UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ – UFPA

INSTITUTO DE CIENCÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA
(PPGEAP)

LEONARDO FERNANDES DA PAIXÃO

O USO DO PEIXE (*Sciades herzbergii)* COMO BIOMONITOR DA QUALIDADE DA ÁGUA NO LITORAL AMAZÔNICO

.

Orientador(a): Prof. Dra. Rossineide Martins Rocha

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Nunes

BELÉM – PA

Maio /2018

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

P142u Paixão, Leonardo Fernandes da Paixão
O USO DO PEIXE (Sciades herzbergii) COMO BIOMONITOR DA QUALIDADE DA ÁGUA NO LITORAL AMAZÔNICO. : Biomonitoramento / Leonardo Fernandes da Paixão Paixão. — 2018
71 f. : il. color

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ecologia Aquática e Pesca (PPGEAP), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Rossineide Martins Rocha Rocha
Coorientação: Profa. Dra. Bruno Nunes.

1. Histologia, Imunohostoquímica, Bioquímica. 2. Histologia. 3. UFPA. I. Rocha, Rossineide Martins Rocha, *orient.* II. Título

---

CDD 571.1

LEONARDO FERNANDES DA PAIXÃO

O USO DO PEIXE (*Sciades herzbergii)* COMO BIOMONITOR DA QUALIDADE DA ÁGUA NO LITORAL AMAZÔNICO

Orientador(a): Prof. Dra. Rossineide Martins Rocha

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Nunes

28 de Fevereiro de 2018

Tese apresentada à Universidade Federal do Pará, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, para obtenção do título de Doutor

Banca Examinadora:

Dra. Rossineide Martins Rocha
Orientadora

Dra. Lílian Lund Amado - UFPA
Membro

Dr. Marcelo Costa Andrade - UFPA
Membro

Dra. Márcia Cristina Freitas da Silva -UFPA
Membro

Dra. Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira - UFPA
Membro

BELÉM – PA

DEDICATÓRIA

À minha família (Pai, Mãe, irmã, minha esposa Bethânia e ao nosso filho João Paulo) que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado quando já não tinha muitas forças e nunca deixaram de me mostrar que com o amor e Deus sempre conseguimos.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora de Nazaré por sempre estarem me orientando no mundo espiritual.

Agradeço a CAPES pela concessão de bolsa e apoio financeiro no sanduiche.

Aos meus pais, Fátima e Zeca por serem meus principais incentivadores e se hoje estou aqui tenham certeza que sou muito grato a vocês. Minha mãe muito obrigado por todas as orações e promessas e pai todas as palavras e ensinamentos da vida e para a vida. Sou eternamente grato a vocês.

Bethânia Sena - minha amada esposa – você foi um anjo que Deus enviou para mim, muito obrigado pelos conselhos, pelas conversas, pelo ombro amigo, por sempre estar ao meu lado para me ajudar, por sempre dizer: “calma, vai da certo”. Te amo.

João Paulo – filho – embora você tenha chegado no mês da minha defesa, saiba que desde o momento que peguei você em meus braços não sei descrever o que sentir, só sei que desejo ser o melhor pai do mundo para você.

Minha irmã – Luciane Melo – és mais que irmã, sou um pedaço seu. Como sempre digo um dia quero ser igual a você. Muito obrigado por cuidar de mim como se fosse seu e sempre ter aquela palavra amiga e acolhedora, além de sempre me ouvir nas horas mais difíceis, saiba que sou muito grato.

Abraão e Thiago – cunhado e sobrinho (compadre) – Goela saiba que sempre foi um exemplo de homem para mim, Thiago quando você chegou eu só tinha 9 anos e não sabia expressar tudo que sentia por você, mas um gesto diz tudo - a toda hora queria colocar você no colo.

Tia Ray obrigado por fazer parte da minha vida

Getúlio, Geice e Girena – primos – vamos comemorar muito obrigado por sempre perguntarem pelo meu trabalho

Giordan e Isabele – afilhados – busco sempre o melhor para um dia poder contribuir u pouco na vida de vocês.

Meu muito obrigado a minha orientadora Profa. Dra. Rossineide Martins Rocha, que acreditou em mim desde 2003, sempre com sorrisos ou não me incentivou bastante, me deu muito trabalho, puxou bastante minha orelha, aturou minhas dificuldades e ausências do lab. mas sempre me acolheu, muito obrigado professora, a senhora foi o alicerce de minha formação científica

Profa. Dra. Maria Auxiliadora – a Sr[a] sempre foi uma "Lady", da forma mais compreensível e educada sempre me ajudou na construção do meu trabalho. Quer com correções quer com sugestões imprescindíveis. Muito obrigado.

Muito obrigado kelle, John, Samuel e prof. Zélia companheiros de tantas coletas, bem como seu coelho, miúdo e diogo por tantos bagres capturados.

Aos amigos de Aveiro – PT – Luís, Raquel, Pedro, Ferro, Toga por me acolherem pelo período que passei aí com vocês.

Ao prof. Bruno pela receptividade, orientação e dedicação nas análises realizadas na Universidade de Aveiro-PT.

Prof[a] Maria Helena e Karol muito obrigado pelas análises genéticas.

Por último mas não menos importante a todos do laboratório de técnicas Histológicas e himunohistoquímica e biologia do desenvolvimento, Liziane, Lia, Gicelle, Leocyvan, Fernando, Yamne, Renata, Breno, Renata, Ivana a todos um muitíssimo obrigado.

RESUMO GERAL

A presença de substâncias tóxicas como os metais traços causam efeitos deletérios na biota aquática, em relação aos peixes por interferirem na respiração, no comportamento e na reprodução. O contato e o acúmulo de metais no organismo promovem o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio podendo causar estresse oxidativo e redução na qualidade de vida. Porém, estes organismos desenvolvem um mecanismo de defesa através da produção de enzimas antioxidantes, como a catalase. O objetivo desse estudo foi verificar se os efeitos dos contaminantes no meio aquático causam alterações morfológicas, imunohistoquímicas e bioquímicas em tecidos muscular, branquial e hepático de *Sciades herzbergii* e utilizá-la como ferramenta de avaliação da qualidade ambiental da água, além de verificar a eficiência desta espécie como organismo bioindicador em monitoramento ambiental. A espécie é popularmente denominada como bagre azul ou bagre-guribu foi coletada em duas áreas: área I – sem histórico de contaminação - localizada no estuário do Rio Caeté (Bragança-PA), situado na região norte do Brasil, com regime de macro-marés onde não há registro de ação antrópica; área II - com histórico de contaminação – a bacia de São Marcos onde está localizado o complexo portuário de São Luis-MA, com atuação aproximadamente 30 empresas, dentre elas a Companhia Vale do Rio Doce, Alumar e Petrobrás. As amostras foram agrupadas em dois períodos: estiagem e chuvoso. Durante as coletas foram mensurados os fatores abióticos. Um total de 352 peixes foram coletados, medidos e submetidos as técnicas histológica e imunohistoquímica nas brânquias e no fígado, técnicas bioquímicas de Colinesterase (cérebro), GST, Catalase e LPO (fígado e brânquias). Também foi realizado análises para presença de metais traço em sedimento e tecidos dos espécimes. Os valores médios dos fatores abióticos entre as áreas I e II apresentaram diferenças estatísticas ($p<0,05$) entre turbidez, salinidade, pH e condutividade. Na relação peso-comprimento indivíduos da área II apresentaram crescimento e peso menor e apresentaram lesões branquiais do tipo hiperplasia, hipertrofia lamelar, elevação epitelial, fusão lamelar e aneurisma. Células epiteliais e de cloreto foram imunorretivas para Caspase-3 clivada; lesões hepáticas descritas como congestão dos vasos; hepatite; inflamação; degeneração dos hepatócitos. Os espécimes com lesões do tipo congestão e degeneração dos hepatócitos revelaram intensa imunomarcação para Caspase-3 clivada. Na área I, os indivíduos apresentaram um

parênquima branquial e hepático sem alterações severas. Ocorreram diferenças significativas entre esses parâmetros bioquímicos apenas para Glutationa-S-Transferase (GST) nas brânquias e catalase (CAT) no fígado. Ocorreu diferenças significativas na presença de metais tanto no sedimento como nos tecidos biológicos e as maiores concentrações para o Alumínio, Ferro, Níquel, Cobre, Cádmio estavam presentes na área com histórico de contaminação. Neste contexto, os biomarcadores histológicos e bioquímicos utilizados no presente estudo forneceram sinais de alarme claros da exposição dos espécimes a poluentes. Este processo aumentou a susceptibilidade do peixe à doença. A alta concentração de metais no sedimento e tecidos biológicos dos peixes coletados na área com histórico de contaminação refletem o risco que a biota aquática sofre diante a atividades antrópicas. *Sciades herszbergii* se mostrou um eficiente biomonitor da qualidade de água, uma vez que o aumento da atividade das enzimas antioxidantes refletem uma tentativa do peixe de se proteger e de se adaptar a habitats contaminados.

ABSTRACT

The presence of toxic substances such as trace metals causes deleterious effects on aquatic biota because they interfere with respiration, fish behavior and reproduction. The contact and accumulation of metals in the organism promote the increase in the production of reactive oxygen species, which can cause oxidative stress and reduction in the quality of life. However, these organisms develop a defense mechanism through the production of antioxidant enzymes, such as catalase. The objective of this study was to verify if the effects of the contaminants in the aquatic environment cause morphological, immunohistochemical and biochemical alterations in the muscular, branchial and hepatic tissues of Sciades herzbergii and to use it as a tool to evaluate the environmental quality of water, besides verifying the efficiency of this species as a bioindicator in environmental monitoring. The species is popularly known as blue catfish or catfish-guive was collected in two areas: area I - with no history of contamination - located in the Caeté River estuary (Bragança-PA), located in the northern region of Brazil, tides where there is no record of anthropogenic action; area II - with a history of contamination - the São Marcos basin where the port complex of São Luis-MA is located, with approximately 30 companies, including Companhia Vale do Rio Doce, Alumar and Petrobrás. The samples were grouped in two periods: dry and rainy. During collection, the abiotic factors were measured. A total of 352 fish were collected, measured and submitted to histological and immunohistochemical techniques in the gills and liver, biochemical techniques of cholinesterase (brain), GST, Catalase and LPO (liver and gills). Analyzes were also made for presence of trace metals in sediment and specimen tissues. The mean values of the abiotic factors between areas I and II presented statistical differences ($p < 0.05$) between turbidity, salinity, pH and conductivity. In the weight-to-length relationship, individuals from area II presented growth and lower weight and presented branchial lesions such as hyperplasia, lamellar hypertrophy, epithelial elevation, lamellar fusion and aneurysm. Epithelial and chloride cells were immunoreactive to cleaved Caspase-3; liver lesions described as vessel congestion; hepatitis; inflammation; degeneration of hepatocytes. Specimens with congestion-like lesions and hepatocyte degeneration revealed intense immunostaining for cleaved Caspase-3. In area I, individuals presented a regular branchial and hepatic

parenchyma. There were significant differences between these biochemical parameters only for Glutathione-S-Transferase (GST) in the gills and catalase (CAT) in the liver. There were significant differences in the presence of metals in both sediment and biological tissues and the highest concentrations for Aluminum, Iron, Nickel, Copper and Cadmium were present in the area with a history of contamination. In this context, the histological and biochemical biomarkers used in the present study provided clear alarm signals of the exposure of the specimens to pollutants. This increased the susceptibility of fish to disease. The high concentration of metals in the sediment and biological tissues of the fish collected in the area with a history of contamination reflects the risk that the aquatic biota suffers from negative anthropic activities. Sciades herszbergii proved to be an efficient biomonitor of water quality since increased activity of antioxidant enzymes reflects an attempt by the fish to protect itself and to adapt to contaminated habitats.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL 11
2. HIPÓTESE 15
3. OBJETIVOS: 16
4. METODOLOGIA 17
4.1 Área de estudo 17
4.2 Procedimentos em campo 19
4.2.1 – Amostras de tecidos 19
4.2.2 – Amostras de Fatores Abióticos 20
4.2.3 – Amostras de sedimento 20
4.3 - Histopatologia 20
4.3.1 – Microscopia de luz (MO) 20
4.4 – Imunohistoquímica 22
4.4.1 - Identificação de células em Apoptose (Caspase – 3 clivada) 22
4.5 - Parâmentros bioquímicos 22
4.5.1 Glutationa – S – Transferase (GST) 22
4.5.2 Catalase 23
4.5.3 Hidroperóxido lipídico (LPO) 23
4.8. Análises Estatísticas 24
REFERÊNCIAS 25
Histopatologia e presença Caspase-3 em brânquia e fígado de *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794) em dois ambientes estuarinos 30
CAPÍTULO 1 31
Histopatologia e presença Caspase-3 em brânquia e fígado de *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794) em dois ambientes estuarinos 31
Agradecimentos 42
CAPÍTULO 2 49
Resumo 50
Abstract 51
Introdução 52
Metodologia 53
Resultados 57
Discussão 62

Conclusão 65
Agradecimentos 65
Referências 66
CONSIDERAÇÕES FINAIS (GERAL) 76

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA 1 - Áreas de amostragem: Estuário do rio Caeté-Bragança-Pa (área I) e Baia de São Marcos São Luiz-Ma (Área II). 17

FIGURA 2 - Estuario do rio Caeté – Bragança-Pa. (Área I). 19

FIGURA 3 - Terminal Portuário de Ponta da Madeira; B - Terminal Portuário de Itaqui. 19

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - Áreas de amostragem: Estuário do rio Caeté-Bragança-PA (área I) e Baia de São Marcos São Luiz-MA (Área II). 38

FIGURA 2 - Fig. 2 - Photomicrography of gill filament of *S. herzbergii*. Area I (A-D): A - Structure of the normal gills lamellas (L1 and L2). B - Detail o f secundaria lamellas normal showing epithelial cells (Ec), mucus cell (arrow), and pillar (p). C – controle negativo para caspase-3. D – hiperplasia lamelar com imunorreação and chloride (c) cells. Area II (E-L): E – hipertrofia da lamela; F – elevação epitelial (Arrow); G – fusão lamelar; H – aneurisma (*). I-L – imunolocalização para caspase-3: I – hiperplasia com com imunomarcação de caspase-3 nas células de cloreto; J – elevação epitelial com imunomarcação na lamela secundária K – fusão lamelar com imunomarcação nas lamelas primária e secundárias; L - Aneurisma com marcação nos infiltrados leucocitários. 42

