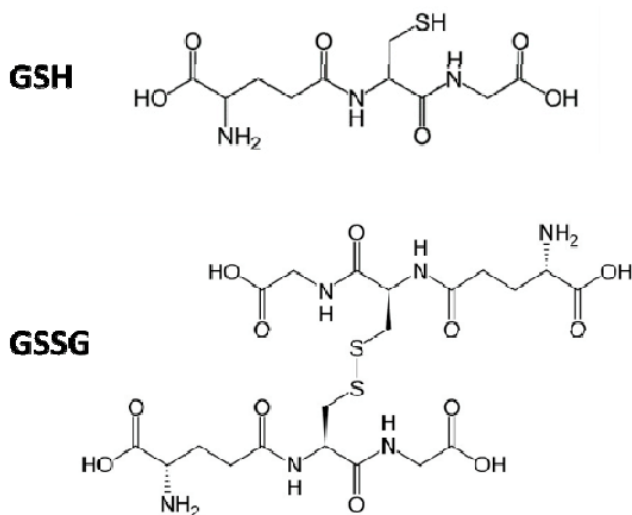


Figura 4. Estruturas químicas da Glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (BERTONI et al , 2019).

Essas enzimas (SOD, CAT, GPX, GSH e GST) do sistema antioxidante são muito utilizadas como biomarcadores do estado oxidativo em diversos organismos (SIES, 1991; ABDALLA, 1993; VUTUKURU et al., 2006; DANTAS, 2010). E podem contribuir eficientemente em estudos de monitoramento dos ambientes aquáticos.

Diante do contexto de poluição ambiental do ecossistema aquático da região de Barcarena e seu entorno pelo despejo de metais, bem como as implicações que estes podem ter na genética e bioquímicas da biota aquática, este trabalho tem como objetivo investigar possíveis alterações na expressão de genes envolvidos na metilação de DNA e nas defesas antioxidantes do peixe *Geophagus surinamensis* coletados da região que sofre influência de atividade mineradora na região de Barcarena (Abaetetuba e Barcarena). Para isso, serão avaliados os níveis da expressão de genes envolvidos com metilação do DNA (DNMTs e TETs) e dois biomarcadores de estresse oxidativo: a atividade enzimática da Glutathione S-transferase (GST) e níveis de peroxidação lipídica (LPO). As possíveis alterações na expressão de genes do ciclo de metilação (DNMTs e TETs), na atividade de GST e nos níveis de lipoperoxidação (LPO) neste peixe, poderão fornecer bases de caracterização de normalidade ou alterações do ambiente aquático, contribuir na avaliação da qualidade ambiental amazônica como base informacional dos impactos antrópicos em ecossistemas aquáticos, bem como na discussão de ações de políticas públicas voltadas à proteção ambiental.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Investigar as possíveis alterações genéticas e bioquímicas em *Geophagus surinamensis* (Acará-tinga) de uma área da Amazônia historicamente impactada por atividade mineradora.

2.2 Específicos

- Avaliar os níveis da concentração de metais em sedimento de fundo;
- Analisar os níveis de expressão de genes do ciclo de metilação do DNA (DNMT3a, TET1-2-3).
- Verificar a atividade enzimática da Glutathione S-Transferase (GST) e determinar os níveis de lipoperoxidação (LPO).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os peixes serão coletados em dois ambientes aquáticos: um impactado por metais devido a atividade mineradora, região de Barcarena (Abaetetuba e Barcarena), e outro historicamente não impactado por metais, a região de Breves. Abaetetuba e Barcarena serão considerados como uma só região para efeito de estudo, onde possivelmente pode-se encontrar alterações genéticas e bioquímicas. A comparação dos resultados obtidos entre as duas regiões poderá fornecer informações que caracterizam a qualidade do ambiente aquático em ambas as regiões.

3.1 Área de estudo

O município de Breves apresenta um clima tropical, sendo considerado pelo método de Köppen e Geiger como clima Af, com significativa ocorrência de pluviosidade durante todo o ano, e com temperatura média anual de 26.8 °C (PARÁ, 2019). Possui uma área de 9.566,572 km², com uma população estimada em 2021 de 104.280 habitantes, está situado na mesorregião de Marajó e microrregião de Furo de Breves, com divisão territorial constituído de 4 distritos: Breves, Antônio Lemos, Curumu e São Miguel dos Macacos (IBGE, 2022). Está limitado geograficamente pelos municípios de Afuá, Anajás, Melgaço, Currealinho, São Sebastião da Boa Vista e Gurupá (PARÁ, 2019).

O município de Barcarena apresenta um clima quente e úmido, sendo considerado pelo método de Köppen como clima de floresta tropical úmida, com ocorrência de precipitação durante todo o ano com temperatura média anual de 25,9° C e umidade relativa média anual em torno de 85% (BANDEIRA, 2006). Possui uma área de 1.310,338 Km², com uma população estimada em 2021 de 129.333 habitantes (IBGE, 2022). Está situado na mesorregião metropolitana de Belém e à microrregião de Belém (NASCIMENTO et al, 2010), e está dividida nas regiões administrativas de Distrito de Murucupi, Estradas e Região das Ilhas, Sede de Barcarena e Vila do Conde (BARCARENA, 2016). Está limitada pela Baía de Marajó e município de Ponta de Pedras, pelo município de Moju, pela Baía do Guajará, e pelo município de Abaetetuba (NASCIMENTO et al, 2010).

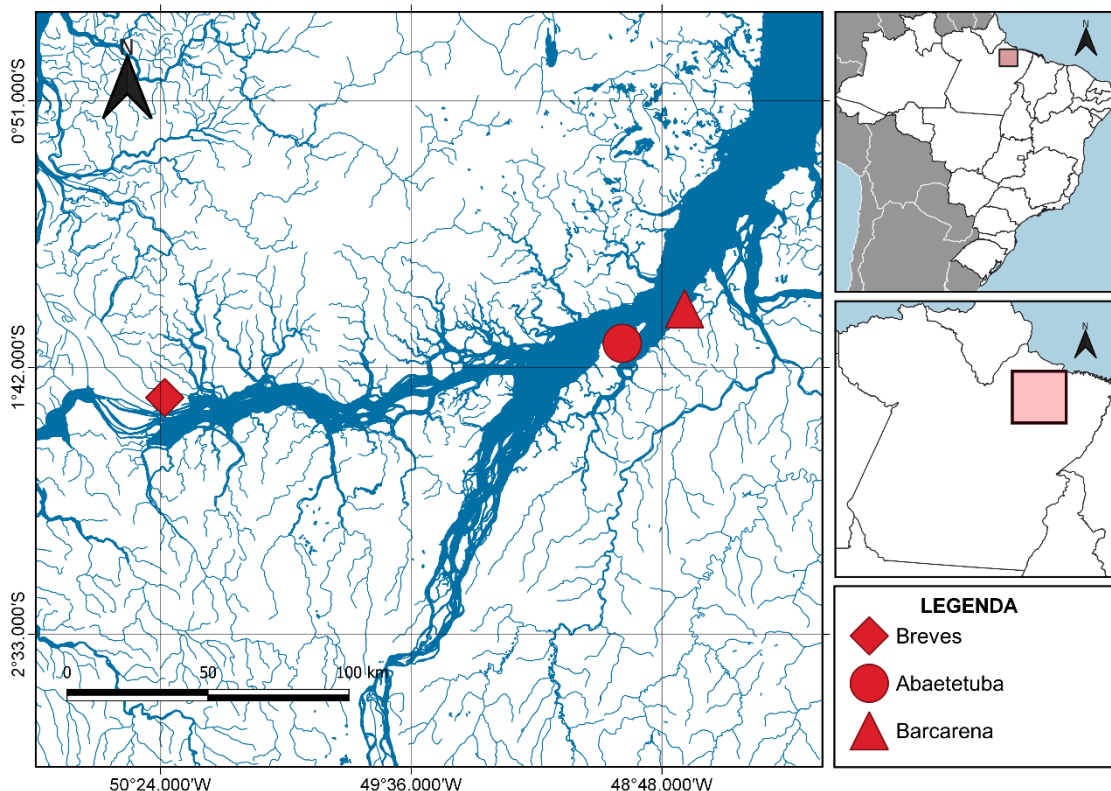


Figura 3. Localização das áreas de coleta dos espécimes adultos de *Geophagus surinamensis*: Breves (Losango); Abaetetuba (Círculo); Barcarena (Triângulo).

3.2 Coleta das amostras

A coleta dos adultos de *Geophagus surinamensis* (Acará-tinga) foram realizadas no ano de 2021 nos meses de março e abril, em pontos localizados nos municípios de Breves, Abaetetuba e Barcarena, estado do Pará, sob a licença de coleta SISBIO 13248. Foi utilizado para captura dos espécimes rede de pesca, com esforço amostral de 12 horas em cada ponto, compreendendo ao período noturno. Foram obtidos 8 espécimes no furo Buiuçu ($1^{\circ}47'45.6''S$ $50^{\circ}23'11.4''W$) da região de Breves, 8 amostras no rio Caripetuba ($1^{\circ}37'23,49''S$ $48^{\circ}55'33''W$) em Abaetetuba, e 8 amostras nas proximidades da praia de Itupanema ($1^{\circ}30'45.8''S$ $48^{\circ}43'39.4''W$) município de Barcarena, totalizando 24 espécimes para a realização dos experimentos conforme a **Tabela 1**. Em todos os pontos amostrados também foi realizada coleta em triplicata de sedimento de fundo para determinação da concentração de metais.

Tabela 1. Número de indivíduos coletados e informações sobre os locais de coleta das amostras de *Geophagus surinamensis*.