FIGURA 3 Photomicrography of liver of *S. herzbergii*. Area I (A-D). A: Normal structure of the liver, veia centro lobular (VCL) circundada de hepatócitos (h) dispostos em cordões e a presença de capilares sinusóides. B - detalhe dos cordões de hepatócitos e capilares sinusóides (cs). C – controle negativo para caspase-3. D - imunomarcação de caspase-3 em alguns hepatócitos periféricos. Área II (E-L): E – congestão dos vasos, vasos dilatados e preenchidos por sangue (cg). Insert – presença de centro melanomacrófagos (M). F – Hepatite – veia dilatada (v), hepatócitos hipertrofiados e extravasamento de sangue no parênquima (s). G – Inflamação – hipetrofia do hepatócito e infiltrado leucocitário no parênquima (arrow). H – Degeneração dos hepatócitos – perda da integridade e vacuolização citoplasmática dos hepatócitos (dg). I-L: Imunolocalização para caspase-3: I-J congestão dos vasos (cg). K-L – degeneração dos hepatócitos (dg). 44

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Study area in the Amazon estuary, Brazil. (c) Area I, Bragança-Pará; (d) Area II São Marcos Bay, Maranhão. 60

FIGURA 2 - Atividade dos marcadores de estresse oxidativo e da enzima acetilcolinesterase no organismo *Sciades herszbergii* de área I e área II. A - Atividade da Catalase nas brânquias; B – Atividade da Catalase no fígado; C - Atividade de GST nas brânquias; D – Atividade da GST no fígado; E – Peroxidação Lipídica (LPO) nas brânquias; F - Peroxidação Lipídica (LPO) no fígado. e G - Atividade de Acetilcolinesterase no cérebro**.** Valores expressos em médias e a e b mostram valores estatisticamente diferentes. 65

FIGURA 3 - Análise de PCA. Área I e II e fatores abióticos. 67

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

TABELA 1 - Classificação das alterações histopatológicas das brânquias em relação ao tipo, a localização e aos estágios das lesões em que estão inseridas. Modificadas de Poleksic e Mitrovic – Tutundzic (1994). 22

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Valores médios (±DP) dos parâmetros físico-químico da água nas áreas I e II durante os períodos seco e chuvoso. 41

Tabela 2 - Média (±Desvio Padrão) do comprimento (cm) e peso (g) total de *S. herzbergii* capturados em duas áreas do estuário amazônico. 45

Tabela 3: Estágios de histopatologia branquial e hepática e número de individuos capturados na área de estudo nos períodos chuvoso e seco 45

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – valores médios dos parâmetros físico-químicos. 63

Tabela 2 - Média (±Desvio Padrão) do comprimento (cm) e peso (g) total de *S. herzbergii* capturados em duas áreas do estuário amazônico. 64

Tabela 3 – Análise da concentração média (mg/kg) de metais no sedimento em duas áreas do estuário amazônico. 66

Tabela 4 – Média (±DP) da concentração (mg/kg) de metais em tecidos de *S. herzbergii* em duas áreas do estuário amazônico. 66

1. INTRODUÇÃO GERAL

Há mais de um século a atividade humana vem degradando o meio ambiente aquático, pois a maior parte dos resíduos termina nos oceanos. A conservação dos ecossistemas aquáticos e a mitigação das pressões antropogênicas são muito importantes, pois conduzem alterações na qualidade da água e na vida de espécies aquáticas, evitando assim riscos para a vida aquática. Além disso, ainda não se tem ideia se a diluição e a dispersão protegem adequadamente as zonas costeiras (Zagatto, 2006; Santos et al., 2015a; Valle Junior et al., 2015).

O aumento na concentração e na biodisponibilidade de substâncias tóxicas, principalmente os metais, em corpos d'água é potencializada pela ação humana, por atividades industriais e domésticas, causando impactos em níveis local e até globais a saúde dos ecossistemas e do homem (Vinodhini e Narayanan, 2009). Denomina-se metal traço, o metal encontrado em baixas concentrações, em frações de massa em partes por milhão ou de ordem menor (Duffus, 2005). O grau de toxicidade provocada pelos metais na biota aquática, depende diretamente do tipo de metal, da concentração deste na água, da espécie química encontrada, do tempo de exposição e da capacidade do organismo metabolizar as substâncias toxicas (Paris-Palacios et al., 2000; Hadi e Alwan, 2012).

A descarga de metais traço em ecossistemas aquáticos pode promover alterações significativas nas variáveis físicas e químicas, no próprio metal e em componentes biológicos (Velasquez, 2002). Também pode alterar a especiação do metal, já que a biodisponibilidade dessas espécies metálicas é influenciada pela sua forma encontrada na natureza e não só pela sua concentração total (Jamalia, et al. 2009).

A avaliação da qualidade da água é frequentemente determinada através da medição das variáveis físicas e químicas, como: temperatura, salinidade, condutividade, oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), pH, presença de poluentes (metais) ou através do aumento da concentração de nutrientes como o fósforo e o nitrogênio (Shrestha e Kazama, 2007). Contudo, determinar a extensão e a severidade da contaminação da água é complexo, uma vez que os efeitos observáveis tendem a se manifestar após longos períodos de exposição, por isso somente análises físicas e químicas são insuficientes para descrever os efeitos adversos dos compostos presentes (De La Torre et. al., 2005).

Os parâmetros biológicos constituem uma outra alternativa para avaliar a qualidade ambiental e as relações entre impacto-efeito (Van Der Oost et al., 2003). Em ambientes degradados o efeito de poluentes pode gerar múltiplas alterações causando consequências em populações de peixes e outros organismos aquáticos, comunidades ou ecossistemas dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (Goulard e Callisto, 2003).

A utilização de peixes como elementos representativos do ecossistema aquático tornou-se indispensável na avaliação da qualidade ambiental, já que possuem a capacidade de responder de forma similar a outros vertebrados, inclusive o homem, quando em contato com agentes estressores e por serem capazes de bioacumular metais mesmo em baixas concentrações (Scalon et al., 2010; Mansouri et al., 2012). Entretanto, as respostas histopatológicas de peixes diferem, dependendo da espécie, do habitat e hábito alimentar, sendo que os biomarcadores têm a vantagem de medir respostas quantitativamente com informações valiosas de relevância ecológica nos efeitos agudos e crônicos da poluição aquática. (Zagatto, 2006; Flores-Lopes e Thomaz, 2011)

Muitos agentes estressores em peixes afetam a estrutura e função de determinados órgãos, especialmente brânquias e fígado. As brânquias são importantes para a respiração, a osmorregulação, o equilíbrio ácido-básico e a excreção de nitrogênio (Hibiya, 1982). A análise da morfologia branquial serve como parâmetro para o monitoramento ambiental (Schwaiger et al., 1997; Romão et al. 2006; Carvalho-Neta et al., 2012). O fígado é responsável pelo anabolismo das proteínas, lipídios carboidratos e catabolismo do nitrogênio, glicogenólise, desintoxicação e função de vitelogênese. Este órgão pode sofrer alteração estrutural e metabólica devido a alimentação, aos poluentes, as toxinas, aos parasitas e aos microrganismos. Estas alterações podem ser refletidas por várias patologias como inflamação, atrofia, necrose, degeneração vacuoloar, degeneração gordurosa, estagnação de bile, hepatite, cirrose, congestão e tumores que podem levar o animal à morte (Hibiya, 1982; Camargo e Martinez 2007; Guardiola et al. 2013).

A associação entre doença e poluição ambiental pode ser verificada em níveis mais baixos de organização biológica, como organelas, células, tecido e órgãos, tecidos (Bengtsson et al. 1985). Pode ser verificado em nível imunohistoquímico (Fasulo et al., 2010), bioquímico (Fernandes et al., 2000), genototóxico (Oliveira et al., 2010).

Além dos processos citados anteriormente, também pode ser analisada a apoptose ou morte celular programada. Ela ocorrer em qualquer momento nos organismos, o processo é geneticamente regulado e apresenta características morfológicas evidentes (Okada e Mak, 2004; Castedo et al., 2004). O processo apoptótico pode ser regulado por via extrínseca, que envolve a membrana celular, e por via intrínseca, mitocondrial (Kumar et al., 2007). Neste processo inclui uma cascata de reações, com clivagens de proteínas celulares realizadas pelas caspases, o que altera o citoesqueleto levando a uma modificação na estrutura da célula, formando assim corpos apoptóticos (Lockshin e Zakeri, 2001).

Biomarcadores bioquímicos envolvidos nos processos de biotransformação são utilizados para melhor avaliação de contaminação do ecossistema aquático. Como por exemplo a enzima GST (Glutationa S-Transferase) que catalisa a conjugação da glutationa reduzida (GSH) com uma variedade de compostos endógenos e exógenos, sendo indispensável ao processo de desintoxicação de compostos xenobióticos e na prevenção da peroxidação lipídica (George, 1994; Gagné et al., 2008; Mohammed, 2014). Durante o metabolismo dos xenobióticos pode haver a formação de radicais livres que são eliminados pelas enzimas antioxidantes como a catalase, a qual é responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular. Além de seu papel como espécie reativa de oxigênio o H_2O_2, em excesso, causa oxidação da hemoglobina e, consequentemente, diminuição das concentrações de oxigênio, acarretando 16 infecções, úlceras e até necroses nos organismos (Claiborne, 1985; Saint Denis et al., 1999). Ocorrendo um desequilíbrio no sistema das enzimas antioxidantes, os hidroperóxidos de lipídios são indicadores do processo de peroxidação lipídica (LPO), constituindo o evento citotóxico primário que desencadeia as injúrias mediadas por diferentes agentes tóxicos e propagação de LPO pode levar a morte celular (Lima, 2003). O aumento da LPO, como uma consequência da deterioração oxidativa dos lipídios das membranas é, geralmente, utilizado como referência em tecidos biológicos de estresse oxidativo, influenciando vários caminhos metabólicos (Meagher e Fitzgerald, 2000).

Acetilcolinesterase (Ache) está presente em vertebrados, é importante para o funcionamento do sistema nervoso, pois catalisa a hidrólise de acetilcolina (Nunes et al., 2003; leticia et al., 2008) e é utilizada como biomarcador pois tem sua atividade alterada frente aos contaminantes (Jung, 2007).

Neste estudo foi utilizada a espécie *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794), pertencente a Classe *Actinopterygii,* a Ordem *Siluriformes*, Família *Ariidae*, comumente denominado como bagre azul ou bagre guribu. Essa espécie pode ser encontrada em rios e estuários desde a Colômbia até o Brasil, na plataforma continental até no máximo 200m de profundidades. Nas áreas de manguezais é uma das espécies predominantes (Barletta et al., 2003, Krumme et al., 2004 e Giarrizzo e Krumme, 2007).

A captura de *S. herzbergii* entre os anos de 1997 a 2000 atingiu a taxa de 4500 t. É uma espécie estuarina residente, com hábito demersal e grande importância na pesca artesanal, sendo uma das principais fontes de proteínas para as comunidades locais (Carvalho-Neta e Abreu-Silva, 2010). A contaminação desse peixe torna-se um caso de saúde pública, pois ela faz parte da dieta alimentar de muitas famílias.

A área de estudo está localizada na costa ocidental do Maranhão, na Baía de São Marcos, onde atuam cerca de 30 empresas dentre elas a Companhia Vale do Rio Doce (VALE), Alumar e Petrobrás. A baía de São Marcos apresenta 100 Km de extensão territorial, é classificada como uma das mais importantes do litoral brasileiro, sendo constituída por um sistema estuarino, na qual apresenta os mais diversos e complicados processos de movimento de marés, cadeia trófica, deslocamento de sedimentos ao longo dos canais de maré. Nesta região foram encontrados metais como Cu, Pb, Zn, Ni, Cd, Fe, Al, Mn e Co (Carvalho-Neta et. al., 2012).

Portanto o objetivo desse estudo foi verificar se os efeitos dos contaminantes no meio aquático causam alterações morfológicas, imunohistoquímicas e bioquímicas em tecidos muscular, branquial e hepático de *Sciades herzbergii* e utilizá-la como ferramenta de avaliação da qualidade ambiental da água, além de verificar a eficiência desta espécie como organismo bioindicador em monitoramento ambiental.

2. HIPÓTESE

H1: Ambientes com histórico de contaminação exercem efeitos negativos sob a qualidade de água e geram risco de contaminação para espécie residente de *Sciades herzberg*ii no estuário amazônico.

3. OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se os efeitos dos contaminantes no meio aquático causam alterações morfológicas, imunohistoquímicas e bioquímicas em tecidos nervoso, muscular, branquial e hepático de *Sciades herzbergii* e verificar a eficiência desta espécie como organismo bioindicador de monitoramento ambiental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as variáveis físico-químicas (temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, pH, condutividade e turbidez) nas duas áreas do estuário;
- Identificar as alterações histológicas nas brânquias e no fígado de *S. herzbergii* coletados de diferentes áreas no estuário, a partir dessas alterações atribuir o grau e o índice de severidade;
- Identificar por meio da imunohistoquímica a apoptose nos tecidos branquiais e hepáticos dos peixes capturados nas duas áreas do estuário;
- Quantificar Catalase, GST e LPO) nos tecidos hepáticos e branquiais e a Actilcolinesterase no cérebro dos peixes capturados nas duas áreas do estuário;
- Determinar concentração de metais (alumínio, ferro, níquel, cobre, cadmio e mercúrio) no sedimento e em tecido muscular, hepático e no cérebro de *S. herzbergii*
- Associar concentrações de metais em tecidos muscular, hepático, nervoso e sedimento de fundo com os parâmetros bioquímicos.

4. METODOLOGIA

4.1 Área de estudo

A coleta do material biológico foi subdividida em dois pontos: Área I – Área sem histórico de contaminação e área II - com histórico de contaminação.