Espécie	População	Número de coletas	Coordenadas geográficas
<i>Geophagus surinamensis</i>	Breves	8	1°47'45.6"S 50°23'11.4"W
<i>Geophagus surinamensis</i>	Abaetetuba	8	1°37'23,49"S 48°55'33"W
<i>Geophagus surinamensis</i>	Barcarena	8	1°30'45.8"S 48°43'39.4"W

3.3 Processamento do material biológico

Nos exemplares foram feitas incisões abdominais no sentido caudo-cranial desde a abertura genital até as brânquias, para obtenção dos tecidos de interesse (Fígado, Músculo e Brânquia). As amostras foram congeladas em Nitrogênio líquido e armazenadas em Freezer a -80° C. A escolha de cada tecido foi realizada por associação com a problemática da degradação ambiental e suas implicações. O fígado por estar envolvido com a desintoxicação através de diversas reações (que envolvem acetilação, conjugação, metilação e oxidação) pelos hepatócitos (SCHINONI, 2006). O músculo foi escolhido em função da carne de *Geophagus surinamensis* ser um recurso alimentar utilizado pelas populações humanas (SOUSA et al, 2020) e, portanto, de interesse na saúde pública. E as brânquias foram selecionadas pela capacidade de poder sofrer possíveis alterações funcionais no processo de trocas gasosas devido ao acúmulo de altas concentrações de metais pelo contínuo contato com a água (WEBER et al., 2008; SAKURAGUI et al., 2003).

3.4 Análise da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR)

O RNA foi extraído com PureLink RNA Mini Kit (invitrogen) seguindo informações do fabricante e a quantificação dos ácidos nucleicos foram realizadas com o uso de espectrofotômetro de microplacas da BioTek, modelo EPOCH. Os primers para análise da expressão gênica de enzimas relacionadas com a metilação do DNA (DNMT's e TET's) foram obtidos de um estudo preliminar realizado na espécie de ciclídeo africano *Astatotilapia latifasciata* (CARDOSO et al., 2019). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o High Capacity cDNA Kit, de acordo com as especificações e informações da ThermoFisher Scientific. Um microlitro de cDNA (4 ng/uL) foi amplificado usando-se o kit GoTaqPCR

Master Mix (Promega) e 400 nM de cada primer em um volume final de 20 uL. As condições de ciclagem foram: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Os níveis de expressão gênica foram detectados no sistema StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific). E os dados foram normalizados utilizando o software Q-Gene (Muller et al. 2002; Simon 2003).

3.5 Análise de atividade da Glutathione-S-transferase (GST)

Foi utilizado o tampão de reação (Tampão Fosfato) na concentração de 0,1 mol/L e pH 7,0. A análise de GST foi realizada de acordo com método de HABIG & JAKOBY (1981), o qual avalia a conjugação da Glutathione reduzida (GSH, 1µM) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, 1µM). E a representação dos resultados foi expressa em UGST/mg de proteína.

3.6 Lipoperoxidação (LPO)

Foi utilizado o método de fluorimetria de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para determinar a lipoperoxidação, um processo que pode causar danos celulares por meio da peroxidação de lipídios. Esse método, descrito por Oakes e Kraak (2003), envolve a quantificação do malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica. No ensaio, as amostras foram tratadas com o antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT) e o padrão utilizado foi o 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,8%) em meio ácido (ácido acético 20%) a 95°C, formando o complexo MDA-TBA₂ de cor rosa, que é detectado pelo fluorímetro utilizando comprimentos de ondas de 515 e 553 nm para emissão e excitação, respectivamente. Para separar a fase orgânica da inorgânica, foi utilizado o surfactante Dodecilsulfato de Sódio (SDS, 8,1%) em conjunto com n-Butanol. Os resultados foram expressos em nmol MDA/g de tecido úmido. Em resumo, o método TBARS é uma técnica útil para medir a lipoperoxidação em amostras biológicas, permitindo a avaliação dos níveis de MDA, um indicador de dano celular causado pela peroxidação lipídica.

3.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando comandos específicos em linguagem R compatíveis com o n amostral deste estudo. A normalidade dos dados, quando necessárias, foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. As análises dos dados não paramétricos com três ou mais grupos foram realizadas pelo teste de *Kruskal wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* e ajustado pelo método de *Bonferroni*, considerando um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

4 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados em um capítulo referente ao seguinte artigo:

Avaliação genética e bioquímica em *Geophagus surinamensis* (Teleostei: Cichlidae) de uma área da Amazônia historicamente impactada pela atividade mineradora

CAPÍTULO 1

Avaliação genética e bioquímica em *Geophagus surinamensis* (Teleostei: Cichlidae) de uma área da Amazônia historicamente impactada pela atividade mineradora

ABSTRACT

Os ecossistemas aquáticos amazônicos enfrentam graves problemas de degradação devido a ações antrópicas, como a mineração. Esse tipo de atividade na região do município de Barcarena, no Estado do Pará, tem envolvimento com derramamentos acidentais de rejeitos em rios, como o de caulim, que contém altas concentrações de metais capazes de afetar os organismos aquáticos. O objetivo desta pesquisa foi investigar possíveis alterações genéticas e bioquímicas ocasionadas por esses metais em peixes da região de abrangência da mineração (Abaetetuba e Barcarena). Para tanto, o *Geophagus surinamensis* (Teleostei: Cichlidae) foi selecionado no estudo devido suas características adaptativas e ocorrência abundante na bacia amazônica. Os peixes foram coletados na região de abrangência de mineração e na região de Breves (ambiente historicamente não impactado por metais), e os resultados das avaliações foram comparados entre essas duas regiões. Foram avaliados os níveis da expressão de genes envolvidos com metilação do DNA (DNMTs e TETs) e dois biomarcadores de estresse oxidativo: a atividade enzimática da Glutathione S-transferase (GST) e níveis de peroxidação lipídica (LPO). Inesperadamente, Breves mostrou a maior incidência de manganês em relação à Barcarena. Nessa mesma região, não houve alterações na expressão de DNMTs e TETs nas brânquias, porém, foi observado redução na atividade enzimática de GST. Em contraste, o fígado e músculo mostraram uma maior expressão de TET2, e sem alterações na avaliação de GST e LPO. Em Abaetetuba, houve redução dos níveis de LPO em fígado. Enquanto em Barcarena não houve alterações em ambas as avaliações. De modo geral, esses resultados sugerem que as brânquias demonstram ter uma defesa antioxidante suscetível ao estresse oxidativo, mas não suscetíveis à alteração na expressão gênica. Fígado e músculo, opostamente, demonstraram ter uma defesa antioxidante eficiente, mas suscetíveis à sofrer alterações na expressão gênica que favorecem a demetilação de DNA no perfil epigenético. Esta última, pode ter implicações na hereditariedade, sobrevivência e plasticidade fenotípica que desafiam a perpetuação da espécie. O baixo nível de expressão em pontos de alta incidência do manganês sinalizaram que outros fatores ambientais também podem ter contribuído para mudanças na expressão gênica. As alterações em pontos de maior incidência de manganês (Breves e Abaetetuba), sugere este metal como o responsável pelas observações, porém, não deixa claro a relação direta de tais alterações com as regiões de abrangência da mineração. Por outro lado, a elevada incidência de manganês em Breves sugere que a região esteja sendo impactada por outros tipos de atividades. Esses resultados reforçam a necessidade de monitorar a qualidade da água em áreas expostas à contaminação e a implementação de medidas preventivas para minimizar os impactos da exposição dos metais em organismos aquáticos.

Palavras-chave: metilação do DNA, estresse oxidativo, lipoperoxidação, metais, Amazônia

INTRODUÇÃO

A Amazônia brasileira é detentora da maior rede hidrológica (EVA & HUBER, 2005), e da maior biodiversidade de água doce do mundo (TISSEUIL et al, 2013). Nessa região os peixes representam cerca de 15% de todas as espécies de água doce já descritas (TEDESCO et al, 2017; LEROY et al, 2019), com aproximadamente 2500 já reconhecidas (AMAZON FISH). Embora tenha grande importância no eixo econômico, social e principalmente ambiental pela rica diversidade que possui, a Amazônia sofre com a degradação da qualidade ambiental por meio da inserção de metais (Al, Fe, Zn, Cu, Cd e outros) provenientes do despejo de efluentes domésticos e industriais em seus rios (PEREIRA et al, 2007; PINTO et al, 2009; SILVA et al, 2018; SALES et al, 2021). Esse fato, traz prejuízos para o ecossistema aquático, que têm suas características físicas, físico-químicas e/ou biológicas alteradas (CLARISSE et al., 1999) e para a saúde humana, devido à contaminação por metais em rios amazônicos, especialmente onde se consome peixe (OLIVEIRA et al., 2010; VIEIRA et al., 2013; FAIAL et al., 2015). Nesse sentido, tem-se o ambiente aquático de Barcarena e entornos, que historicamente são impactadas por acidentes envolvendo derramamento de rejeitos com altas concentrações de metais oriundos de atividade mineradora (FIOCRUZ, 2014), o que faz da região um cenário natural ideal para estudo e compreensão dos efeitos da exposição de peixes aos metais, uma vez que estes geram efeitos genéticos como alterações na expressão de genes envolvidos na metilação de DNA (RUITER et al, 2016; HARNEY et al, 2022) e bioquímicos, como o estresse oxidativo nos organismos aquáticos (VILÉLA, 2007).

A metilação é uma marca epigenética que desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica (MIRANDA; JONES, 2007). As principais enzimas envolvidas na metilação de DNA são as DNA-metiltransferases (DNMTs), que adicionam marcas ao código genético, e as Ten-eleven translocations (TETs), que removem essas marcas (CHHABRA, 2015; MAIA & SILVA, 2020). Os altos níveis de DNMTs favorecem a metilação e, conseqüentemente, o silenciamento gênico, enquanto baixos níveis aumentam a expressão (KITADA et al., 2019). Esse aumento também se associa aos níveis de 5-hidroximetilcitosina (FICZ et al, 2011) formadas pela oxidação da 5mC por enzimas TETS através da demetilação (HUANG & RAO, 2012; MAIA & SILVA, 2020). Alterações nos padrões da metilação de DNA de peixes e outros organismos aquáticos em estudos anteriores, implicaram em mudanças no perfil epigenético capazes de desencadear inúmeros efeitos, como plasticidade fenotípica, danos morfológicos, alterações de crescimento e desenvolvimento dos organismos. Tais

alterações podem desempenhar um papel significativo na adaptação da biodiversidade frente às condições ambientais (HOLLIE M, 2016; HARNEY, 2022; LI, 2017; BURGERHOUT, 2017), o que gera grande preocupação e necessidade de estudos.