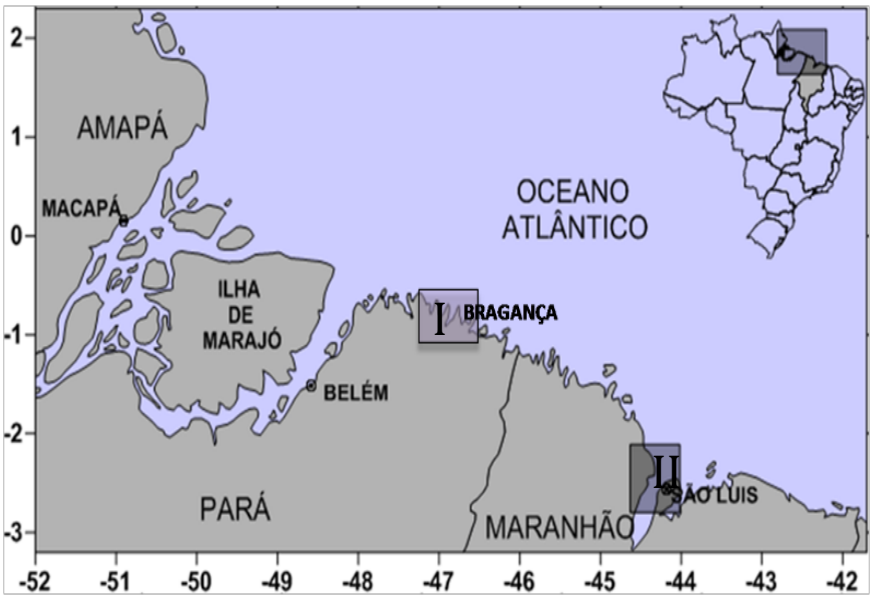

Figura 1: Áreas de amostragem: Estuário do rio Caeté-Bragança-PA (área I) e Baia de São Marcos São Luiz-MA (Área II).

I- Área sem histórico de contaminação

O estuário do Rio Caeté (Bragança-PA), localizado na região norte do Brasil. Este estuário está situado a aproximadamente 150 km ao sudeste do rio Amazonas, com as seguintes coordenadas, S 00°48'45.9 W 046°37'35.2". A bacia desse estuário tem uma extensão de 2.195 Km^2, constituída por planalto costeiro, dominado por regime de macro-marés (Gorayeb, 2008). De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) a Bacia do Rio Caeté, inserida na sub-região Costa Atlântica drena parte do território de sete municípios: Bonito, Santa Luzia do Pará, Ourém, Capanema, Tracuateua, Bragança e Augusto Corrêa, sendo caracterizado por apresentar águas túrbidas com profundidade máxima de 10 m (Lara, 2003). O clima da região é equatorial úmido, com temperatura máxima 33°C e mínima de 18°C e média em torno de 27,5°C, apresenta uma estação chuvosa no período de janeiro a junho, enquanto a estação seca ou menos chuvosa de julho a dezembro (INMET, 1992).

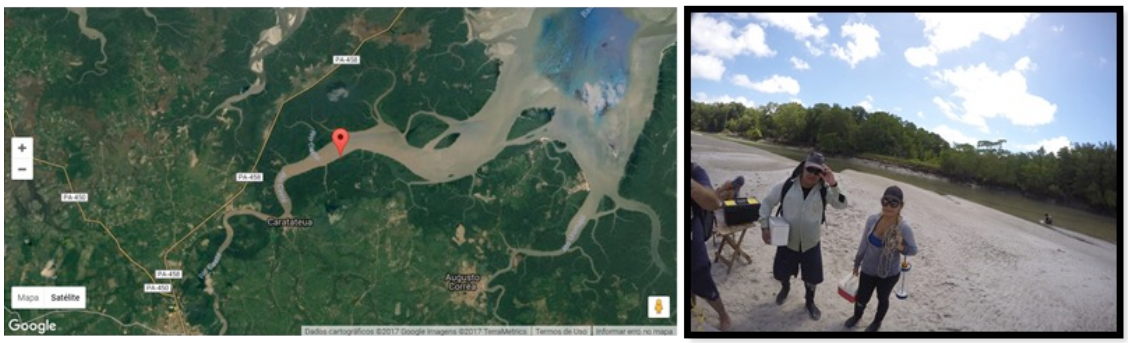

Figura 2:Estuário do rio Caeté – Bragança-Pa. (Área I). (Fonte: Google).

O complexo portuário de São Luís - MA, onde atuam aproximadamente 30 empresas dentre elas a Companhia Vale do Rio Doce (C.V.R.D.), Alumar e Petrobrás. Os principais portos são: Ponta da Madeira (VALE) destina-se principalmente à exportação de minério de ferro trazido do projeto Serra dos Carajás (Figura 01), e Porto de Itaqui (Porto da Alumar) (Figura 02). Nesta região está a baía de São Marcos (São Luis-MA), situada ao norte da cidade de São Luís (Ma), nordeste do Brasil, entre as coordenadas S 02°50'07.3" W 044°34' 41.9". É um estuário com cerca de 100 km de extensão territorial, com clima equatorial-úmido, com temperatura média de 26°C, apresentando grandes variações de maré (Furtado, 2007).

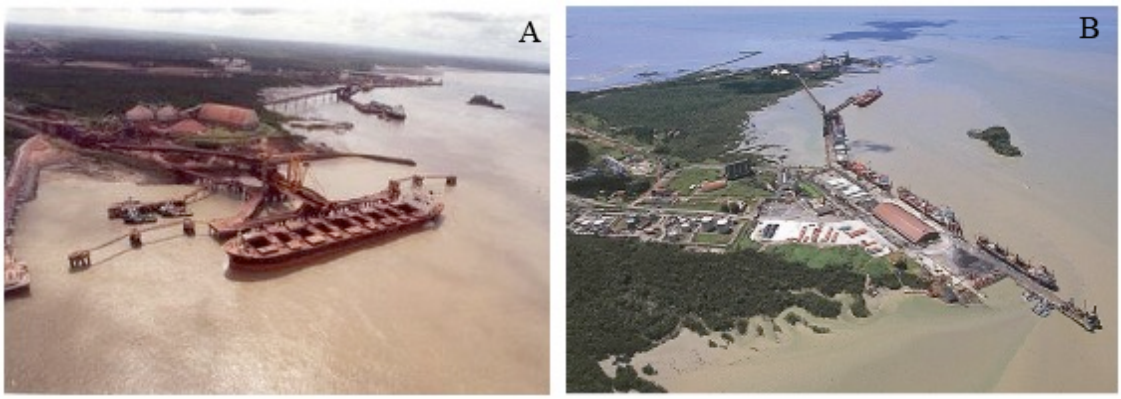

Figura 3: A - Terminal Portuário de Ponta da Madeira; B - Terminal Portuário de Itaqui (Fonte: Google)

4.2 Procedimentos em campo

4.2.1 – Amostras de tecidos

As coletas de material biológico foram realizadas trimestralmente, por 24 meses, totalizando 8 coletas, subdivididas em 4 no período chuvoso e 4 no período seco, sendo capturadas 22 espécimes por campanha. Foi utilizada redes de emalhar de (25mm) com aproximadamente 100 metros, medindo 2 metros de altura e com tamanho entrenós de 1-2 cm; estas redes eram colocadas na água pelo pescador durante a enchente e foram vistoriadas a cada

30 minutos. No local de estudo todos os espécimes de peixes coletados foram identificados até o nível de classificação taxonômica possível, baseado em FAO (1992) e Espírito Santo et al. (2005). Após a realização da biometria (massa (g) e comprimento (cm), os animais foram anestesiados com benzocaína ($0.1g.L^{-1}$) e eutanasiados de acordo com as Diretrizes de Experimentação Animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Após a dissecação, dos órgãos alvos (Brânquias, Fígado, cérebro e Músculo), os fragmentos dos órgãos foram acondicionados imediatamente em nitrogênio líquido para preservação integral dos componentes teciduais e outros fragmentos foram colocados em fixador adequado para as técnicas de microscopia óptica. Dessa forma foram conduzidos ao Laboratório de Ultraestrutura Celular/ICB-UFPA. As análises bioquímicas foram realizados na Universidade de Aveiro – Portugal.

4.2.2 – Amostras de Fatores Abióticos

A coleta dos parâmetros (temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, pH, condutividade e turbidez) da água foi realizada *in situ*, em maré enchente, na área onde ocorreu a coleta de material biológico, com a o auxílio de um multianalizador de água (HORIBA U-10). A profundidade da coluna de água foi realizada através de um ecobatímetro manual e a transparência através de um disco de Secchi.

4.2.3 – Amostras de sedimento

A amostragem de sedimento foi realizada nos mesmos pontos de coleta de água e captura dos animais, sempre na maré enchente, com auxílio de uma draga de Ekman de aço inoxidável, levando em consideração as características morfológicas e hidrológicas de ambas as áreas de coleta. As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, identificados e armazenados a 4°C até o processamento da amostra.

4.3 - Histopatologia

4.3.1 – Microscopia de luz (MO)

Fragmentos de brânquias e de fígado foram retirados, fixados em solução de Bouin por 24 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em série crescente de Etanol (70% a 100%) até a inclusão em parafina. Para a microscopia de luz, os tecidos foram cortados a 5 μm de espessura em micrótomo manual Leica (RM 2245). Os cortes foram corados com solução Hematoxilina e eosina (H.E.), analisados e fotomicrografados em microscópio (Nikon Eclipse

ci). A ocorrência de alterações histopatológicas nas brânquias e fígado foi avaliada de 2 formas distintas:

a) cálculo do valor médio de alteração (VMA), com base na incidência de lesões, segundo Schwaiger et al. (1997). Para tanto, foram atribuídos valores numéricos para cada animal, de acordo com a seguinte escala: grau 1 (ausência de alteração histopatológica), grau 2 (alterações pontualmente localizadas) e grau 3 (alterações amplamente distribuídas pelo tecido);

b) Cálculo do índice de alteração histopatológica (IAH), com base na severidade de cada lesão (Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994). Para isso cada alteração foi classificada em estágios progressivos quanto ao comprometimento das funções teciduais: estágio I, alterações que não comprometem o funcionamento do órgão, estágio II para alterações mais severas que comprometem o funcionamento normal, mas são reversíveis e estágio III, para as alterações mais graves que comprometem de forma irreversível o funcionamento do órgão (tabela 1). Um valor de IAH foi calculado para cada animal, seguindo a fórmula: $IAH = 1.\sum I + 10 \sum II + 100 \sum III$, onde I, II e III corresponde ao número de alterações de estágio I, II e III respectivamente. Os valores de IAH entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do tecido, entre 11 e 20 indicam danos leves a moderados ao órgão, entre 21 e 50 indicam danos de moderados e severos, de 50 a 99, danos mais severos à brânquia e maiores que 100 indicam danos irreversíveis no tecido.

Tabela 1: Classificação das alterações histopatológicas das brânquias em relação ao tipo, a localização e aos estágios das lesões em que estão inseridas. Modificadas de Poleksic e Mitrovic – Tutundzic (1994).

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS BRANQUIAIS E HEPÁTICAS	ESTÁGIO
1. Hipertrofia e hiperplasia do epitélio branquial	
Hipertrofia do epitélio respiratório	I
Elevação das células do epitélio respiratório	I
Hiperplasia do epitélio lamelar	I
Desarranjo lamelar	I
Fusão incompleta de várias lamelas	I
Fusão completa de várias lamelas	I
Fusão completa de todas as lamelas	II
Ruptura do epitélio lamelar	II
Espessamento descontrolado de tecido proliferativo	III
2. Alterações nos vasos sanguíneos	
Dilatação do seio sanguíneo	I
Constrição do seio sanguíneo	I
Congestão vascular	II
Rompimento do sistema de células pilares	II
Aneurisma lamelar	III
1. Alteração nos hepatócitos	
Hipertrofia celular	I

	Atrofia celular	I
	Centros melanomacrófagos I	II
	Degeneração celular	I
	Inflamação	II
	Degeneração gordurosa	II
	Necrose	III
2.	**Alterações nos vasos sanguíneos**	
	Hepatite	II
	Congestão dos vasos	I

4.4 – Imunohistoquímica

4.4.1 - Identificação de células em Apoptose (Caspase – 3 clivada)

Para determinar a imunomarcação de caspase 3 clivada, réplicas das lâminas contendo fragmentos da brânquia e fígado previamente identificado pela microscopia de luz foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em etanol, lavadas em solução salina tamponada tween 0,05% (PBSw) e incubadas em peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos. Posteriormente as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio aquecido a 70°C durante 25 minutos e bloqueadas com soro normal de cabra (16210072, Invitrogen, Burlington, ONT, Canada) a 10% por 1 hora. As lâminas foram incubadas "overnight" em anticorpo primário policlonal anti-caspase-3 de coelho (AB3623, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) na diluição de 1:200 por 12 horas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBSw e pós-incubadas em anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado com peroxidase (sc-2030, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Europe) diluído em 1:500 por 2 horas. A reação foi revelada em solução de DAB (3,3' diaminobenzidina) (750118, Invitrogen, Burlington, ONT, Canada) por 5 minutos, lavada em água destilada e analisadas e fotografadas em fotomicroscópio (NIKON Eclipse Ci-E, Nikon Corporation, Tóquio, Japão) acoplado à uma câmera digital (NIKON DS-Ri1, Nikon Corporation, Tóquio, Japão). Para o controle negativo não foi utilizado anticorpo primário e em substituição, as lâminas foram incubadas em PBS.

4.5 - Parâmentros bioquímicos

4.5.1 Glutationa – S – Transferase (GST)

A atividade da glutationa S-transferase (GST) foi determinada pela reação de conjugação de 1 mM de glutationa (GSH) com 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), de acordo o com método descrito por Habig e Jakoby (1981). A formação do composto é

analisada como um aumento da absorbância a 340nm que representa a atividade desta enzima. A atividade da GST é expressa em unidades de GST/mg de proteínas, onde uma unidade é a quantidade de enzima necessária para conjugar 1µmol de CDNB/min/mg de proteína, à 25°C e pH 7. O coeficiente de extinção molar (ε) utilizado para a formação do conjugado CDNB-GSH foi 9,6 mM^{-1}. cm^{-1}. A leitura foi feita no leitor de micro placas multimodal Perkin Elmer.

4.5.2 Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada segundo o método descrito por Beutler (1975), medindo-se pelo espectrofotômetro a taxa de decomposição enzimática do H2O2 a 240 nm. A diminuição da absorbância representa a atividade da enzima, que é expressa em unidades de CAT/mg de proteína, onde uma unidade é a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1µM de H_2O_2/min/mg de proteína, à 30° C e pH 8. O coeficiente de extinção molar (ε) utilizado para o H_2O_2 foi 0, 071 mM -1. cm-1.

4.5.3 Hidroperóxido lipídico (LPO**)**

Preparação do tampão de homogeneização: Tampão fosfato 50 mM, pH=7,0, com Triton X-100 0,1%: (a) 1,95 g de NaH_2PO_4 em 250 mL de água ultra-pura e (b) 8,95 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$ em 500 mL de água ultra-pura. Combinação das soluções (a) e (b) na proporção aproximada de 1:1,5 (v/v), até se obter o pH pretendido. Juntou-se fragmentos dos tecidos ao tampão fosfato 200mM, pH=7, 0,1 % Triton X-100 a 4ºC e homogeneizar e seguido de uma centrifugação a 15.000 G durante 10 minutos a 4ºC. Adicionamos 200 µl de amostra centrifugada/ branco (tampão), 400 µl de solução de ácido tricloroacético a 10%, centrifugamos a 10000 G durante 20 segundos, 600 µl de sobrenadante/branco adicionar 600 µl de ácido tiobarbitúrico a 1, seguido de banho aquecido durante 10 minutos e foi realizados leituras de absorvância a 535 nm com a seguinte expressão: Coeficiente de extinção molar (ε): $1.56x10^6$ $M^{-1}.cm^{-1}$ A = ε * b * C (A = abs a 535 nm, b = 1 cm e C a concentração em M).

4.6 – Análise de Metais Traço (Cu, Ni, Zn, Al, Fe, Cd, Mn e Hg)

4.6.1 – Sedimento

As amostras de sedimento foram coletadas nos pontos definidos pelo sistema de GPS como auxílio de uma draga e colocados em frascos de polietileno (previamente descontaminados com HNO_3 1,4 mol/L. A separação das partículas ocorreu em malha de Teflon e degradação em microondas, para posterior análise em Espectrometria de Absorção Atômica (AAS).

4.6.2. –Brânquia, cérebro e Fígado

Em laboratório os pedaços dos órgãos foram fragmentados em triturador de alimentos e misturados até a completa homogeneização, as frações para determinação dos metais foram retiradas da amostra homogeneizada. Posteriormente as análises foram realizadas em um Espectrômetro Óptico de Emissão com Plasma Induzido (ICP-OES). Foi pesado uma massa de aproximadamente 0,2 g da amostra em tubos de Teflon para microondas Mars – CEM, a cada tubo foi adicionado 3 mL de HNO_3 concentrado e 1 mL de HCl. Os tubos foram fechados com tampa e deixados em repouso por 12 horas (Over Night). Foi adicionado ainda em cada tubo 1 ml de H_2O_2, em seguida os tubos foram fechados e deixados em repouso por 2 horas. A digestão segue-se no microondas Mars, CEM. Ao final do processo o conteúdo de cada tubo foi transferido para tubos tipo *falcon* e aferidos com água mili-Q ao volume final de 25 mL (KRUG, 2008).

4.8. Análises Estatísticas

Para todas as análises as amostras foram dividias em dois períodos sazonais chuvoso (Janeiro a Junho) e seco (Julho a Dezembro) para ambos os locais de coleta. Para todos os dados abióticos coletados foi realizada uma análise de variância multivariada (ANOVA twoway), caso esses dados não atendam aos pré-requisitos de normalidade e homocedasticidade, foi utilizado um teste não paramétrico. Para diferentes áreas ou dentro da mesma área foi realizada correlação, através do teste de correlação de Spearman (ρ). A partir da análise histopatológica de cada indivíduo foi estabelecido IAH o qual determinou a frequência de cada tipo de lesão em cada área, onde foi utilizado um teste de correspondência através de uma análise multivariada. Os dados de concentração de metais no sedimento e tecidos do peixe e as respostas biomarcadoras (LPO, GST, catalase e colinesterase) foram analisados através de uma análise de variância. Em todas as análises serão consideradas diferenças significativas com $p< 0,05$.

REFERÊNCIAS

LETICIA A.G.; GERARDO G.B. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish Haemulon plumier, Ecotoxicol. Environ. Saf. 71 (2008) 787–797.

BARLETTA; A. BARLETTA-BERGAN; U. SAINT-PAUL, G. HUBOLD. Seasonal changes in density, biomass, and diversity of estuarine fishes in tidal mangrove creeks of the lower Caeté Estuary (northern Brazilian coast, east Amazon) Mar. Ecol. Prog. Ser., 256 (2003), pp. 217–228, 2003.

BENGTSSON, B. E., BENGTSSON, A., HIMBERG GM. Fish deformities and pollution in some Swedish waters. Ambio; 14: 32-35. 1985.

CAMARGO, M.M.P. e MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. Neotrop. Ichthyol., v.5, p.327-336, 2007.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; TORRES, A. R.; ABREU-SILVA, A. L. Biomarkers in Catfish Sciades herzbergii (Teleostei: Ariidae) from Polluted and Non-polluted Areas (São Marcos Bay, Northeastern Brazil). Applied Biochemistry and Biotechnology, New Jersey, v. 166, p. 1-12, Jan, 2012.

CASTEDO M., PERFETTINI J.L., ROUMIER T., ANDREAU K., MEDEMA R., KROEMER G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene. 23:2825-837. 2004.

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

DUFFUS J.H. “Heavy metal” – a meaningless term? Pure Appl Chem 74:793–807. 2002.

FAO. Guia de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur America. Preparado por: F. Cervigón , R. Cipriani, W. Fisher, L.

Garibaldi, M. Hendrickx, A.J. Lesmus, R. Márquez, J.M. Poutiers, G. Robaina y B. Rodriquez. Comision de las Comunidades Europeas, Agencia Noruega para el desarollo Internacional y ONU para la Agricultura y la Alimentacion. 513p. 1992.

FASULO, S., MAUCERI, A., MAISANO, M., GIANNETTO, A., PARRINO, V., GENNUSO, F., D'AGATA, A. Immunohistochemical and molecular biomarkers in Coris julis exposed to environmental contaminants. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 873-882. 2010.

FERNANDES, C.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; FERREIRA, M.; SALGADO, M.A. Oxidative stress response in gill and liver of liza saliens, from the esmoriz-paramos coastal lagoon, portugal. Archives of environmental contamination toxicology. 52: 262-269. 2009.

FLORES-LOPES F. e THOMAZ AT. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. Braz J Biol 71:179–188. 2011.

GIARRIZO, T.; KRUMME, U. Spatial differences and seasonal cyclicity in the intertidal fish fauna from four mangrove creeks in a salinity zone of the Curuçá estuary, North Brazil. Bulletin of Marine Science. n. 80, p. 739-754. 2007.

GEORGE, S. G. Enzymology and molecular biology of phase II detoxication systems in fish. In Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives (eds D. Malins & G. Ostrander), pp. 37-85. 1994.

GAGNÉ, F., ANDRÉ, C., BLAISE, C. The dual nature of metallothioneins in the metabolism of heavy metals and reactive oxygen species in aquatic organisms: implications of use as a biomarker of heavy-metal effects in field investigations. Biochem. Insights 1, pp. 23–33. 2008.

GUARDIOLA, F. A.; CUESTA, A.; MESEGUER, J.; MARTÍNEZ, S.; MARTÍNEZSÁNCHEZ, M. J. Accumulation, histopathology and immunotoxicological effects of waterborne cadmium on gilthead seabream (Sparus aurata). Fish & shellfish immunology, v. 35, p. 792–800, 2013.

HADI A.A e ALWAN S.F. Histopathological changes in gills, liver and kidney of fresh water fish, Tilapia zillii, exposed to aluminum. Int J Pharm Life Sci 3:2071–2081. 2012.

HIBIYA, T. An atlas of fish histology, normal and pathological features. New york, kodansha tokio 1982.

KRUMME, U. SAINT-PAUL, H. ROSENTHAL. Tidal and diurnal changes in the structure of a nekton assemblage in small intertidal mangrove creeks in northern Brazil. Aquat. Living Resourc., 17, pp. 215–229, 2004.

KUMAR S. Caspase function in programmed cell death. Cell Death Differ; 14 (1) : 32 -43. 2007.

LARA, R. J. Amazonian mangroves, a multidisciplinary case study in Pará State, North Brazil: Introduction. Wetlands Ecology and Managements.,v. 11, p. 217-221. 2003.

LIMA. Detection of DNA damage in haemocytes of mytella guaynensis mussel from two mangroves on Santa Catarina island, Brazil, using comet assay. Genet. Molec. Biol., v. 26, n. 2º, p. 124, 2003.

LOCKSHIN, R.A., ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2, 545-50. 2001.

MANSOURI, B.; EBRAHIMPOUR, M.; BABAEI, H. Bioaccumulation and elimination of nickel in the organs of black fish (Capoeta fusca). Toxicology and Industrial Health, v. 28, n. 4, p. 361-368, 2012.

MEAGHER, E.A & FITZGERALD, G.A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitation. Free Radical Biology and Medicine. v.26, p. 202-226, 2000.

MOHAMMED, E.H., 2014. Biochemical response of the cyclopoida copepod Apocyclops borneoensis exposed to nickel. Jordan J. Biol. Sci 7 (1), 41–47.

NUNES B., F. CARVALHO, L. GUILHERMINO, Characterization of total head cholinesterases of Gambusia holbrooki (mosquitofish), and the assessment of effects induced by two environmental contaminants, J. Vet. Pharmacol. Ther. 26 (1) (2003) 260–261

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. Nat. Rev. Cancer. v. 4, p. 592-603, 2004.

OLIVEIRA, M.; AHMAD, I.; MARIA, V.L.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Monitoring pollution of coastal lagoon using Liza aurata kidney oxidative stress and genetic endpoints:an integrated biomarker approach. Ecotoxicology. 19: 643-653. 2010.

PARIS-PALACIOS S, BIAGIANTI-RISBOURG S, VERNET G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbation of Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulphate. Aquat Toxicol. 50:109–124. 2000.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills a monitor of sublethal and choronic effects of pollution. In: Muller R, Lloyd R (ed.). Sublethal and chronic effects of pollutants of freshwater fish. Fishing News Books, Oxford. 1994.

ROMÃO S, DONATTI L, FREITAS M. O, TEIXEIRA J, KUSMA J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of Hoplias malabaricus and Geophagus brasiliensis. Brazilian Archives Biology Technology 49:441-448. 2006.

SAINT.-DENIS, J.F., CABANIOLS, J.P., CUSHMAN, S.W., AND ROCHE, P.A. In SNARE complex assembly in rat adipose cells. Biochem. J. 338, 709–715.1999.

SANTOS, R.M.B., SANCHES FERNANDES, L.F., PEREIRA, M.G., CORTES, R.M.V., PACHECO, F.A.L. Water resources planning for a river basin with recurrent wildfires. Sci. Total Environ. 526, 1–13. 2015.

SCALON, M. C. S.; RECHENMACHER, C.; SIEBEL, A. M.; KAYSER, M. L.; RODRIGUES, M. T.; MALUF, S. W.; RODRIGUES, M. A. S.; SILVA, L. B. Evaluation of

Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. Brazilian Journal of Biology, v.70, n.4, p.1217-1222, 2010.

SCHWAIGER, J. et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SHRESTHA, S. e KAZAMA, F. Assessment of surface water quality using multivariate statistical techniques: A case study of the Fuji river basin, Japan. Environmental Modelling and Software. 22: 464-475. 2007.

VALLE JUNIOR, R.F., VARANDAS, S.G.P., PACHECO, F.A.L., PEREIRA, V.R., SANTOS, C.F., CORTES, R.M.V., FERNANDES, L.F.S., 2015. Impacts of land use conflicts on riverine ecosystems. Land Use Policy 43, 48–62.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Enviromental toxicology and pharmacology.13: 57-149. 2003.

VELASQUEZ, I. B.; JACINTO, G. S.; VALERA, F. S. The speciation of dissolved copper, cadmiun and zinco in Manila bay, Philippines. Marine pollution Bulletin, 45, 210, 2002.

VINODHINI, R., NARAYANAN, M.: Heavy Metal Induced Histopathological Alterations in Selected Organs of the Cyprinus carpio L.(Common Carp). Int. Journal. Environ. Res., 3 (1), 95-100. 2009.

ZAGATTO PA. Ecotoxicologia. In: Zagatto PA, Bertoletti E, editors. Ecotoxicologia Aquática-Princípios e Aplicações. São Paulo: Editora Rima. pp. 413–427. 2006.

A tese foi dividida em dois capítulos:

CAPÍTULO 1

Histopatologia e presença Caspase-3 em brânquia e fígado de *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794) em dois ambientes estuarinos

CAPÍTULO 2

Uso de Biomarcadores Bioquímicos em *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794) e Identificação de Metais traços no Biomonitoramento do estuário amazônico

CAPÍTULO 1

Histopatologia e presença Caspase-3 em brânquia e fígado de *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794) em dois ambientes estuarinos.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi investigar as alterações histológicas e a ocorrência de Caspase-3 nas brânquias e fígado de *Sciades herzbergii* provenientes de estuarino amazônicos, com e sem atividade antropogênica, em períodos sazonais chuvoso e seco. Espécimes de *S. herzbergii* foram capturados no período de março/2014 a fevereiro/2015 em duas áreas: I- estuário do rio Caeté (Bragança, PA), sem atividade antropogênica; II- Baía de São Marcos (São Luiz, MA), com atividade portuária e industrial. Fatores abióticos em ambos os locais foram mensurados *in situ*. Após a captura foi obtido o peso e comprimento. Em seguida fragmentos das brânquias e fígado foram retirados, fixados em solução de Bouin/24horas e submetidos ao processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Réplicas de lâminas foram submetidas a imunomarcação com anti Caspase-3 clivada. Alterações no tecido branquial e hepática foram avaliados pelos cálculos do valor médio de alteração e do índice histopatológico. Os resultados demonstram que turbidez, salinidade, pH e condutividade da água apresentaram diferenças estatísticas ($p<0.05$) somente entre as áreas I e II e não entre períodos sazonais. Indivíduos da área II apresentaram crescimento e peso menor comparado aos indivíduos da área I. 88% dos indivíduos capturados na área I apresentaram tecido branquial e hepáticos sem lesões, contudo 92% dos espécimes da área II apresentaram algum tipo de lesão branquial e hepática. As alterações branquiais observadas foram hiperplasia, hipertrofia lamelar, elevação epitelial, fusão lamelar e aneurisma. Células epiteliais e de cloreto foram imunorreativas para caspase-3 clivada. As alterações hepáticas observadas foram congestão sanguínea, centros melanomacrófagos, hepatite, degeneração dos hepatócitos, vacuolização dos hepatócitos e necrose. Espécimes da área II que apresentaram lesões do tipo congestão de vasos e degeneração dos hepatócitos revelaram imunomarcação para Caspase-3 clivada. Em conclusão a atividade realizada na área II têm aumentado a susceptibilidade dos peixes as doenças e a morte; neste caso *S. herszbergii* pode ser considerado uma espécime para o biomonitoramento ambiental da qualidade biológica da água.