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a capacidade do organismo de neutralizá-las (SIES, 1991; ABDALLA, 1993; CABISCOL et al, 2000; VALAVANNIDIS et al, 2006). As EROS podem interagir com proteínas, lipídios e DNA, levando a danos celulares e teciduais. Um efeito prejudicial é a peroxidação lipídica (LPO), no qual ácidos graxos insaturados das membranas celulares são oxidados, os produtos gerados causam danos ao DNA e proteínas (FORMAN et al., 2008; POLI et al., 2008). A metabolização de xenobióticos é uma das principais fontes EROs no organismo (STEGEMAN et al, 1992). A enzima Glutathione S-transferase (GST) é catalisadora da conjugação de Glutathione (GSH) com inúmeros compostos que são produzidos *in vivo* em situações de estresse oxidativo, sua avaliação contribui na verificação do estado oxidativo em tecidos (THOMPSON, 2010). Estudos dessa natureza são imprescindíveis tendo vista que EROs são danosos a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, podendo causar disfunções metabólicas e até apoptose (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015).

Considerando os efeitos genéticos e bioquímicos que os metais podem trazer para comunidade aquática, especialmente em peixes, o objetivo deste trabalho foi investigar possíveis alterações na expressão de genes envolvidos na metilação de DNA e nas defesas antioxidantes na espécie de peixe *Geophagus surinamensis*, coletados nos ambientes aquáticos que sofrem influência de atividade mineradora. As possíveis alterações na expressão de genes do ciclo de metilação (DNMTs e TETs), na atividade de GST e nos níveis de lipoperoxidação (LPO) neste peixe, poderão fornecer bases de caracterização de normalidade ou alterações do ambiente aquático, contribuir na avaliação da qualidade ambiental amazônica como base informacional dos impactos antrópicos em ecossistemas aquáticos, bem como na discussão de ações de políticas públicas voltadas à proteção ambiental.

MATERIAL E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado de forma comparativa entre amostras obtidas de pontos localizados nos municípios de Breves, Abaetetuba e Barcarena, no estado do Pará, Brasil. Breves apresenta um clima tropical, considerado pelo método de Koppen e Geiger como clima Af, ou seja, quente e úmido ao longo do ano, com significativa precipitação durante todo o ano, e com temperatura média anual de 26.8 °C (PARÁ, 2019), abrange uma área de 9.566,572 km², e está localizado na mesorregião de Marajó e microrregião de Furo de Breves (IBGE, 2022). Barcarena apresenta um clima quente e úmido, considerado pelo método de Koppen e Geiger como clima de floresta tropical úmida, com precipitação durante todo o ano, e com temperatura média anual de 25,9° C (BANDEIRA, 2006), abrange uma área de 1.310,338 Km² (IBGE, 2022), e localiza-se na mesorregião metropolitana de Belém e à microrregião de Belém (NASCIMENTO et al, 2010). O município de Abaetetuba apresenta um clima equatorial, considerado pelo método de Koppen e Geiger como clima Am, ou seja, quente e úmido, com precipitação frequente de janeiro a junho, e temperatura média anual de 27 °C (INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2013), abrange uma área de 1.610,654 km², e localiza-se na microrregião de Cameté e mesorregião do Nordeste Paraense (IBGE, 2022), situado ao lado da cidade de Barcarena.

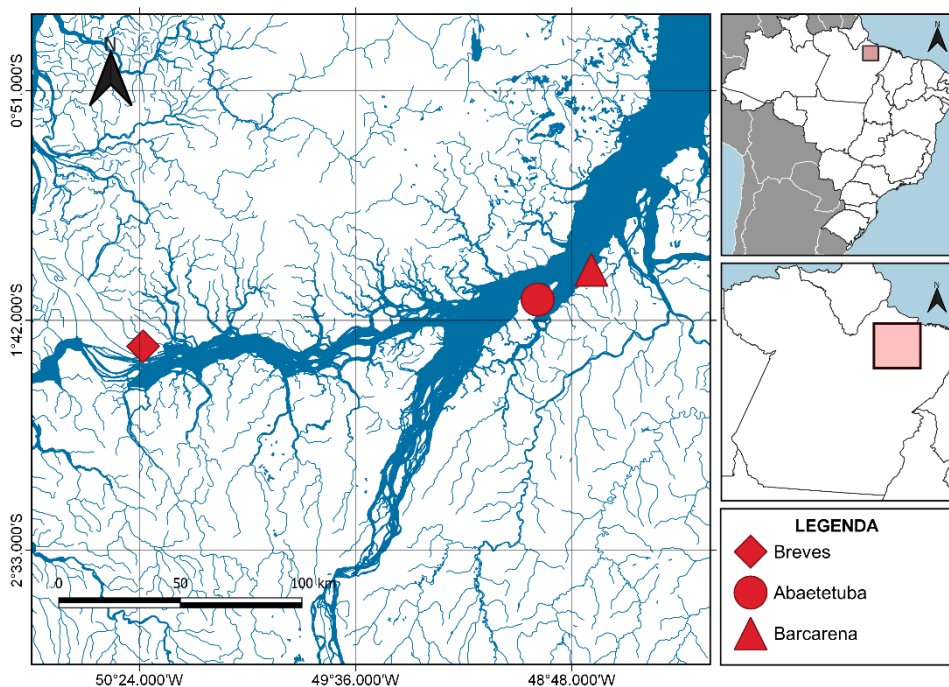


Figura 3. Localização dos pontos de coleta dos espécimes. Breves (**Losango**); Abaetetuba (**Círculo**) e Barcarena (**Triângulo**) no estado do Pará.

COLETA DAS AMOSTRAS

A coleta dos adultos de *Geophagus surinamensis* (Acará-tinga) foram realizadas no ano de 2021 nos meses de março e abril, em pontos localizados nos municípios de Breves, Abaetetuba e Barcarena, estado do Pará, sob a licença de coleta SISBIO 13248. Foi utilizado para captura dos espécimes rede de pesca, com esforço amostral de 12 horas em cada ponto, compreendendo ao período noturno. Foram obtidos 8 espécimes no furo Buiucu (1°47'45.6"S 50°23'11.4"W) da região de Breves, 8 amostras no rio Caripetuba (01°37'23,49"S 048°55'33"W) em Abaetetuba, e 8 amostras nas proximidades da praia de Itupanema (1°30'45.8"S 48°43'39.4"W) município de Barcarena, totalizando 24 espécimes para a realização dos experimentos. Em todos os pontos amostrados também foi realizada coleta em triplicata de sedimento de fundo para determinação da concentração de metais.

PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Nos exemplares foram feitas incisões abdominais no sentido caudo-cranial desde a abertura genital até as brânquias, para obtenção dos tecidos de interesse (Fígado, Músculo e Brânquia). As amostras foram congeladas em Nitrogênio líquido e armazenadas em Freezer a -80° C. A escolha de cada tecido foi realizada por associação com a problemática da degradação ambiental e suas implicações. O fígado por estar envolvido com a desintoxicação através de diversas reações (que envolvem acetilação, conjugação, metilação e oxidação) pelos hepatócitos (SCHINONI, 2006). O músculo foi escolhido em função da carne de *Geophagus surinamensis* ser um recurso alimentar utilizado pelas populações humanas (SOUSA et al, 2020) e, portanto, de interesse na saúde pública. E as brânquias foram selecionadas pela capacidade de poder sofrer possíveis alterações funcionais no processo de trocas gasosas devido ao acúmulo de altas concentrações de metais pelo contínuo contato com a água (WEBER et al., 2008; SAKURAGUI et al., 2003).

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

O RNA foi extraído com PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) seguindo informações do fabricante e a quantificação dos ácidos nucleicos foram realizadas com o uso de espectrofotômetro de microplacas da BioTek, modelo EPOCH. Os primers para análise da expressão gênica de enzimas relacionadas com a metilação do DNA (DNMT's e TET's) foram obtidos de um estudo preliminar realizado na espécie de ciclídeo africano *Astatotilapia latifasciata* (CARDOSO et al., 2019). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o High Capacity cDNA Kit, de acordo com as especificações e informações da ThermoFisher Scientific. 1 microlitro de cDNA (4 ng/uL) foi amplificado usando-se o kit GoTaqPCR Master Mix (Promega) e 400 nM de cada primer em um volume final de 20 uL. As condições de ciclagem foram: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Os níveis de expressão gênicas foram detectados no sistema StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific). E os dados foram normalizados utilizando o software Q-Gene (Muller et al. 2002; Simon 2003).

ANÁLISE DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

Foi utilizado o tampão de reação (Tampão Fosfato) na concentração de 0,1 mol/L e pH 7,0. A análise de GST foi realizada de acordo com método de HABIG & JAKOBY (1981), o qual avalia a conjugação da Glutathiona reduzida (GSH, 1µM) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, 1µM). E a representação dos resultados foi expressa em UGST/mg de proteína.

LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

Foi utilizado o método de fluorimetria de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para determinar a lipoperoxidação, um processo que pode causar danos celulares por meio da peroxidação de lipídios. Esse método, descrito por Oakes e Kraak (2003), envolve a quantificação do malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica. No ensaio, as amostras foram tratadas com o antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT) e o padrão utilizado foi o 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,8%) em meio ácido (ácido acético 20%) a 95°C, formando o complexo MDA-TBA₂ de cor rosa, que é detectado pelo fluorímetro utilizando comprimentos de ondas de 515 e 553

nm para emissão e excitação, respectivamente. Para separar a fase orgânica da inorgânica, foi utilizado o surfactante Dodecilsulfato de Sódio (SDS, 8,1%) em conjunto com n-Butanol. Os resultados foram expressos em nmol MDA/g de tecido úmido. Em resumo, o método TBARS é uma técnica útil para medir a lipoperoxidação em amostras biológicas, permitindo a avaliação dos níveis de MDA, um indicador de dano celular causado pela peroxidação lipídica.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando comandos específicos em linguagem R compatíveis com o n amostral deste estudo. A normalidade dos dados, quando necessárias, foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. As análises dos dados não paramétricos com três ou mais grupos foram realizadas pelo teste de *Kruskal wallis* seguido do pós-teste de *Dunn* e ajustado pelo método de *Bonferroni*, considerando um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

METAIS EM SEDIMENTOS DE FUNDO

Foram avaliados os níveis da concentração de metais em sedimentos de fundo amostrados nos pontos de Breves, Abaetetuba e Barcarena. Com relação ao Al (Alumínio) e Fe (Ferro), os níveis de concentração entre os grupos amostrais não diferem significativamente. As concentrações de Ba (Bário) e Ni (Níquel) apesar de demonstrar ser superior no grupo de Breves em comparação a Barcarena, estatisticamente não diferem, no entanto, foi observado diferenças estatísticas significativas nos níveis de Mn (Manganês) entre os grupos de Breves e Barcarena ($p = 0,0219$; $\alpha = 0,05$), de forma que Breves demonstrou maior concentração de Mn (Manganês) em comparação a Barcarena. Além disso, foi observado baixas concentrações de (Cromo) e As (Arsênio), além de traços de Pb (Chumbo), ambos com diferenças não significativas entre os grupos (**Figura 5**).

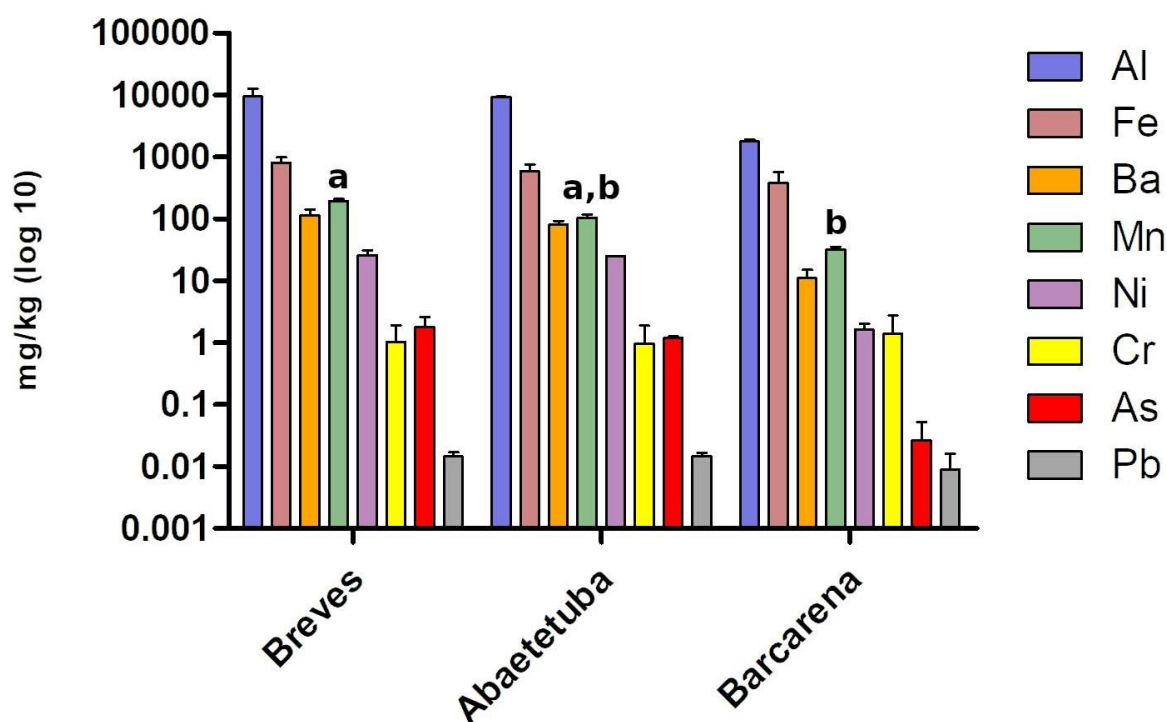


Figura 5. Concentração de metais e semimetais (mg/kg) nos sedimentos de fundo coletados em Breves, Abaetetuba e Barcarena, no estado do Pará. As letras (a) e (b) entre si, indicam a existência de diferença significativa entre os grupos. Os valores-*p* foram determinados pelo teste estatístico *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn*, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

EXPRESSÃO DE GENES DO CICLO DE METILAÇÃO DO DNA

Foram avaliados os níveis de expressão dos genes responsáveis pela metilação (DNMT3a) e demetilação (TET1, TET2 e TET3) de DNA, nos tecidos de brânquia, fígado e músculo de *Geophagus surinamensis* nas amostras de Breves, Abaetetuba e Barcarena. Em brânquia, a análise de variância demonstrou que não há diferença estatística nos níveis de expressão dos genes DNMT3a, TET1, TET2 e TET3 entre os grupos amostrais (**Figura 4A**). No fígado, foi observada tendência de menor expressão do gene TET1 na amostra de Barcarena em comparação com os outros dois pontos analisados, mas não foi significativo. Para os genes DNMT3a e TET3 não foram encontradas diferenças significativas, no entanto, o gene TET2 demonstrou menor expressão na amostra de Abaetetuba em comparação com Breves e Barcarena ($p = 0,0027$; $\alpha = 0.05$) (**Figura 4B**). No músculo, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas para os genes DNMT3a, TET1 e TET3 entre os grupos, no entanto, foi observada diminuição nos níveis de expressão do gene TET2 em Abaetetuba em

comparação com Breves ($p = 0,01$; $\alpha = 0,05$). Além disso, foi registrada uma tendência de redução na expressão de TET2 em Barcarena em comparação com Breves, mas não foi estatisticamente significativo (**Figura 4C**).

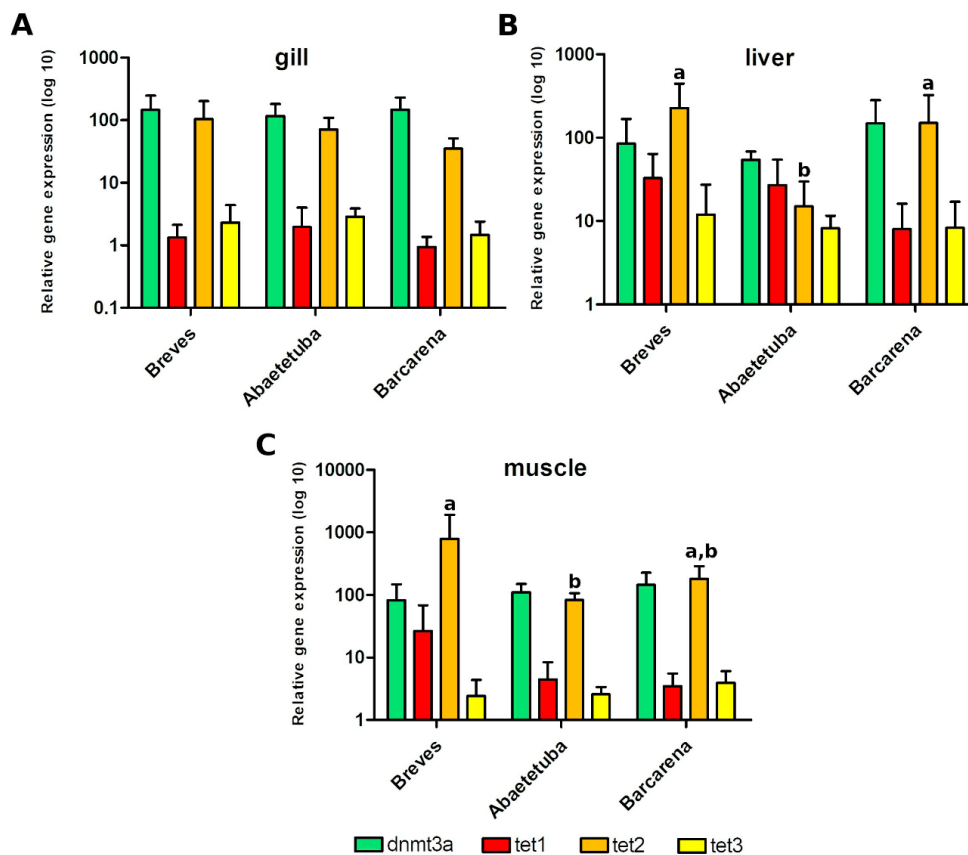


Figura 4. Expressão de genes do ciclo de metilação (DNMT3a, TET1, TET2 e TET3) em amostras de brânquia (**A**), fígado (**B**) e músculo (**C**) de *Geophagus surinamensis* de Breves, Abaetetuba e Barcarena, no estado do Pará, obtidos por análise de RT-qPCR. As letras (**a**) e (**b**) entre si, indicam a existência de diferença significativa entre os grupos. Os valores-*p* foram determinados pelo teste estatístico *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn*, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA Glutathiona S-Transferase (GST)

Foi avaliada a atividade da enzima Glutathiona S-Transferase (GST) nos tecidos de brânquia, fígado e músculo de *Geophagus surinamensis* coletados em Breves, Abaetetuba e Barcarena, no estado do Pará. Em brânquia, foi observado que existe diminuição na atividade enzimática da GST em Breves em comparação com Abaetetuba ($p = 0.004$; $\alpha = 0,05$). No fígado, foi observado aparente aumento da atividade enzimática da GST em Barcarena em

comparação com Breves, mas essa diferença não foi confirmada estatisticamente. Enquanto no músculo, apesar do grupo de Breves demonstrar maior atividade em comparação com Barcarena, não houve diferenças estatísticas significativas para atividade de GST.