Palavras-chave: Apoptose, histopatologia, caspase-3.

Abstract

The aim of the present study was to investigate the histopathological changes and the occurrence of Caspase-3 in the gills and liver of *Sciades herzbergii* from Amazonian estuarine, with and without anthropogenic activity in rainy and dry seasons. In the period from March / 2014 to February / 2015, specimens of *S. herzbergii* were captured in two areas: Area I, Caeté - Bragança - PA Estuary, without anthropogenic activity and Area II - São Marcos Bay - São Luiz - MA, where there is a port and industrial system. Abiotic factors at both sites were measured in situ. The fish were captured with gill net and soon afterwards the biometry was accomplished with obtaining weight and length and removal of fragments of the gills and liver that were fixed in Bouin / 24 hours and submitted to the routine histological process. Turbidity, salinity, pH and conductivity presented statistical differences between areas I and II. In area I, 86% of the individuals presented a branchial filament without lesions, however in area II, 95% presented some type of branchial lesion, such as hyperplasia, lamellar hypertrophy , epithelial elevation and aneurysm. Epithelial and chloride cells were immunoreactive for cleaved caspase 3. 95% of the liver of *S. herzbergii* captured in area I presented a hepatic parenchyma of normal aspect, with hepatocytes of polygonal format, spherical nucleus and centralized .. While 95% of the specimens collected in the area II showed a liver with different pathologies: blood congestion, presence of melanomacrophage centers, hepatitis, hepatocyte degeneration, vacuolization of hepatocytes and necrosis. Area II specimens that presented congestion vessel lesions and hepatocyte degeneration revealed intense immunostaining for cleaved Caspase-3. In conclusion the industrial activity and Portland present in area II have increased the susceptibility of fish diseases and possibly lead to death, in this case *S. herszbergii* can be considered a sentinel specimen in environmental biomonitoring of the biological quality of water.

Palavras-chave: Apoptose, histopatologia, caspase-3.

Introdução

Ambientes estuarinos são berçários naturais para espécies de invertebrados e vertebrados, mas nos últimos anos, o estuário amazônico tem recebido uma grande quantidade de poluentes químicos potencialmente perigosos oriundos de fontes domésticas, industriais e portuárias (Carvalho-Neta et al., 2014; Montes et al, 2015; Cantanhêde et al., 2016). A baia de São Marcos é um complexo estuarino da região amazônica com atividade industrial e portuária, principalmente transporte de minérios. Como consequência dessas atividades há registros da presença de metais, constatando a influência desses elementos na qualidade e quantidade dos peixes na baia (Carvalho-Neta et al., 2012; Cantanhêde et al, 2016). Em contrapartida, o estuário do Rio Caeté possui características de ecossistemas ainda preservados que garantem a manutenção do ciclo de vida das espécies residentes e a subsistência da população local. Nesse local, somente as flutuações de salinidade sazonal influenciam na assembleia de peixes (Barletta et al., 2005).

As atividades antropogênicas na região amazônica vêm aumentando a concentração e biodisponibilidade de substâncias tóxicas no ecossistema aquático (Vinodhini and Narayanan, 2009; Vauchel, 2014; Borges et al., 2018). Os peixes são representantes fundamentais na avaliação da qualidade do ecossistema, pois em contato com agentes estressores podem bioacumular em baixas concentrações (Scalon et al., 2010; Mansouri et al., 2012) e apresentar alteração na reprodução, no crescimento, nas defesas imunológicas e até mesmo morrer (Lima, 2013; Voigt et al., 2014). Dessa forma esses animais são eficientes bioindicadores e através de estudos histopatológicos e apoptóticos das brânquias e fígado é possível avaliar o impacto que esses organismos sofrem quando expostos a condições ambientais adversas (Schwaiger et al., 1997; Guardiola et al. 2013; Montes et al., 2015; Nimet et al., 2018).

As brânquias são órgãos pares que estão em contato direto com o meio externo e realizam funções vitais como, trocas gasosas, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de nitrogênio (Piper & Scheid, 1982). A estrutura branquial é formada por filamentos branquiais e regiões interlamelares revestidas por células pavimentosas, secretoras de muco, de cloreto e pilares (Evans et al., 2005; Fasulo et al., 2012). Portanto as brânquias são considerados como um excelente biomarcador (Schwaiger et al., 1997; Romão et al. 2006; Carvalho-Neta et al., 2012). E, a detecção da ocorrência de apoptose via sinalização de caspase-3 nas brânquias é uma excelente ferramenta para intensificar a gravidade de dano no órgão.

Embora haja relatos que brânquias de peixes expostas a determinados poluentes não promovam indução das vias de ativação para Caspase-3 (Monteiro et al, 2009).

Por outro lado, o fígado é um órgão responsável pela síntese e degradação de proteínas, lipídios, carboidratos, e metabolização de substâncias tóxicas, sendo capaz de sofrer alteração estrutural e metabólica quando exposto a poluentes, toxinas, parasitos e microrganismos. Estas alterações podem ser diagnosticadas por diferentes patologias que podem levar o animal à morte (Hibiya, 1982; Flores-Lopes and Malabarba, 2007; Camargo and Martinez 2007; Guardiola et al. 2013). Apoptose é um mecanismo natural de morte celular necessária para manter a osmoregulação do organismo (Kerr et al., 1972; Voronina and Wessel, 2003; Jiang et al. 2017), porém o estresse no ambiente pode elevar a ativação da via efetora Caspase-3 e promover um dano no tecido (Krumschnabel, et al., 2010).

Na região amazônica *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794) é uma espécie comumente conhecido como "blue catfish", de hábito onívoro, não migratório e encontrado em rios e estuários. É uma espécie importante para a pesca artesanal, sendo fonte proteica para comunidade ribeirinha e contribuindo para economia local (Carvalho-Neta and Abreu-Silva, 2012; Giarrizzo and Saint-Paul, 2008). Baseado na hipótese que as condições estuarinas em períodos sazonais e efeito antropogênico distintos podem influenciar na saúde do animal. O presente estudo tem o objetivo de investigar em dois estuários amazônicos em períodos sazonais chuvoso e seco, as condições físico-química da água, a ocorrência e frequência da histopatologia e caspase-3 nas brânquias e fígado de *S. herzbergii* e correlacionar os estágios histopatológicos com as condições ambientais estuarinos.

Material e Métodos

Área de estudo

Foram realizados estudos entre março/2014 a fevereiro/2015 nos períodos seco e chuvoso de acordo com a pluviometria da região em dois ambientes de estuário (Figura 1): Área I, Estuário Bragantino- Pará, o rio Caeté (0°55’14’’/ 46°41’38’’ NW, 0°57’27’’/ 46°35’53’’ NE, 1°34’4’’/46°52’29’’ SE), possui uma extensão de 2.195 km^2 consistindo em sistema litorânea de terras altas e macro-marés (Gorayeb, 2009). É uma área de pesca artesanal, considerada como uma importante atividade socioeconômica, pois serve de fonte de alimento e renda para a população ribeirinha (Glaser and Oliveira, 2004); Area II, baia de São Marcos - Maranhão (26º02’/26º28’S, 48º28’/48º50’W) com uma extensão territorial de 100 Km. Possui atividade industrial e portuário onde há relatos da vulnerabilidade do sistema aquático a

contaminantes pela presença de metais (Carvalho-Neta et al., 2012; Berg et al., 2013; Cantanhêde et al., 2016).

Amostras de Fatores Abióticos

Nos ambientes *in situ* foi determinado os parâmetros: temperatura (^{o}C), salinidade (‰), oxigênio dissolvido (DO), potencial hidrogeniônico (pH), condutividade (s.m/mm^2) e turbidez (NTU) da água com o auxílio de um multianalizador de água (Horiba U-10).

Processamento e análise do material biológico

Espécimes de *S. herzbergii* foram capturados utilizando redes com diferentes tamanhos de malha (25, 40 e 50mm). Em seguida os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1 g.L-1) e eutanasiados de acordo com as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Os peixes foram pesados (massa total em gramas - MT) e medidos (comprimento total em centímetros - TL), o segundo arco branquial direito e fragmentos de fígado foram dissecados e imediatamente fixados em solução de Bouin por 24 h. Em seguida, as amostras foram submetidas a processamento histológico de rotina para inclusão em parafina (Prophet et al., 1995). Cortes de 5µm de espessura foram corados em hematoxilina-eosina, analisados e fotomicroscópio Eclipse Ci-S (NIKON, Japão) conectado a uma câmera digital DS-Ri1 (NIKON, Japão).

A ocorrência de alterações histopatológicas nas brânquias foi avaliada de duas formas distintas: **a)** cálculo do valor médio de alteração (VMA), baseado com incidência de lesões segundo Schwaiger et al. (1997). Foram atribuídos valores numéricos para cada animal, de acordo com a seguinte escala: grau 1 (ausência de alteração histopatológica), grau 2 (alterações pontualmente localizadas) e grau 3 (alterações amplamente distribuídas pelo tecido); **b)** Cálculo do índice de alteração histopatológica (IAH), com base na severidade de cada lesão (Poleksic and Mitrovic-Tutundzic, 1994).

Cada alteração foi classificada em estágios progressivos quanto ao comprometimento das funções teciduais em brânquia e fígado: estágio I (hipertrofia do epitélio, elevação epitelial, fusão incompleta de várias lamelas, hipertrofia dos hepatócitos, congestão dos vasos e degeneração do hepatócito); estágio II (fusão lamelar, degeneração gordurosa, centros melanomacrófagos, hepatite); estágio III (necrose focal). Um valor de IAH foi calculado para cada animal (IAH = 1. $\sum$I + 10 $\sum$II + 100 $\sum$III) onde I, II e III corresponde ao número de alterações de estágio I, II e III respectivamente. Os valores de IAH entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do tecido, entre 11 e 20 indicam danos leves a moderados ao órgão,

entre 21 e 50 indicam danos de moderados e severos, de 50 a 99, danos mais severos à brânquia e maiores que 100 indicam danos irreversíveis no tecido.

Imunohistoquímica

Réplicas de lâminas previamente identificadas, contendo cortes de brânquias e fígado de *S. herzbergii* foram desparafinizados em xilol, lavados em solução tampão fosfato salino (PBS) incubados em peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos, imersos em tampão citrato de sódio aquecido a 70 ° C durante 25 minutos, bloqueado com 10% de soro normal de cabra (16210072, Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) durante 1 hora e incubadas em anticorpo primário policlonal anti Caspase-3 (clivada) de coelho (1: 200; AB3623, Millipore Corporation) *overnight.* Em seguida as amostras foram incubadas em anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado com peroxidase durante 2 horas, reveladas em DAB (3, 3'diaminobenzidina) por 5 minutos, lavadas em água destilada, contrastadas com hematoxilina e examinadas em microscópio de luz Eclipse Ci-S (Nikon, Japão) conectado a uma câmera digital DS-Ri1 (Nikon, Japão). Os controlos negativos foram incubados em PBS substituindo o anticorpo primário por PBS seguido de incubação em anticorpo secundário.

Análises estatísticas

Para comparar a média dos fatores abióticos entre as áreas de estudos nos períodos sazonais foi utilizado teste-t, para avaliar a relação do número de animais com alterações histológicas branquiais e hepáticas entre as áreas foi usado teste não paramétrico de Kruskall-Wallis, e para comparar a relação peso e comprimento entre indivíduos da mesmo ambiente e entre os dois ambientes estuarinos em períodos chuvoso e seco foi realizado uma correlação de Spearman (p). As analise foram realizadas utilizando Bioestat 5.0 software (Ayres et al., 2007).

Resultados

A análise dos parâmetros físico-químico (turbidez, salinidade, pH e condutividade da água) entre os ambientes estuarinos mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as áreas. No entanto esses parâmetros não diferiram estatisticamente entre os períodos sazonais amostrados (tabela 1).

Tabela 1: Média (±Desvio padrão dos parâmetros físico-químico da água nas áreas I e II durante os períodos seco e chuvoso.

Periodo/	**Seco**						**Chuvoso**					
Área	**T**	**S**	**Tu**	**C**	**DO**	**pH**	**T**	**S**	**Tu**	**C**	**DO**	**pH**
Area	28.9	34.2[a]	41.7[a]	51.9[a]	5.1	7.8[a]	28.0	15.9[a]	29.3[a]	26.3[a]	6.5[a]	7.1[a]
I	(±1.0)	(±1,7)	(±18.5)	(±2.4)	(±1.1)	(±0.2)	(±1.0)	(±2.7)	(±18.1)	(±3.6)	(±1.2)	(1.7)
Area	28.0	32.8[b]	213.1[b]	50.1[b]	5.9	8.3[b]	28.0	28.2[b]	257.2[b]	43.5[b]	8.1[b]	8.1[b]
II	(±0.4)	(±2.5)	(±195.3)	(±3.4)	(±0.8)	(±0.3)	(±0.7)	(±4.2)	(±270.8)	(±6.1)	(±3.4)	(±0.9)

Sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas. T = temperatura; S= salinidade; Tu = turbidez; C= condutividade; DO= oxigênio dissolvido. pH; DP= desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças estatísticas.

Um total de 352 espécimes de *S. herzbergii* foram coletados, sendo analisados 176 animais por área. Os peixes capturados nos dois ambientes estuarinos não apresentaram alterações macroscópicas. 88% dos indivíduos capturados na área I não apresentaram lesões nos tecidos branquial e hepático. Contudo, 95% dos espécimes da área II apresentaram algum tipo de lesão branquial e hepática. Histologicamente o arco branquial era constituído por vários filamentos branquiais. Cada filamento era sustentado por uma cartilagem hialina e formado por lamelas primárias e secundárias, as lamelas eram revestidas por um epitélio pavimentoso simples formado por células mucosas, de cloreto e pilares (Fig. 2 A-C). Nos animais capturados na área I as alterações branquiais observadas foram hiperplasia lamelar primária (Fig. 2D). Em contraste, 95% dos indivíduos coletados na área II apresentaram hiperplasia e hipertrofia lamelar caracterizadas pela proliferação da células epiteliais com aumento da espessura das lamelas; elevação epitelial observada pelo deslocamento do epitélio e surgimento de espaços com aparecimento de edemas; fusão lamelar caracterizada por aumento e união das lamelas primárias e secundárias com infiltrado inflamatório; e aneurisma caracterizada pelo extravasamento de sangue na lamela secundária (Fig. 2 E-H). Somente as células de cloreto nas brânquias com hiperplasia lamelar apresentaram imunomarcadas para Caspase-3 clivada na

área I. Enquanto espécimes da área II apresentaram imunomarcação principalmente nas células mucosas e de cloreto em todas as lesões: hiperplasia, elevação epitelial, fusão lamelar e aneurisma (Fig. 2 I-L).

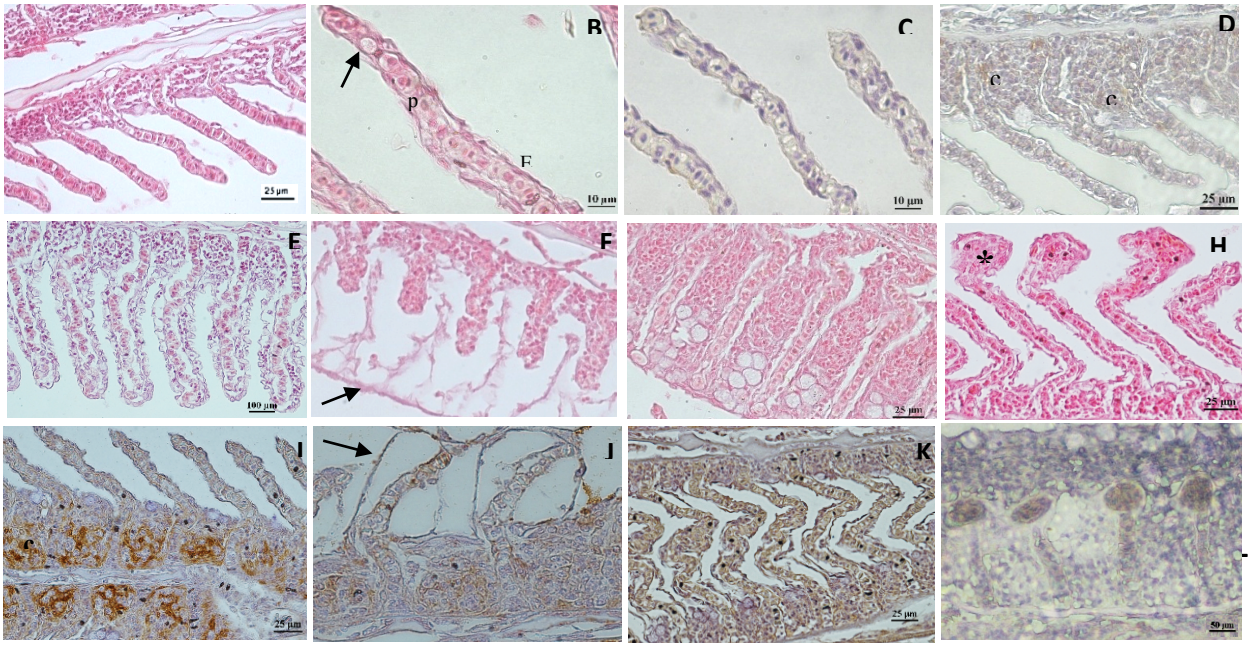

Fig. 2 – Fotomicrografia do filamento branquial de *S. herzbergii*. Area I (A-D): **A-** Estrutura normal da lamela branquial (L1 and L2). **B-** Detalhe da lamella secundária mostrando as células- epitelial (Ec), mucosa (seta), and pilar (p). **C**- controle negativo para caspase-3. **D**- Brânquia com hiperplasia lamelar e imunorreação na célula de cloreto (c). Area II (E-L): **E**- Hipertrofia da lamela; **F**- Elevação epitelial (seta); **G**- Fusão lamelar; **H**- Aneurisma (*). I-L Imunolocalização para caspase-3: **I**- Hiperplasia com imunomarcação de caspase-3 nas células de cloreto; **J**- Elevação epitelial com imunomarcação na lamela secundária **K**- Fusão lamelar com imunomarcação nas lamelas primária e secundárias; **L**- Aneurisma com marcação nos infiltrados leucocitários.

Espécimes que apresentaram lesões do tipo congestão de vasos e degeneração dos hepatócitos revelaram intensa imunomarcação para Caspase-3 clivada (Fig. 3 I-L). Observamos que a frequência dos tipos de lesões branquiais e hepáticas diferiram significativamente entre as áreas I e II ($p < 0,05$) (fig.4). Todavia a relação das frequências de lesões nas áreas entre os períodos sazonais não apresentaram diferenças significativas tanto para brânquias como para o fígado.

A análise histológica do fígado revelou que os espécimes na área I apresentaram um parênquima hepático constituído pela veia centro lobular (VCL) circundado por cordões de hepatócitos e capilares sinusóides (Fig. 3A-B). Alguns animais capturados nessa área

apresentaram hipertrofia do hepatócito. Enquanto na área II 95% dos espécimes analisados mostraram fígado com congestão dos vasos caracterizado pelo acúmulo de sangue e presença de centros melanomacrófagos; hepatite demonstrado por um parênquima desorganizado; inflamação caracterizado pela hipertrofia dos hepatócitos e infiltrados leucocitários próximos às células hepáticas; degeneração dos hepatócitos com perda da integridade citoplasmática e necrose (Fig. 3 E-L).

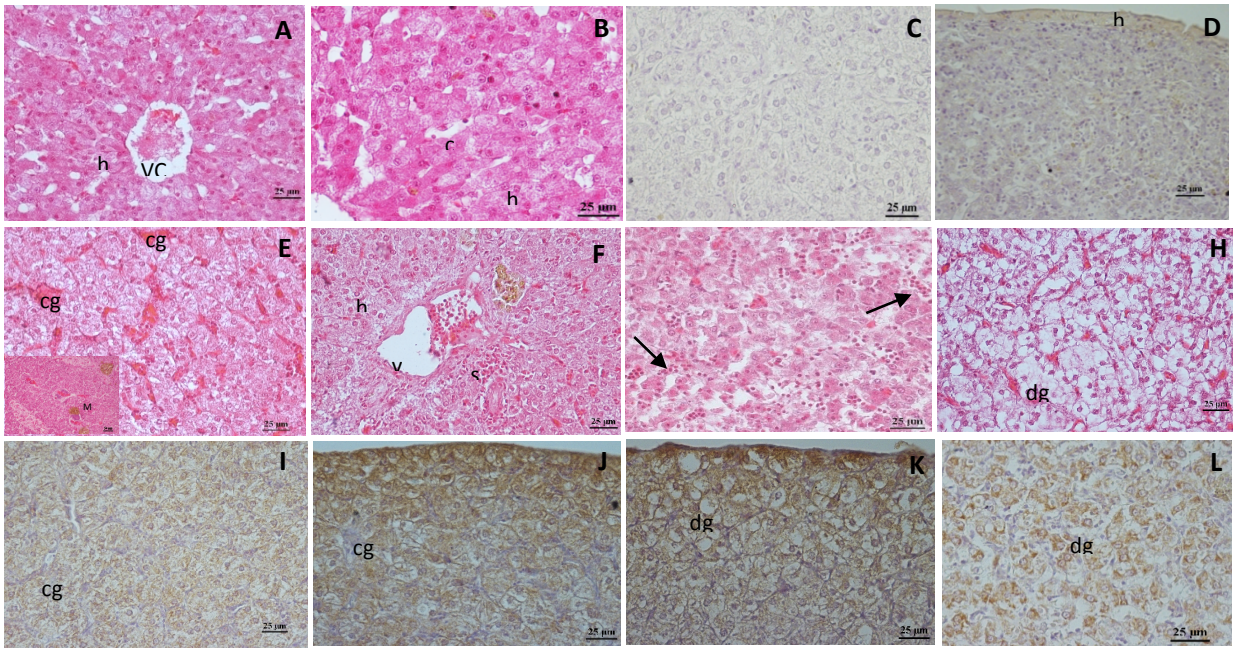

Fig. 3 – Fotomicrografia do fígado de *S. herzbergii*. Area I (A-D). **A-** Estrutura normal hepática, veia centro lobular (VCL) circundada de hepatócitos (h) dispostos em cordões e a presença de capilares sinusóides. **B-** detalhe dos cordões de hepatócitos e capilares sinusóides (cs). **C-** controle negativo para caspase-3. **D-** imunomarcação de caspase-3 em hepatócitos periféricos. Área II (E-L): **E-** congestão dos vasos, vasos dilatados e preenchidos por sangue (cg). Insert- presença de centro melanomacrófagos (M). **F-**Hepatite, vaso dilatado (v), hepatócitos hipertrofiados e extravasamento de sangue no parênquima (s). **G-** Inflamação, hipetrofia do hepatócito e infiltrado leucocitário no parênquima (seta). **H-** Degeneração dos hepatócitos, perda da integridade e vacuolização citoplasmática dos hepatócitos (dg). I-L: Imunolocalização para caspase-3: I-J congestão dos vasos (cg). K-L– degeneração dos hepatócitos (dg).

Ao analisar a relação massa e comprimento entre indivíduos das duas áreas de estudo, verificamos diferença significativa ($p<0,05$) entre as áreas I e II (tabela 2). Nessa relação verificamos também uma interação positiva, com crescimento alométrico em ambas as áreas, área I ($R^2 = 0,924$) e área II ($R^2 = 0,978$). O menor crescimento e massa foi observado para espécie da área II.

Tabela 2. Média (±Desvio Padrão) do comprimento (cm) e peso (g) total de *S. herzbergii* capturados em duas áreas do estuário amazônico.

Período/	**Seco**				**Chuvoso**			
Biometria	**AI N** (n=75)	**AI L** (n= 13)	**AII N** (n= 7)	**AII L** (n=81)	**AI N** (n= 80)	**AI L** (n= 8)	**AII N** (n= 6)	**AII L** (n= 82)
CT (cm)	23.5 (± 4.5)	21.4 (± 6.0)	18.7 (± 5.3)	16.3 (± 4.4)	27.9 (± 4.9)	27.6 (± 5.1)	23.1 (± 4.7)	20.0 (± 4.0)
PT (g)	183.97[a] (± 48.3)	175.5[a] (± 30.9)	136.2[b] (± 52)	130.7[b] (± 39.4)	239.3[a] (± 68.7)	228.4[a] (± 48.5)	123.3b (± 47.9)	135.4[b] (± 35.8)

Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam diferença estatística. **AI N**= indivíduos da área I sem alteração branquial e hepática; **AI L** = indivíduos da área I com alterações branquial e hepática; **AII N**= indivíduos da área II sem alteração branquial e hepática; **AII L**= indivíduos da área II com alteração branquial e hepática; n= número de espécimes coletadas e diagnosticadas. CT= comprimento total. PT= peso total.

Para as espécimes que demonstraram alteração tecidual as maiores incidências na brânquia foram elevação epitelial, fusão lamelar e proliferação celular, enquanto para o fígado foram hipertrofia do hepatócito, vacuolização e degeneração do hepatócito e congestão de vasos, sendo atribuído estágios de alteração histológica (Tabela 3).

Tabela 3: Estágios histopatológico branquial e hepático e número de indivíduos capturados nas áreas I e II nos períodos chuvoso e seco

Estágios	Seco				Chuvoso			
	AIL		AIIL		AIL		AIIL	
	branquial	hepática	branquial	hepática	branquial	hepática	branquial	hepática
I	7	4	7	2	4	2	9	3
II	0	1	13	21	0	1	8	22
III	0	0	20	10	1	0	21	8
IV	0	0	3	6	0	0	4	7

AI L = indivíduos da área I com Lesão branquial e hepática; **AII N**= indivíduos da área II sem alteração branquial e hepática; **AII L**= indivíduos da área II com lesão branquial e hepática

Discussão

Neste estudo analisamos as condições de *S. herzbergii* em dois ambientes estuarinos, um sem influência antrópica e outro com históricos de influência antrópica. Sabe-se que a descarga de poluentes pode levar alterações na dinâmica dos fatores abióticos, que por sua vez pode reduzir a distribuição e a diversidade de organismos aquáticos estuarinos (Lam-Hoai et al. 2006; Silva et al. 2009).

Os parâmetros físico-químicas como turbidez, salinidade, pH e condutividade apresentaram diferenças significativas entre as áreas. Na área II as variáveis física e químicas foram mais elevadas, este cenário pode ser resultado da atividade portuária e industrial, somado aos fatores ambientais naturais do estuário da região como: velocidade da corrente de maré acima de 4,0 ms^{-1} (Trindade et al., 2011); intensidade dos ventos que atingem até 10 ms^{-1} durante a estação seca (Souza-Filho et al., 2009). No entanto na área I os parâmetros físico e químicos observados indicaram uma boa qualidade de água verificada pelo baixo número de indivíduos com lesão branquial e com categoria atribuída como grau leve (Poleksic and Mitrovic-Tutundzic, 1994). Contrariamente, os animais da área II que apresentaram lesão severa nas brânquias e no fígado, condição patológica que está ligada a qualidade da água da área II. Há relatos da presença de traços de metal, além dos resíduos da atividade portuária e indústrial (Carvalho-Neta, 2014).