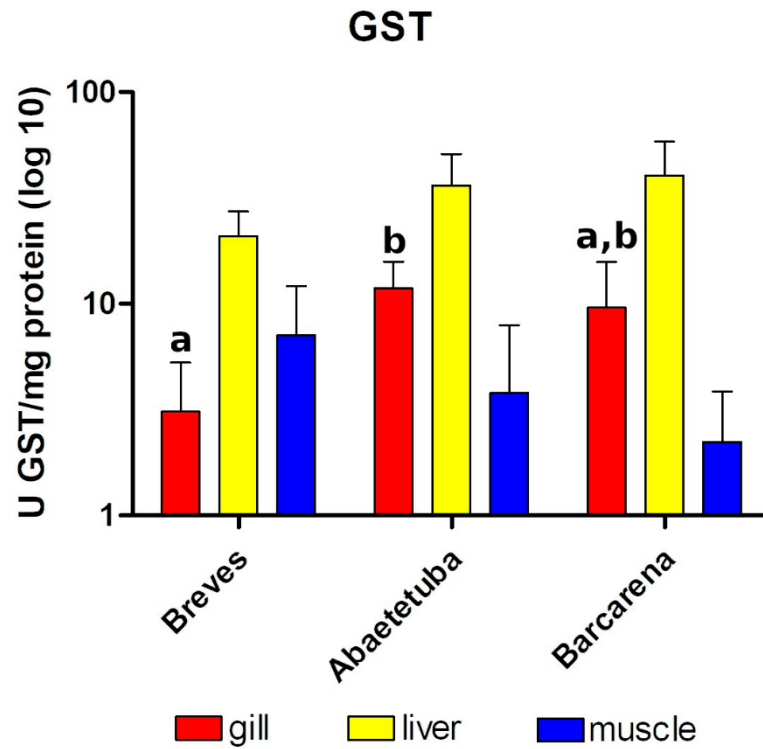


Figura 6. Atividade enzimática da Glutathione S-Transferase (mg de proteína) nos tecidos de brânquia, fígado e músculo de *Geophagus surinamensis* coletados em Breves, Abaetetuba e Barcarena, no estado do Pará. As letras (a) e (b) entre si, indicam a existência de diferença significativa entres os grupos. Os valores-p foram determinados pelo teste estatístico *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn*, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

Foi avaliado a lipoperoxidação (LPO) nos tecidos de brânquia, fígado e músculo de *Geophagus surinamensis* coletados em Breves, Abaetetuba e Barcarena, no estado do Pará. Em brânquia e músculo, não foi observado alterações significativas entre os grupos. No entanto, foi observado no fígado, diminuição nos níveis de lipoperoxidação nas amostras de Abaetetuba em comparação com Breves ($p = 0,0452$; $\alpha = 0,05$) e Barcarena ($p = 0,000278$; $\alpha = 0,05$).

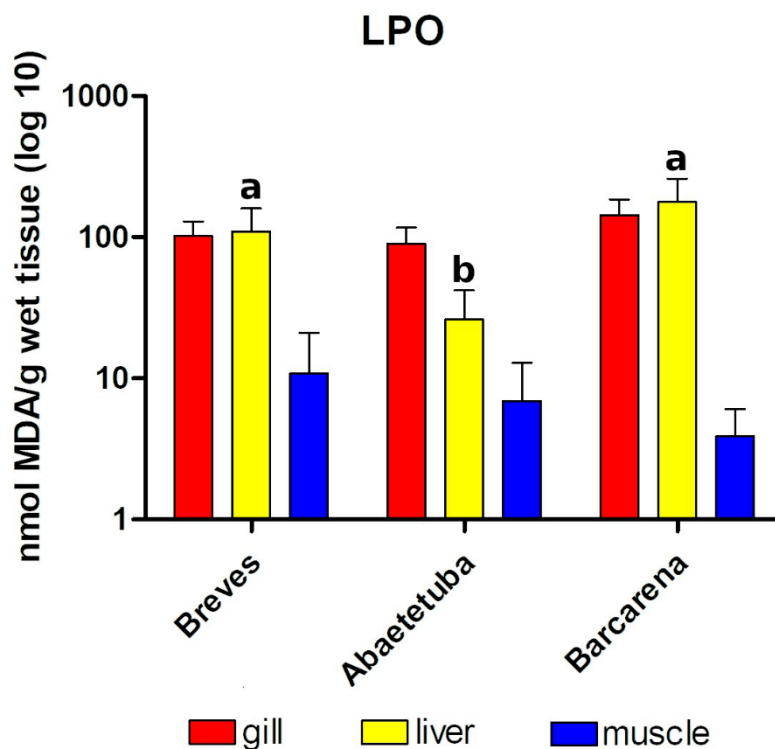


Figura 7. Avaliação de LPO (nmol MDA/g) nos tecidos de brânquia, fígado e músculo de *Geophagus surinamensis* coletados em Breves, Abaetetuba e Barcarena, no estado do Pará. As letras (a) e (b) entre si, indicam a existência de diferença significativa entre os grupos. Os valores-p foram determinados pelo teste estatístico *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn*, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

DISCUSSÃO

Barcarena é uma região que abriga diversas atividades econômicas, incluindo a mineração, apontada como uma grande causadora de impactos ambientais. A atividade tem um histórico extenso de acidentes envolvendo o derramamento de rejeitos em rios e igarapés, como o de caulim, que resultaram em contaminação do ambiente aquático e impactos em outras localidades, como no município de Abaetetuba (FIOCRUZ, 2014). O rejeito de caulim, contém altos níveis de metais que podem provocar efeitos genéticos e bioquímicos, especialmente na biota aquática, como demonstrado por vários autores (GABRIEL et al, 2013; CRIBIU, 2018; HU et al, 2021; HARNEY et al, 2022). Coerentemente, neste estudo, foi constatado um perfil elevado de metais no ambiente aquático de Barcarena, porém, semelhante aos demais pontos analisados. Outros rios impactados por minérios também foi observado concentrações altas de metais, incluindo o manganês, sugerindo riscos potenciais de citotoxicidade e danos ao DNA (SEGURA et al, 2019). Estes dados são preocupantes, pois indicam a presença de metais em níveis discordantes da legislação ambiental brasileira, apontam o risco de danos genéticos e bioquímicos sobre a comunidade aquática, e a necessidade de medidas para avaliar a extensão dos danos causados em áreas impactadas por atividades de mineração. Para investigar os possíveis efeitos dos metais na região de Barcarena (Abaetetuba e Barcarena), foi avaliado a expressão de genes envolvidos na metilação do DNA (DNMTs e TETs), atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST) e níveis de lipoperoxidação (LPO) em *Geophagus surinamensis* coletados nas áreas de influência da mineração, comparando-as com resultados da região de Breves, região historicamente não impactada por metais (ALVES, 2020).

Em oposição ao esperado, a região de Breves apresentou elevadas concentrações de manganês, a maior dentre os pontos avaliados. Abaetetuba, demonstrou um perfil de concentração de manganês semelhante, enquanto Barcarena em que se esperava uma maior concentração mostrou a menor dentre estas. De acordo com o IBGE (2023), Breves não possui sistema de tratamento de esgoto, nem de tratamento de efluentes de atividade antrópica, o que pode ter contribuído para o acúmulo do metal nas águas desta região. Tal fato, instiga pesquisas futuras sobre atividades que possam ter contribuído para o aumento deste metal no ecossistema aquático, e de outros fatores possíveis.

Sabe-se que em pequenas quantidades o manganês é essencial para as funções fisiológicas dos organismos vivos. Contudo, altas concentrações, provenientes de efluentes antropogênicos e de mineração, quando descartados em corpos d'água podem ter impactos

significativos no ambiente aquático, afetando os organismos que nele vivem, e os que dependem dela para sobreviver (CHAPMAN & KIMSTACH, 1992). Dentre os impactos, estudos têm sugerido que os metais podem afetar a metilação do DNA em plantas, peixes e mamíferos, incluindo seres humanos (TAKIGUCHI et al., 2003; SCIANDRELLO et al., 2004; DING et al, 2019; MONTES-CASTRO et al, 2019; BIAN & GAO, 2021), o que representa um risco aos variados seres vivos. Nesse contexto, as enzimas DNMTs e TETs, são as principais envolvidas nos níveis de metilação do DNA, exercendo importante papel na regulação da expressão gênica (MIRANDA & JONES, 2007; MAIA & SILVA, 2020). Estudos anteriores mostraram que a exposição de peixes ao cádmio e chumbo, por exemplo, resultaram em diminuição na metilação global do DNA associados com alterações na expressão dessas enzimas (SANCHEZ et al, 2017; HU et al, 2021).

Analogamente, outros estudos evidenciaram alterações na metilação do DNA de outros organismos, mas em resposta ao manganês (OGNIK et al, 2018; MONTES-CASTRO et al, 2019). Na pesquisa atual, a expressão de TET2 (a mais elevada entre os pontos) observada no fígado e músculo dos peixes coletados em Breves, ambiente com maior incidência de manganês, sugere que esse metal também pode estar desempenhando um papel na regulação da expressão gênica. Além disso, a expressão do gene codificador da enzima TET2, responsável por remover marcas epigenéticas de DNA (MAIA & SILVA, 2020), pode indicar a existência de demetilação do perfil epigenético em fígado e músculo do *Geophagus surinamensis* de Breves. Vale ressaltar, que a observância de redução na metilação global do DNA associados a alterações na expressão de DNMT3 e DNMT4 em resposta ao chumbo em outro estudo (SANCHEZ et al., 2017), instiga pesquisas adicionais sobre a contribuição de DNMTs nos resultados obtidos com manganês, especialmente a DNMT3b não avaliada, que pode ter sofrido redução da expressão também contribuindo para a demetilação. Contudo, permanece incerto a medida que a expressão de TET2 está realmente contribuindo para as mudanças na metilação do DNA, sendo necessários avaliações da metilação nos tecidos para melhor compreensão. Em brânquias das regiões estudadas não foram observadas alterações genéticas. Sabe-se que este órgão exerce um importante papel na eliminação de metais (ABRIL et al, 2018), o que pode provavelmente ter contribuído para minimizar os efeito genéticos dos metais neste tecido.

Em Abaetetuba, não ficou claro a baixa expressão de TET2 de fígado e músculo no ambiente com alta incidência de manganês (mesmo perfil de Breves). Talvez a diferença de concentração entre Breves e Abaetetuba, respectivamente, 195,5 mg.L⁻¹ e 105,5 mg.L⁻¹,

evidencie um efeito sobre TET2 que depende do nível de exposição. Porém, sabendo que outros fatores ambientais podem influenciar na expressão desse gene, como temperatura, salinidade, pH e vários poluentes (PUTNAM, 2016; BURGERHOUT, 2017; LI, 2017; HARNEY, 2022), são necessárias análises complementares para melhor compreensão deste resultado. No fígado da população de Barcarena, a semelhança da expressão de TET2 em ambiente com perfis de exposição distintos (Breves \neq Barcarena), também sugere a contribuição de outros fatores nessa observação, demonstrando que a importante função de desintoxicação desse tecido (SCHINONI, 2006), pode não ter sido eficiente para evitar o possível dano epigenético por outros poluentes. No músculo, por sua vez, a similaridade estatística da expressão de TET2 em relação aos demais pontos (Breves e Abaetetuba), pode indicar que a exposição ao manganês e de outros fatores ambientais, não foi significativo para causar efeitos genéticos neste tecido.

Além dos efeitos na expressão dos genes, os metais também podem induzir o estresse oxidativo, como observado em humanos e peixes (HIRAO-SUZUKI et al., 2021; VILÉLA, 2007). Diante disso, foi avaliado a atividade da GST e níveis de MDA nos peixes coletados em Breves, Abaetetuba e Barcarena, para comparar os estados oxidativos. Como mencionado, Breves demonstrou maior incidência de manganês em comparação a Barcarena. Sabe-se que este metal pode afetar a capacidade pró-oxidante e provocar estresse oxidativo (ONO et al., 2002; ZHANG et al., 2008; HUANG et al. 2011). Porém, em peixes expostos à uma concentração pequena de manganês já foi observado um aumento na atividade da GST no fígado (GABRIEL et al, 2013), indicativo que a capacidade antioxidante se eleva em resposta a esse contaminante, combatendo o estresse oxidativo. Neste estudo, tal elevação não foi clara, mas tal fato somado a homogeneidade na atividade de GST entre Breves e Barcarena sugere que a defesa antioxidante em fígado *do Geophagus surinamensis* responde igual e eficientemente bem ao manganês, mesmo nas altas concentrações de Breves e Abaetetuba. No músculo tal homogeneidade, possivelmente está associada a eficiência antioxidante, mas investigações adicionais são necessárias para melhor compreensão. Além disso, dado um mesmo perfil de exposição entre Breves e Abaetetuba, a avaliação de LPO em fígado de Abaetetuba corrobora a eficiência antioxidante do fígado ao manganês, pois demonstrou redução nos níveis de lipoperoxidação. A diminuição do MDA pode indicar que o fígado está conseguindo neutralizar as EROS, reduzindo o estresse oxidativo. Diferindo de observações em ratos, onde a exposição ao manganês levou ao aumento de MDA e LPO, resultando em lesão hepática. (HUANG et al, 2011), o que sugere uma toxicidade distinta do manganês entre

diferentes organismos. Nos peixes, alterações inicialmente tendem a ocorrer nas brânquias, principal local onde os metais agem devido à grande superfície de contato e permeabilidade, o que as torna altamente suscetíveis às alterações ambientais causadas pelos metais (BONGA, 1997). Isso foi observado nas brânquias da população de Breves, a atividade de GST foi significativamente menor em comparação aos demais pontos, indicativo que houve diminuição da defesa antioxidante e possível ocorrência de estresse oxidativo nesse tecido. Outros estudos não mostraram alterações de GST em concentrações bem menores de manganês (GABRIEL et al, 2013), talvez os efeitos oxidativos em brânquias varie em função do nível de exposição. Desse modo, é possível que o nível elevado de manganês esteja causando estresse oxidativo observado nas amostras de brânquias de Breves, interessantemente afetando a brânquia em nível bioquímico, mas não em nível genético.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados evidenciaram que *Geophagus surinamensis* pode estar sofrendo alterações na expressão gênica e estresse oxidativo sob influência do manganês presente em ambiente aquático. De modo geral, o fígado e músculo expostos ao manganês disponível no ambiente, demonstraram ter uma defesa antioxidante eficiente para evitar estresse oxidativo, entretanto, parecem ser suscetíveis a sofrer alterações na expressão gênica. Enquanto as brânquias mostraram ser suscetíveis ao estresse oxidativo, porém parecem mais resistentes a sofrer alterações na expressão gênica. O baixo nível de expressão em pontos de alta incidência do manganês, sinalizaram que outros fatores ambientais também podem ter contribuído com mudanças na expressão gênica. Além disso, as observações estiveram relacionadas com regiões de elevada incidência de manganês, não havendo relação direta entre essas alterações com regiões de abrangência das atividades de mineração, como Abaetetuba e Barcarena. Contudo, os resultados reforçam a necessidade de monitorar a qualidade da água em áreas expostas à contaminação, e a implementação de medidas preventivas para minimizar os impactos negativos da exposição dos metais em organismos aquáticos e na saúde humana.

6 REFERÊNCIAS

ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes: conceitos e perspectivas terapêuticas. ARS CVRANDI (Manual da Conduta da Clínica Médica) - A revista da clínica médica, p. 141-164, Nov/Dez, 1993.

ABRIL, S. I. M. et al. Metal accumulation and expression of genes encoding for metallothionein and copper transporters in a chronically exposed wild population of the fish *Hypessobrycon luetkenii*. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, [S.L.], v. 211, p. 25-31, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.05.008>.

ALHAMWE A. et al. Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2018; 14:39. doi:10.1186/s13223-018-0259-4.

ALVES, O. J. A. Desterritorialização produtiva no Marajó: análises geográficas no município de Breves pós-declínio da atividade madeireira (2000-2015). Belém: GAPTA/UFPA, 2020. E-book (126 p.). Disponível em: <https://livroaberto.ufpa.br/jspui/handle/prefix/924>. Acesso em: 12 de abril de 2022.

AMAZON FISH. Home Page. [S.l.], [s.d.]. Disponível em: <https://www.amazon-fish.com/>. Acesso em: 15 fev. 2023.

AUGUSTO, O. Metabolismo de Xenobióticos: Formação de Radicais de Carbono e suas implicações Terapêuticas e Toxicológicas. Tese de Livre docência apresentada ao departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

AWASTHI, Y. C. *Toxicology of Glutathione Transferases*. 1. ed. Texas: CRC Press, 2006.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, p. 141-155, 1997.

BAEZ, S.; SEGURA-AGUILAR, J.; WIDERSTEN, M.; JOHANSSON, A.; MANNERVIK, B. Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o- quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochemical Journal*, v. 324, p. 25-28, 1997.

BANDEIRA. ÍRIS C. N. Características Hidrogeológicas de Barcarena/Pa, como base para o Planejamento Urbano Municipal. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Pará, 2006.

BANDEIRA. ÍRIS C. N. Características Hidrogeológicas de Barcarena/Pa, como base para o Planejamento Urbano Municipal. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Pará, 2006.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011; 21(3):381-395. doi: 10.1038/cr.2011.22.

BARCARENA. **Plano Diretor do Desenvolvimento Urbano de Barcarena (PDDUB)**. 2016. Disponível em: https://issuu.com/agenda2030barcarena/docs/pddu_2016-2026. Acesso em: 21 de março de 2022.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROS, D.; BARBIERI, E. 2012 Análise da ocorrência de metais: Ni, Zn, Cu, Pb e Cd em ostras (*Crassostrea brasiliana*) e sedimentos coletados no Estuário de Cananeia-SP (Brasil). *O Mundo da Saúde*. 2012; 36(4): 635-642. doi:10.15343/0104-7809.2012364635642.

BARROS, Márcio Júnior Benassuly. *Mineração, finanças públicas e desenvolvimento local no município de Barcarena-Pará*. 2009. 141f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Programa de Pós-Graduação em Geografia, Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

BERTONI, S. et al. Glutathione-Loaded Solid Lipid Microparticles as Innovative Delivery System for Oral Antioxidant Therapy. *Pharmaceutics*, 11(8), 364–. doi:10.3390/pharmaceutics11080364. (2019).

BETANCUR-R., R., R. E.; BROUGHTON, E. O.; WILEY, K.; CARPENTER, J. A.; LOPEZ, C.; LI, N. I.; HOLCROFT, D.; ARCILA, M.; SANCIANGCO, J.; CURETON, F.; ZHANG, T.; BUSER, M.; CAMPBELL, T.; ROWLEY, J. A.; BALLESTEROS, G.; LU, T.; GRANDE, G.; ARRATIA, G.; ORTÍ. The tree of life and a new classification of bony fishes. *PLoS Currents Tree of Life*. p. 1-28, 2013. Apr 18. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23653398>. doi:10.1371/currents.tol.53ba26640df0ccaee75bb165c8c26288.

BIAN, X.; GAO, Y. (2021). DNA methylation and gene expression alterations in zebrafish embryos exposed to cadmium. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-021-12691-6.

BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.

BOVERIS, A., CHANCE, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 134, 707-16.

BRASIL, 2020. Lei 6.938, de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências.

BURGERHOUT, Erik et al. Genetic background and embryonic temperature affect DNA methylation and expression of myogenin and muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Plos One*, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 0179918, 29 jun. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0179918>.

BUSCHBECK, M; HAKE, S. B. Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Molecular cell biology*. 2017; 18 (5): 299-314. doi:10.1038/nrm.2016.166.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 2000; 3(1): 3–8.

CAIAFA, P.; ZAMPIERI, M. DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands. *Journal of Cellular Biochemistry*, New York, v. 94, p. 257-265, 2005.

CARDOSO, A. L. et al. Epigenetic DNA Modifications Are Correlated With B Chromosomes and Sex in the Cichlid *Astatotilapia latifasciata*. *Frontiers in Genetics*. 2019. doi:10.3389/fgene.2019.00324

CHAPMAN, D.; KIMSTACH, V. Selection of water quality variables. In: *Water quality assessments: a guide to the use of biota, sediments and water in environmental monitoring*. 2^a ed. Behalf of UNESCO, WHO and UNEP. London: E & FN Spon, 1992.

CHHABRA, R. miRNA and methylation: a multifaceted liaison. *ChemBioChem*. 2015. 16(2): 195–203. doi:10.1002/cbic.201402449.

CLARISSE, M. D.; AMORIM, M. C. V.; LUCAS, E. F. Despoluição ambiental: uso de polímeros na remoção de metais pesados. *Rev. de Química Industrial*, v. 715, p. 16-24, 1999.

COELHO, N. C. M. MONTEIRO, A. M. SANTOS, C. I. Políticas públicas, corredores de exportação, modernização portuária, industrialização e impactos territoriais e ambientais no município de Barcarena, Pará. *Novos Cadernos NAEA*. v. 11, n. 1, p. 141-178, jun. 2004, ISSN 1516-6481.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA (2005) Resolução CONAMA n8 357. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso: Fevereiro, 2023.