As alterações branquiais principalmente aneurisma e fusão lamelar (estágio IV e III) modificam a estrutura tecidual e consequentemente dificultam ou impedem as trocas gasosas e a osmoregulação processos de alta necessidade metabólica para o organismo **(**Baldisserotto, 2011). Além de lesões nos hepatócitos consideradas altamente severa (estágio IV) demonstram injúrias**,** dificultando atividade metabólica para oxidação, conjugação e metilação de substâncias tóxicas (Shahzad et al, 2018).

As imunorreações para caspase-3 nas células epiteliais e de cloreto no filamento branquial estavam presentes nas hiperplasia e fusão lamelar dos animais principalmente na área II. Aspecto semelhante foi evidenciado em truta arco-íris tratados com clorpirifo (Topal et al., 2014) e em duas espécies de peixes importantes no delta amazônico (Montes et al., 2015). Reação similar foi encontrada em lesões do tipo congestão dos vasos sanguíneos hepáticos.

Há relatos que o aumento da taxa de proteínas pró-apoptóticas comprometem a saúde do animal (Zhang et al., 2012), a qual pode ser comprovada pela presença de centros melanomacrófagos associados a lesões mais severas. Evidenciando assim que a defesa imune

do animal está ativada contra os agentes tóxicos (Zeppenfeld et al. 2014). Nós observamos que os indivíduos da área II eram menores em massa e comprimento, apresentaram lesões severas principalmente no período chuvoso. Enquanto que alterações histológicas observadas nos peixes da área I eram em menor proporção e grau de severidade leve foram decorrentes de variações naturais do estuário amazônico. Em contrapartida o grau de lesão altamente severa evidenciada nos animais da área II estão diretamente relacionadas com a qualidade da água, embora não podemos inferir qual poluente está afetando diretamente a saúde dos peixe. Contudo somente a análise química não é suficiente para avaliar adequadamente os efeitos adversos da mistura complexa de contaminantes da água (Van der Oost et al., 2003; Martinez-Haro et al., 2015).

Neste contexto podemos inferir que o biomarcadores histológicos utilizado no presente estudo fornecem sinais de alerta precoce de exposição aos poluentes, já estabelecidos pela presença de metais na região da área II. Por conseguinte eles têm aumentado a susceptibilidade dos peixes as doenças e possivelmente conduzí-los à morte. Desta forma podemos estabelecer a espécie como biomonitor ambiental da qualidade da água.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro foi fornecido pela REDE VALE / FAPESPA ICAAF nº 02/2012. Agradecemos ao Programa de Treinamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e a Universidade de Aveiro- PT pelo processamento das amostras.

Referências

Ayres, M. BioEstat 5.0 - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Universidade Federal do Pará. Belém, 2007.

Baldisserotto, B. 2011.Water pH and hardness affect growth of freshwater teleosts. Revista Brasileira de Zootecnia, 40: 138-144.

Barletta, M.; Barletta-Bergan, A.; Saint-Paul, U.; Hubold, G. (2005) The role of salinity in structuring the fish assemblages in a tropical estuary. J. Fish. Biol., v. 66, n. 1, p. 45-72.

Berg, CH; Guercio, MJ & Ulbricht, VR (2013). Indicadores de balneabilidade: a situação brasileira e as recomendações da World Health Organization. *Int. J. Knowl. Eng. Manag, 2*(3), 83-101.

Bloch, 1794. (2004) Pisces – *Erythridae de quatro lagoas do Norte do Estado do Rio de Janeiro.* Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ, UENF.

Borges AV, Darchambeau F, Teodoru CR, Marwick TR, Tamooh F, Geeraert N, Omengo FO, Guérin F, Lambert T, Morana C, Okuku E. Seasonal and inter-annual variations in carbon fluxes in a tropical river system (Tana River, Kenya). Aquatic Sciences, , 80:19, 2018.

Cantanhêde L.G., Carvalho I.F.S., Santos N.B., Almeida Z.S. Biologia reprodutiva do *Hassar affinis* (Pisces: Siluriformes, Doradidae), Lago de Viana, Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil. Acta Amazonica, v.46, p.219-226, 2016.

Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. Neotropical Ichthyology, Porto Alegre, v. 5, n. 3, p. 327-336, 2007.

Carvalho-Neta R.N.F.; Torres Jr, A.R. & Abreu-Silva A.L. Biomarkers in Catfish Sciades herzbergii (Teleostei: Ariidae) from Polluted and Non-polluted Areas (São Marcos' Bay, Northeastern Brazil). Appl Biochem Biotechnol. 166**,** 1314–1327. 2012.

Carvalho-Neta, RNF; Sousa, DBP; Almeida, ZS; Santos, DMS & Tchaicka, L. A histopathological and biometric comparison between catfish (Pisces, Ariidae) from a harbor and a protected area, Brazil. Aquatic Biosystems. *10*, 12. 2014.

Evans, DH; Piermarine, P.M. & Choee, K.P,. The multifunctional fish Gill: Dominante site of gas exchange, osmoregulation, Acid-Base regulation, and excretion of Nitrogenous Waste. Physiological Reviews. 85*,* 97-177. 2005.

Fasulo, S., Iacono, F., Cappello, T., Corsaro, c., Maisano, M., D'Agata, A., Giannetto, a., de Domenico, e., Parrino, v., Lo Paro, G., Mauceri, A. Metabolomic investigation of mytilus galloprovincialis (lamarck 1819) caged in aquatic environments. ecotox. environ. safe 84, 139e146. 2012.

Flores-Lopes F. & Malabarba L.R. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambarí *astyanax jacuhiensis* (cope, 1894) (teleostei, characidae) sob influência de efluentes petroquímicos. biociências 15(2):166-172. 2007.

Giarrizzo, T., & Saint-Paul, U. Ontogenetic and seasonal shifts in the diet of the pemecou sea catfish Sciades herzbergii (Siluriformes: Ariidae), from a macrotidal mangrove creek in the Curuçá estuary, Northern Brazil Rev. Biol. Trop., 56, 861-873. 2008.

Glaser, M & RS Oliveira. Prospects for the co-management of mangrove ecosystems on the North Brazilian coast: Whose rights, whose duties and whose priorities? Natural Resources Forum *28*: 224-233. 2004.

Gorayeb, A; Lombardo, M.A & Pereira, L.C.C. Environmental conditions in urban area of the Caeté River Hydrographic Basin – Oriental Brazilian Amazon. Revista da Gestão Costeira Integrada. *9,* 59-70. 2009

Guardiola, F.A; Cuesta, A; Meseguer, J; Martínez, S; Martínezsánchez, M.J. Accumulation , histopathology and immunotoxicological effects of waterborne cadmium on gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & shellfish immunology*, v. *35*, p. 792–800. 2013.

Hibiya, T. Digestive System - Liver. In: An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features. Tokyo: Kodansha Ltd., 1982. p.82-90.

Jiang, D., Tang. R.J., Liu Y., Wu. P., Kuang. S.Y. Jiang. J., Tang. L., Tang. W.N., Zhang. Y.A., QiuZhou, X., Feng, L. Impairment of gill structural integrity by manganese deficiency or excess related to induction of oxidative damage, apoptosis and dysfunction of the physical barrier as regulated by NF-κB, caspase and Nrf2 signaling in fish. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 70, 280-292, 2017.

Kerr J.F.R., Willie A.H, Currie A.R. Apoptosis: basis biological phenomenon with wide ranging implicatons in tissue kinetics. British J Cancer 26:239-257. 1972.

Krumschnabel G, Ebner HL, Hess MW and Villunger A (2010). Poptosis and necroptosis are induced in rainbow trout cell lines exposed to cadmium. *Aquatic Toxicol*. 99(1):73-85.

Lam-Hoai, T; D. Guiral & C. Rougier Seasonal change of community structure and size spectra of zooplankton in the Kaw River estuary (French Guiana). Estuarine, Coastal and Shelf Science *68* (1-2): 47-61. 2006.

Lima, D. P.Avaliação da contaminação por metais pesados na água e nos peixes da bacia do Rio Cassiporé, Estado do Amapá, Amazônia, Brasil.Amazonas, 147. 2013.

Mansouri, B.; Ebrahimpour, M.; Babaei, H. Bioaccumulation and elimination of nickel in the organs of black fish (*Capoeta fusca*). Toxicology and Industrial Health, v. 28, n. 4, p. 361-368, 2012.

Martinez-Haro, M.; Beiras, R.; Bellas, J.; Capela, R.; Coelho, L.P.; Lopes, I.; Moreira-Santos, M.; Reis-Henriques, A.M.; Ribeiro, R.; Santos, M.; Marques, J.C. A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: what might be the added value of their combination? Ecological Indicators**,** v.48, pg. 8–16, 2015.

Monteiro, SM; Santos, NMS; Calejoc, M; Fontainhas-Fernandes & A Sousa, M. Copper toxicity in gills of the teleost fish, *Oreochromis niloticus*: Effects in apoptosis induction and cell proliferation. Aquatic Toxicology*,* 94, 219–228. 2009

Montes CS; Ferreira, M.A.P.; Santos, S.S.D. & Rocha, R.M. Environmental quality of an estuary in Amazon delta using immunohistochemical and morphological analyses of gill as biomarkers. Acta Scientiarum Biological Sciences, *37*, 113-121. 2015.

Nimet, J.; Amorim, J. P.A; Delariva, R.L. Histopathological alterations in Astyanax bifasciatus (Teleostei: Characidae) correlated with land uses of surroundings of streams. Neotropical Ichthyology, v. 16, p. e170129, 2018.

Piper, J. A model for evaluating diffusion limitation in gas-exchange organs of vertebrates. In A Companion to Animal Physiology (ed. C. R. Taylor, K. Johansen & L. Bolis), pp. 49-64. Cambridge: Cambridge University Press. 1982.

Poleksic, V & Mitrovic-Tutundzic, V Fish gills as a monitor of subletal and chronic effects of pollution. In: Muller, R., Lloyd, R. sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fsh. Cambrodge*: Blacwell Sci*., p. 339-352. 1994.

Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B., Sobin L.H. Métodos Histotecnológicos*.* Instituto de Patologia de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP): Registro de Patologia de los Estados Unidos de América (ARP), Washington, D.C. 1995.

Romão, S.et al. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of Hoplias malabaricus and Geophagus brasiliensis. Braz. Arch. Biol. Technol**.**, v.49, n.3, p.441-448, 2006.

Scalon M.C.S., Rechenmacher C., Siebel A.M., Kayser M.L., Rodrigues M.T., Maluf S.W., Rodrigues M.A.S., Silva L.B. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. Braz J Biol.70(4):1217-1222. 2010.

Schwaiger, J; Wanke, R; Adam, S; Pawert, M; Honnen, W & Triebskorn, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery. *6*, 75-86. 1997.

Shahzad, K; Khan, M.N.; Jabeen, F.; Kosour, N.; Chaudhry, A.S.; Sohail, M. Evaluating toxicity of copper(II) oxide nanoparticles (CuO-NPs) through waterborne exposure to tilapia (Oreochromis mossambicus) by tissue accumulation, oxidative stress, histopathology, and genotoxicity. Environmental Science and Pollution Research, 1-11. 2018.

Silva, CA; Oliveira, RCA; Katsumiti, A; Araújo, MLP; Zandoná, EM; Costa, SGP; Souza-Filho, P.W.M.; Lessa, G.C; Cohen, M.C.L; Costa, F.R & Lara, RJ. The subsiding macrodial barrier estuarine system of the Eastern Amazon Coast, Northern Brazil. In: Dillenburg, S. F.; Hesp, P.A. (Org.). Geology and Geomorphology of Holocene coastal barriers of Brasil. 1 ed. New York: Springer. 1, 347-375. 2009.

Topal, A; Atamanal, M; Oruc¸ E; Kirici, M & Kocaman, E.M. Apoptotic effects and glucose-6-phosphate dehydrogenase responses in liver and gill tissues of rainbow trout treated with chlorpyrifos. Tissue and Cell .*46*, 490–496. 2014.

Trindade, W. N., Pereira, L. C. C., Guimarães, D. O., Silva, I. R., Costa, R. M.: The effects of sewage discharge on the water quality of the beaches of São Luis (Maranhão, Brazil). Journal of Coastal Research. 64, 1425-1429. 2011.

Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol 13:57-149. 2003.

Vauchel, P Estudo da cheia de 2014. na bacia do rio Madeira. Institut de recherche pour le développement - IRD. 1-26. 2014.

Zeppenfeld, C.C.; Alexssandro C.T.; Beckera G.; Miron D.S.; Parodia T. V.; Heinzmann B. M.; Barcellos L.J.G.; Koakoski G.; Rosa J.G.V.; Loro V.L.; Cunha M.A.; Baldisserotto B. Physiological and biochemical responses of silver catfish, Rhamdia quelen, after transport in

water with essential oil of Aloysia triphylla (L'Herit) Britton. Aquaculture 418–419, 101-107, 2014.

Vinodhini, R; Narayanan, M Heavy metal induced histopathological alterations in selected organs of the *Cyprinus carpio* L. (Common Carp) Int J Environ Res. *3,* 95–100. 2009.

Voigt, C.L.; da Silva, C.P.; Doria, H.B.; Randi, M.A.F.; de Oliveira Ribeiro, C.A & de Campos, S.X. Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. Environmental Science and Pollution Research International. 2014.

Voronina E. & Wessel, G.M. The regulation of oocyte maturation G. Schatten (Ed.), Current Topics in Developmental Biology. Amsterdam, the Netherlands, pp. 53-110, 2003.

Zeppenfeld C.C., Toni C., Becker A.G .Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of Aloysia triphylla (L'Herit) Britton. Aquaculture 418e419, 101e107. 2014.

Zhang, H; Shao, D; Wu, Y; Cai, C; Hu, C; Shou, X; Dai, B; Ye, B; Wang, M & Jia, X (2012). Apoptotic responses of Carassius auratus lymphocytes to nodularin exposure in vitro. Fish & Shellfish Immunologyy 33, 1229–1237. 2012.