CRIBIU, Pauline et al. Natural variability and modulation by environmental stressors of global genomic cytosine methylation levels in a freshwater crustacean, *Gammarus fossarum*. *Aquatic Toxicology*, [S.L.], v. 205, p. 11-18, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.09.015>

DANTAS, R. F. Glutathione peroxidase e estresse oxidante em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) Rio de Janeiro, UERJ, Doutorado (2010).

DI PIETRO, G.; MAGNO, L. A.; RIOS-SANTOS, F. Glutathione S-transferases: na overview in cancer research. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, v. 6, p.153-170, 2010.

ESTELLER, M. Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008; 358(11), 1148–1159. doi:10.1056/nejmra072067.

EVA, H.D.; HUBER, O. Proposta para definição dos limites geográficos da Amazônia: síntese dos resultados de um seminário de consulta a peritos organizado pela Comissão Européia em colaboração com a Organização do Tratado de Cooperação Amazônica. CCP ISpra. 7-8 de jun. 2005.

FAIAL, K. et al. Mercury levels assessment in hair of riverside inhabitants of the Tapajós River, Pará State, Amazon, Brazil: fish consumption as a possible route of exposure. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2015.

FAN, H.; ZHAO, Z.J.; CHENG, J.; SU, X.W.; WU, Q. X.; SHAN, Y. F. Overexpression of DNA methyltransferase 1 and its biological significance in primary hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, Beijing, v. 15, n. 16, p. 2020-2026, 2009.

FELDBERG, E., BERTOLLO, L.A.C. Karyotypes of 10 species of Neotropical cichlids (Pisces, Perciformes). *Caryologia* 38: 257-268. 1985

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista de Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FICZ, G. et al. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*. 2011; 473(7347), 398–402. doi: <https://doi.org/10.1038/nature10008>.

FILLINGHAM, J.; GREENBLATT, J. F. A histone code for chromatin assembly. *Cell*. 2008; 134, 206-208. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.007.

FIOCRUZ. Mineração de caulim contamina recursos hídricos e compromete a subsistência de comunidades da Vila do Conde, em Barcarena. Mapa de conflitos envolvendo injustiça ambiental. Disponível em: <http://mapadeconflitos.ensp.fiocruz.br/conflito/pa-mineracao-de-caulim-contamina-recursos-hidricos-e-compromete-a-subsistencia-de-comunidades-da-vila-do-conde-em-barcarena/> Última atualização em: 06 jul. 2014. Acesso em: 21 de março de 2022.

FRANKLIN, C.C. (2010) Enhanced glutathione: biosynthetic capacity promotes resistance to AS3+- induced apoptosis. *Toxicology Letters*, 193(1), 33-40.

FRIDOVICH, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Ann Rev Biochem*. 64, 97-112.

GABRIEL, D. et al. Effects of Subchronic Manganese Chloride Exposure on Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Tissues: Oxidative Stress and Antioxidant Defenses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2013; 64(4):659–667. doi:10.1007/s00244-012-9854-4.

GANTE, H. F.; SALZBURGER, W. Evolution: Cichlid models on the runaway to speciation. *Current Biology*, v. 22, n. 22, p. R956–R958, 2012.

GIBSON, D. D., BRACKETT, D. J. et al. Evidence that the large loss of glutathione observed in ischemia/reperfusion of the small intestine is not due to oxidation to glutathione disulfide. *Free Radical Bio and Med* v. 14:p. 427-433, (1993).

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in enzymology*. 1981; 77: 398–405. doi: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77053-8).

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA. doi: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.

HARNEY, E. *et al.* Pollution induces epigenetic effects that are stably transmitted across multiple generations. *Evolution Letters*. 2022; 6: 118-135. <https://doi.org/10.1002/evl3.273>.

HAUSER, F.E.; LOPEZ-FERNANDEZ, H. *Geophagus crocatus*, a new species of geophagine cichlid from the Berbice River, Guyana, South America (Teleostei: Cichlidae). *Zootaxa*. 3731 (2):279-286. 2013.

HAYES, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I. R.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005, 45, 51.

HEYN, et al. DNA methylation profiling in breast cancer discordant identical twins identifies DOK7 as novel epigenetic biomarker. *Carcinogenesis*. 2013; 34(1):102–108. doi:10.1093/carcin/bgs321.

HIRAO-SUZUKI, Masayo et al. Cadmium-stimulated invasion of rat liver cells during malignant transformation: evidence of the involvement of oxidative stress/tet1-sensitive machinery. *Toxicology*, [S.L.], v. 447, p. 152631, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2020.152631>.

HONDA, Elisabeth. (1972). Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas. I - Alimentação de *Geophagus*. *Acta Amazonica*. 2. 81-88. 10.1590/1809-43921972021081.

HU, F. et al. Effects of long-term cadmium exposure on growth, antioxidant defense and DNA methylation in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Toxicology*. 2021; 241:106014. doi:10.1016/j.aquatox.2021.106014.

HUANG P, Chen C, Wang H, Li G, Jing H, Han Y et al (2011) Manganese effects in the liver following subacute or subchronic manganese chloride exposure in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:615–622.

HUANG, Y.; RAO, A. New functions for DNA modifications by TET-JBP. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2012; 19(11):1061-1064. doi:<https://doi.org/10.1038/nsmb.2437>

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 20 fev. 2023.

IBGE. Panorama das cidades. Disponível em: <
<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pa/barcarena/panorama>> Acesso em: 21 de março de 2022.

IBGE. Panorama das cidades. Disponível em:
<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pa/barcarena/panorama> Acesso em: 21 de março de 2022.

ICMBIO. Plano de manejo da Área de proteção ambiental (APA) do Igarapé Gelado. Parauapebas-Pa, 2015. 367 p.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS-INPE – Monitoramento sistemático do desflorestamento da Amazônia-Abaetetuba do Pará. Disponível em: <
<http://terrabrasilis.dpi.inpe.br/>> Acesso em: 23/01/2023

IVANOV, M.; BARRAGAN, I; INGELMAN-SUNDBERG, M. (2011) Epigenetic mechanisms of importance for drug treatment. *Trends in Pharmacological Sciences* 35(8):384-396.

KAUFMAN, L.S & LIEM, K.F. 1982. Peixes da subordem Labroidei (Peixes: Perciformes): Phylogeny, ecologia e significado evolutivo. *Breviora* 472: 1-19.

KITADA, M. et al. Sirtuins and Type 2 Diabetes: Role in Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. *Frontiers in Endocrinology*. 2019; 10:187. doi:10.3389/fendo.2019.00187.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*, Amsterdam, v. 31, p. 89-97, 2006.

KOCHER, T. D. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nat Ver Genet* 5:288-98, 2004.

KULLANDER, S. O. 1998. A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). pp 461–498. In L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena, and C. A. S. Lucena (Eds.), **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.

KULLANDER, S. O. Family Chichlidae (cichlids), pp 605–654. In R. E. Reis, S. O. Kullander, and C. J. Ferraris, Jr. (Eds.), **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil. 2003

LEE, Y.-M., Seo, J.S., Jung, S.-O., Kim, I.-C., Lee, J.-S., 2006. Molecular cloning and characterization of -class glutathione-S-transferase (GST-T) from the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* and biochemical comparisons with -class glutathione-S-transferase (GST-A). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 1053–1061.

LEROY, B. et al. Global biogeographical regions of freshwater fish species. *Journal of Biogeography*. 2019; 1–13. doi: <https://doi.org/10.1111/jbi.13674>.

LEWANDOWSKA, J.; BARTOSZEK, A.. DNA methylation in cancer development, diagnosis and therapy--multiple opportunities for genotoxic agents to act as methylome disruptors or remediators. *Mutagenesis*, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 475-487, 6 maio 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/ger019>.

LI, S. et al. Low salinity affects cellularity, DNA methylation, and mRNA expression of *igf1* in the liver of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiology And Biochemistry*, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 1587-1602, 21 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1007/s10695-017-0395-7.

LOWE-MCCONNELL, R. H. Ecology of cichlids in South American and African waters excluding the African Great Lakes. In: M. H. A. Keenleyside (Ed.); *Cichlid fishes: behavior, ecology and evolution*. Croom Helm ed., p.61–85, 1991. London.

MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; SILVEIRA, V.F. da; YONEZAWA, L. A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MAIA, M. M. D., SILVA, I. I. F. G. Conceitos básicos de epigenética para universitários. ed.1 - Recife: EDUFRPE, 2020. 87 p.

MARTINEZ, C.B.R.; AZEVEDO, F.; WINKALER, E.U. Toxicidade e efeitos da amônia em peixes neotropicais. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura*, Jaboticabal – S.P: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 81-95, 2006.

MCMAHON, K. W.; KARUNASENA, E.; AHUJA, N. The Roles of DNA Methylation in the Stages of Cancer. *The Cancer Journal*. 2017;23(5):257–261. doi:10.1097/ppo.0000000000000279.

MEDEIROS, Adaelson Campelo. Obtenção do IQA para avaliação da qualidade da água em rios dos municípios de Abaetetuba e Barcarena (PA). 2012. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Instituto de Tecnologia, Belém, Universidade Federal do Pará, 2012. Disponível em: <http://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/3545>. Acesso em: 26/04/2022

MIRANDA, T. B.; JONES, P. A. (2007). DNA methylation: The nuts and bolts of repression. *Journal of Cellular Physiology*. 2007; 213(2): 384–390. doi:10.1002/jcp.21224.

MONTES-CASTRO, N. et al. Prenatal exposure to metals modified DNA methylation and the expression of antioxidant- and DNA defense-related genes in newborns in an urban area. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2019; 55:110–120. doi:10.1016/j.jtemb.2019.06.014.

MORADO, C. N. et al. Induced CYP1A activity and DNA damage in fish from the middle Paraíba do Sul River basin, southeastern Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 40, n. 1, p. e36666, 1 abr. 2018.

MULLER, P. Y. et al. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 32, 1372–1374, 2002.

NASCIMENTO, M.; FREITAS, T. C. Gestão urbanística no município de Barcarena Pará, entre 1998 e 2009. Monografia (Especialização em Planejamento, Desenvolvimento e Integração regional – Emdir), 67 p. Universidade Federal do Pará, 2010.

NELSON, J. S. **Fishes of the world. 4th Edition. John Wiley & Sons Inc.** NY, USA. 601p. 2006

NELSON, J. S., GRANDE, T. C., WILSON, M. V. H. Nelson. **Fishes of the world. 5th Edition. John Wiley & Sons Inc.** NY, USA. 707p. 2016

NUNES, M. U. S. Conhecimento ecológico local de pescadores sobre os padrões migratórios de peixes em um rio tropical, 2014. p.f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Programa de Pós-graduação em Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Porto Alegre, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/117904>. Acesso em: 14 jul. 2022.

NÚÑEZ, J. M. & WEIBEZAHN, F. 1986. Repartición de recursos alimentarios entre dos peces sublitorales *Aequidens pulcher* (Gill) y *Geophagus surinamensis* (Bloch), en el Lago Valencia. *Acta Biologica Venezuelica*, 12(2): 24 – 33.

OAKLEY, A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, v. 43, p. 138-151, 2011.

OGNIK, K.; Kozłowski, K.; Stępniewska, A.; Szlązak, R.; Tutaj, K.; Zduńczyk, Z.; Jankowski, J. (2018). The effect of manganese nanoparticles on performance, redox reactions and epigenetic changes in turkey tissues. *animal*, (), 1–8. doi:10.1017/S1751731118002653.

OLIVEIRA, R. C. et al. Fish consumption by traditional subsistence villagers of the Rio Madeira (Amazon): impact on hair mercury. *Annals of Human Biology*. 2010; 37 (5): 629–642. doi: <https://doi.org/10.3109/03014460903525177>

ONO, K. et al. Myoclonic involuntary movement associated with chronic manganese poisoning. *J Neurol Sci*. 2002; 199(1-2):93-96. doi:10.1016/s0022-510x(02)00111-9.

PAGE, L.M.; BURR, B.M. A field guide to freshwater fishes of North America north of Mexico. Houghton Mifflin Company, Boston. 1991. 432 p.

PARÁ (Estado). Secretaria de estado de Turismo – SETUR. Inventário da oferta turística do município de Breves – Pa. Belém-pá, 2019. 50 p.

PARK, K. et al. Effects of thermal stress-induced lead (Pb) toxicity on apoptotic cell death, inflammatory response, oxidative defense, and DNA methylation in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*. 2020; 105479. doi:10.1016/j.aquatox.2020.105479.

PAVANATO, M. ALLESUY, S. (2008). Espécies ativas de oxigênio. Estresse oxidativo e inflamação. N. P. Marroni. Canoas, ULBRA: 13-24.

PEREIRA, S. F.; LIMA, M. A.; FREITAS, K. H.; MESCOUTO, C. S.; SARAIVA, A. F. Estudo químico ambiental do rio Murucupi – Barcarena, PA, Brasil, área impactada pela produção de alumínio. *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*. 2007; 2(3):62-82. doi:10.4136/ambi-agua.34.

PINTO, A. G. N. et al. Efeitos da ação antrópica sobre a hidrogeoquímica do rio Negro na orla de Manaus/AM. 39(3) 2009: 627 – 638.

PINTO, A. G. N. et al. Efeitos da ação antrópica sobre a hidrogeoquímica do rio Negro na orla de Manaus/AM. 2009. 39(3): 627 – 638. doi: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672009000300018>

POULSEN, A. F. & VALBO-JØRGENSEN, J. 2000. Fish migrations and spawning habits in the Mekong Mainstream – a survey using local knowledge. AMFC Technical Report. Mekong River Commission.

PUTNAM, H. M. et al. Ocean acidification influences host DNA methylation and phenotypic plasticity in environmentally susceptible corals. *Evolutionary Applications*, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 1165-1178, 2 ago. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/eva.12408>.

REIS, R., KULLANDER, S.O. & FERRARIS Jr., C.J. (Eds.) (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre.

SAKURAGUI, M. M.; SANCHES, J. R.; FERNANDES, M. N. 2003. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *J. Comp. Physiol.* 2003; 173(4):309-317.

SALES, R. S. et al. Esse rio é minha rua: análise da qualidade da água do Rio Tapajós na Orla Portuária de Santarém-PA. *Educação Ambiental e Cidadania: Pesquisa e Práticas Contemporâneas*. 2021; v.1, p. 244 – 266. doi:10.37885/201202487

SANTOS, S. S. M. Capacidade Institucional, gestão ambiental descentralizada e sustentabilidade: o caso de Barcarena (PA). Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Gestão dos Recursos Naturais e Desenvolvimento Local na Amazônia, Belém, 2015.

SEGURA, F. B. et al. Potential risks of the residue from Samarco’s mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, v. 218, p. 813–825, 2016. doi: 10.1016/j.envpol.2016.08.005.

SCHINONI, M. I. Fisiologia hepática. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 76, p. 5-9, 2006.

SCIANDRELLO, G. et al. Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. *Carcinogenesis*. 2004. 25 (3): 413–417. doi:10.1093/carcin/bgh029.

SIES H, Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, ed. *Oxidative stress*. London: Academic Press, 1985: I8.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015, 4, 180–183.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, v. 91, n. 3, p. 31-38, 1991.

SILVA, G. A; CASTRO, N. S; FIGUEIREDO, R. O. Mecanismos epigenéticos e a ação da expressão da proteína BRCA na carcinogênese mamária. *Brazilian Journal of Development*. 2020; 6(10):82596-82613. doi: 10.34117/bjdv6n10-623.

SILVA, R. G. et al. Trace elements in oyster farming areas in the amazon. *Bol. Inst. Pesca*. 2018; 44(4): e366. doi:10.20950/1678-2305.2018.44.4.366.

SILVANO R. A. M; MACCORD, P.F.L.; BEGOSSI A. 2006. When does this fish spawn? Fishermen's local knowledge of migration and reproduction of Brazilian coastal fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 76(2-4): 371-381.

SIMON, P. (2003). Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*. 2003; 19:1439–1440. doi: 10.1093/bioinformatics/btg157.

SOUSA, A. B. et al. Sexual proportion and weight-length *Geophagus surinamensis* (Bloch, 1791) Amazon Lake. *Brazilian Journal of Development*. 2020; 6(10): 75561-75574. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-111>.

Sousa, A.B.; Almeida, R.S.; Funo, I.C.S.A.; Lima, L.T.B.; Oliveira, R.W.S. 2020. Sexual proportion and weight-length *Geophagus surinamensis* (Bloch, 1791) Amazon Lake. *Brazilian Journal of Development*, 6(10): 75561-75574. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-111>.

SPARKS, J. S. Molecular phylogeny and biogeography of the Malagasy and South Asian cichlids (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 30, n. 3, p. 599–614, 2004.

STEGEMAN, J. J. et al. Molecular responses to environmental contamination: Proteins and enzymes as indicators of contamination exposure and effects. In *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress* (R. J. Huggett, Ed.), pp. 235–335. Lewis Publishers, Boca Raton, Fl, 1992.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Hist. Res*. 96:1715-1733, 1996.

- TAKAI, D.; JONES, P. A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3740–3745, 2002. doi:10.1073/pnas.052410099.
- TAKIGUCHI, M. et al. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp. Cell Res.* 2003; 286 (2): 355–365. doi: [https://doi.org/10.1016/s0014-4827\(03\)00062-4](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(03)00062-4).
- TEDESCO, P. A. et al. A global database on freshwater fish species occurrence in drainage basins. *Sci. Data.* 2017; 4:1–6. doi: <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.141>.
- TERESA F. B, Gonçalves-de-Freitas, E. Interação agonística em *Geophagus surinamensis* (Teleostei, Cichlidae). *Rev Etol* 5: 121-126. 2003.
- THOMPSON, J. A. Enhanced glutathione: biosynthetic capacity promotes resistance to AS3+-induced apoptosis. *Toxicology Letters*. 2010; 193(1): 33-40. doi:10.1016/j.toxlet.2009.12.004.
- TISSEUIL, C. et al. Global diversity patterns and cross-taxa convergence in freshwater systems. *J. Anim. Ecol.* 2013; 82(2): 365–376. doi: 10.1111/1365-2656.12018.
- TOFFOLI, L. V. et al. Effects of chronic restraint stress on the global DNA methylation profile of rat lung cells: Modulation by physical exercise. *Behavioural Brain Research*. 2017; 331:188–192. doi:10.1016/j.bbr.2017.03.023.
- VESKOUKIS, A.S.; TSATSAKIS, A.M.; KOURETAS, D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones*. 2012; 17(1):11–21. doi:10.1007/s12192-011-0293-3.
- VIEIRA, S. M. et al. Total and methyl-mercury in hair and milk of mothers living in the city of Porto Velho and in villages along the Rio Madeira, Amazon, Brazil. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2013; 4:1–7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.12.011>.
- VILÉLA, M. B. F. A. Estresse oxidativo em *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo. Monografia – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2007. p. 43.
- VUTUKURU, S. S. et al. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. *Fish Physiology And Biochemistry*, v. 32, n. 3, p. 221-229, 5 set. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-006-9004-x>.
- WEBER, L. P. et al. Effects of multiple effluents on resident fish from Junction Creek, Sudbury, Ontario. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2008; 70(3): 433–445. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.08.001>.

BONGA, S. E. W. et al. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1 jul. 1997. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>.

WILSON, A. S. et al. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Reviews On Cancer*, v. 1775, n. 1, p. 138-162, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.08.007>.

WINSTON, G. W. et al. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, [S.L.], v. 100, n. 1-2, p. 173-176, jan. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90148-m](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(91)90148-m).

WU, X., SONG, X., QIU, Z., & HE, Y. (2016). Mapping of TBARS distribution in frozen-thawed pork using NIR hyperspectral imaging. *Meat Science*, 113, 92–96. doi:10.1016/j.meatsci.2015.11.008.

YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. et al. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Química Nova*, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 551-556, out. 1998. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421998000500003>.

ZHANG, F. L. et al. In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2008; 26 (2): 232-236. doi:10.1016/j.etap.2008.04.003.