CAPÍTULO 2

Uso de Biomarcadores Bioquímicos em *Sciades herzbergii* (Bloch, 1794) e Identificação de Metais traços no Biomonitoramento do estuário amazônico

Resumo

Os biomarcadores enzimáticos, sobretudo enzimas de estresse oxidativo, são ferramentas indispensáveis para o estudo de qualidade do ambiente aquático. O objetivo do presente estudo é utilizar os biomarcadores bioquímicos nos tecidos nervoso, branquial e fígado de *S. herzbergii* e verificar a presença de metais traço nos tecidos e sedimento de fundo para avaliar a qualidade ambiental de duas áreas do estuário Amazônico. A coleta do material foi subdividida em duas áreas: área I - estuário do Rio Caeté (Bragança-PA sem influência antrópica; área II - baia de São Marcos com histórico de contaminação, onde há um complexo portuário de São Luís - MA. A coleta de sedimento foi realizada nos mesmos pontos de captura dos animais. Fragmentos dos tecidos branquiais e fígado foram dosados para atividade da enzima Glutationa-S-transferase (GST), Catalase (CAT) e Lipoperoxidação (LPO), Acetilolinesterase foi utilizado para o tecido nervoso. As variáveis físico-químicas turbidez, salinidade, pH e condutividade elétrica apresentaram diferenças significativas entre as áreas. Ocorreram diferenças significativas GST nas brânquias e CAT no fígado, nos animais capturados na área II. Houve diferenças significativas na presença de metais traço no sedimento de fundo como nos tecidos biológicos. As maiores concentrações de metais traços foram observadas para o Alumínio, Ferro, Níquel e Cádmio para os espécimes coletados na área II. Concluímos que A alta concentração de metais no sedimento e nos tecidos biológicos dos peixes coletados na área II, aliados a alta atividade enzimática antioxidantes mensurados nesses espécimes refletem o risco que a biota aquática está submetida.

Palavras-chave: metais, estresse oxidativo, *S. herbergii*, sedimento de fundo, peixes

Abstract

The enzymatic biomarkers, especially oxidative stress enzymes, are an indispensable tool for the study of water quality. Therefore the present study was to use the biochemical biomarkers in the gill, liver and brain tissues of *S. herzbergii* and verify the presence of metals in the tissues and sediment to evaluate the environmental quality of the water of two areas of the Amazon estuary. The area without a history of contamination (area I) was the Caeté River estuary (Bragança-PA) and the area with a history of contamination (area II) was São Marcos Bay, where there is a port complex of São Luis-MA. Sediment sampling from the water was performed at the same capture points of the animals. For the biochemical analyzes were used: Cholinesterase, GST, Catalase and LPO) fragments of nervous, gill and liver tissues. The quantification of the concentration of metals in biological tissues (fish) and sediment followed by the same methodology adapted from KRUG (2008). The physical-chemical variables turbidity, salinity, pH and conductivity presented significant differences between the areas. There were significant differences between these biochemical parameters only for Glutathione-S-Transferase (GST) in the gills and catalase (CAT) in the liver, the animals captured in area II had higher enzymatic activity values. There were significant differences in the presence of metals in both the sediment and biological tissues and also the highest concentrations for Aluminum, Iron, Nickel, Copper and Cadmium occurred. The high concentration of metals in the sediment and biological tissues of the fish collected in the area in area II, allied to the high or enzymatic inactivity of the oxidative stress enzymes measured in the specimens of the same area, reflect the risk that the aquatic biota.

Keyword**:** metals, oxydative stress, *S. herbergii*

Introdução

Com o processo de industrialização, as atividades antropogênicas ligadas a indústria e agricultura aumentaram significativamente, resultando na produção e na liberação para o meio ambiente grande quantidade de contaminantes, especialmente metais, o que provoca perigo para invertebrados, peixes e humanos (Uluturhan and Kucuksezgin, 2007; Bauvais et al. 2015. Efluentes industriais, metais, lixo doméstico, esgoto, transporte de minérios e contaminantes de processos agrícolas e aquícolas, dependendo do tempo de exposição e a biodisponibilidade desses tóxicos contaminam ambientes aquáticos, principalmente regiões de estuário, ameaçando a biota aquática (Santos et al., 2015; Valle Junior et al., 2015; Dhanakumar et al., 2015), provocando desequilíbrios ecológicos, além de contaminar populações humanas, pois são consumidoras dessa biota (Monferrán et al., 2016).

Metais traço, podem ser classificados em essenciais (ferro, niquel e cobre) não essenciais. Os metais essenciais desempenham funções específicas no organismo, (Abadi et al., 2014). A deficiência de um metal essencial pode, portanto, causar um efeito adverso à saúde, enquanto sua alta concentração também pode resultar em impactos negativos e são equivalentes ou piores que as causadas por metais não essenciais (Kennedy, 2011), que por sua vez (alumínio, cadmiun, mercúrio), não são necessários aos organismos vivos, a variação nos parâmetros físico-químicos da água e a presença de contaminantes podem aumentar a biodisponibilidade desses metais, através de reações químicas específicas, no meio ambiente (Sfakianakis et al., 2015). Áreas portuárias podem aumentar a liberação e concentração de metais traço para ecossistemas aquáticos através dos resíduos de cargas, essa contaminação pode ter efeitos perturbadores no equilíbrio ecológico (Ashraf et al., 2006.)

O desenvolvimento de técnicas que visam o monitoramento ambiental, incluem os biomarcadores enzimáticos, sobretudo enzimas de estresse oxidativo (Zanette et al., 2008), pois componentes tóxicos possuem alta afinidade por pares de elétrons encontrados nos aminoácidos que formam as enzimas, como o grupamento sulfidril (Bertin & Averbeck, 2006; Ivanina et al., 2008) a presença de metais pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROS) provocando um desequilíbrio bioquímico alterando a atividade das enzimas antioxidantes (Chen et al., 2014; Kim et al., 2015; Kumar et al., 2015).

A presença de metais traços no sedimento de fundo e na água podem causar efeitos deletérios na biota aquática, pois interferem na respiração, no comportamento e na capacidade de natação do peixes, uma vez que esses metais podem ser acumulados nos tecidos dos peixes

por longos períodos (Tapia et al., 2012; Pyle et al., 2012; Alsop et al., 2014). Quando há contato e acúmulo de metais em organismo, ocorre o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio, radical superóxido e radicais hidroxil que causam estresse oxidativo nos organismos, impondo-lhes condições de vida subletal ou crônicas. Contudo, tais organismos desenvolvem um mecanismo de defesa através de enzimas antioxidantes, como a catalase para controle do estresse oxidativo (Palermo et al., 2015).

Dessa forma peixes que vivem em locais contaminados também possuem capacidade de adaptação evolutiva de tolerância a poluentes (Bourret et al., 2008). Então, o objetivo deste estudo foi avaliar os biomarcadores bioquímicos (Colinesterase, Catalase, GST e LPO e a presença de metais (alumínio, ferro, níquel, cobre, cádmio e mercúrio) em diferentes órgãos de *Sciades herzbergii* e no sedimento de fundo em dois ambientes no estuário amazônico.

Metodologia

Área de amostragem

As coletas do material (biológico e sedimento) foram realizadas em duas áreas (Fig.1): Área I – sem influência antrópica, corresponde aos canais de maré Chavascal e Serrado no sistema estuarino do rio Caeté (Bragança-PA S 00°48'45.9 W 046°37'35.2"), localizado na região norte do Brasil a aproximadamente 150 km ao sudeste do rio Amazonas. A bacia hidrográfica desse rio tem uma extensão de 2.195 km^2, sendo constituída por planalto costeiro, dominado por regime de macromarés (Gorayeb, 2008); Área II – apresenta influência antrópica corresponde aos canais de maré Irinema e Buenos Aires localizados na baía de São Marcos (São Luís-MA S 02°50'07.3" W 044°34' 41.9"), onde está instalado o complexo portuário. Os principais portos localizados nessa área são Terminal Marítimo de Ponta da Madeira (VALE), porto de Itaqui, porto da ALUMAR que se ocupam principalmente da exportação de minério de ferro e o Terminal de Passageiros de Ponta da Espera.

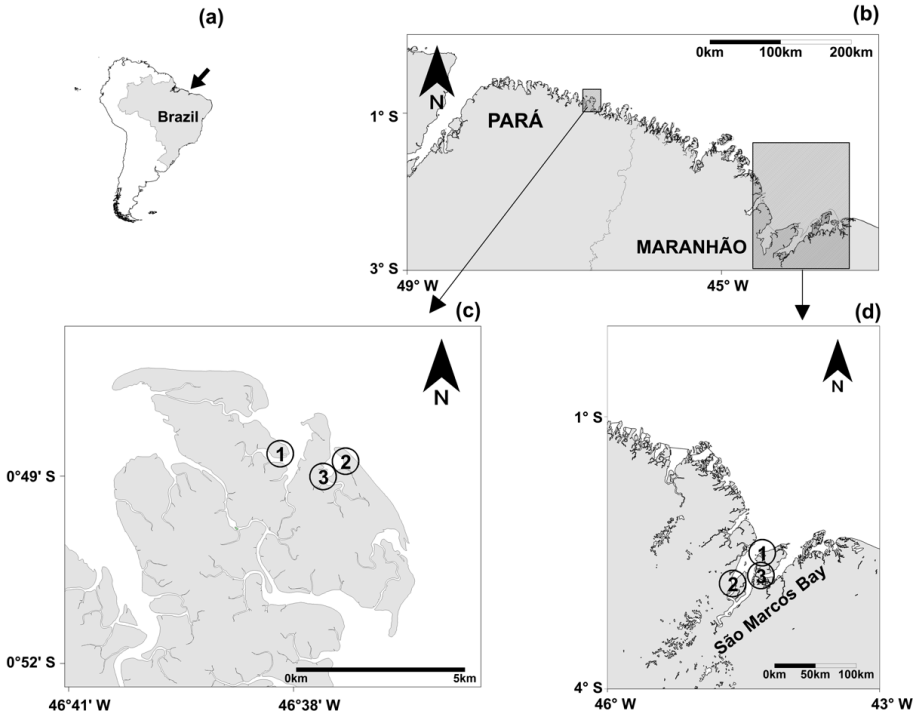

Fig 1. Área de estudo no estuário Amazônico, Brasil. (c) Área I, Bragança-Pará (1, 2, 3 – pontos de amostragem). (d) Área II Baia de São Marcos, Maranhão (1, 2, 3 – pontos de amostragem).

Amostras de tecidos

As coletas de material biológico foram realizadas trimestralmente, por 24 meses, utilizando redes de emalhar de (25mm) com extensão de 100 metros, medindo 2 metros de altura e com tamanho entrenós de 1-2 cm. A cada coleta, em cada área de amostragem 10 peixes eram capturados e identificados (Espírito Santo et al. 2005), gerando um total de 160 peixes capturados em toda o período. Após a coleta os animais foram anestesiados com benzocaína ($0.1g.L^{-1}$) e eutanasiados de acordo com as Diretrizes de Experimentação Animal, estabelecidos pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Em seguida os animais foram pesados (g), medidos (cm) e examinados externa e internamente para identificação de lesões macroscópicas. Fragmentos de brânquias, fígado, cérebro e músculo foram coletados e acondicionados em criotubos imediatamente em nitrogênio líquido para preservação integral dos componentes dos tecidos para a análise bioquímica e metais.

Amostras de Sedimento

A amostra de sedimentos foram coletadas sempre na maré enchente, com auxílio de uma draga de Elkman de aço inoxidável e no mesmo local que foram capturados os peixes. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, identificados e armazenados a 4°C. As amostras foram acedificadas (ácido nítrico), filtradas em filtro de acetado e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica com chama.

Parâmetros físico e químicos da água

A coleta dos parâmetros (temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, pH, condutividade e turbidez) da água foi realizada *in situ*, em maré enchente, na área onde ocorreu a coleta de material biológico, com a o auxílio de um multianalizador de água (HORIBA U-10).

Parâmetros Bioquímicos

Os fragmentos dos tecidos foram homogeneizadas em sonicador em tampão específico, com diluição de 1:4 e temperatura aproximada de 4 °C, centrifugadas 1000g x por 15 minutos a 4ºC para a extração do sobrenadante. A concentração proteica para todas as amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Glutationa – S – Transferase (GST)

A atividade da glutationa S-transferase (GST) foi determinada pela reação de conjugação de 1 mM de glutationa (GSH) com 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig e Jakoby, 1981). O aumento da absorbância representa a atividade desta enzima. A atividade da GST é expressa em unidades de GST/mg de proteínas. O coeficiente de extinção molar (ε) utilizado para a formação do conjugado CDNB-GSH foi 9,6 mM^{-1}. cm^{-1}. A leitura foi feita no leitor de micro placas (SAFAS MP96).

Catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada medindo-se, pelo espectrofotômetro, a taxa de decomposição enzimática do H2O2 a 240 nm (Beutler, 1975). A diminuição da absorbância representa a atividade da enzima, que é expressa em unidade de CAT/mg de proteína. O coeficiente de extinção molar (ε) utilizado para o H_2O_2 foi 0, 071 mM -1. cm-1. A leitura foi feita no leitor de micro placas (SAFAS MP96).

Hidroperóxidos lipídico (LPO)

A peroxidação lipídica foi medida pela quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o protocolo descrito em Buege e Aust (1978). TBARS foram expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA), calculados com um coeficiente de extinção de 1,56 × 105 M-1 cm-1. Esta metodologia baseia-se na reação de compostos como o malondialdeído (formado pela degradação de produtos iniciais de membranas lipídicas por ataque de radicais livres), com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).

Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade das colinesterases foi mensurada de acordo com o método de Ellman et al. (1961). O substrato acetiltiocolina é degradado pelas enzimas colinesterases, resultando em acetato e tiocolina. Este produto reage com o DTNB dando origem a um composto amarelo e esta formação pode ser determinada a 412 nm, permitindo seguir um aumento da absorvância. Os resultados foram expressos em nmol por min por mg de proteína.

Concentração de metais no sedimento e tecidos

A quantificação da concentração de metais nas brânquias, fígado e músculo do peixe e no sedimento de fundo foram realizadas pela metodologia adaptada de KRUG, 2008. Foi pesada uma massa de aproximadamente 0,2 g de cada amostra em tubos de Teflon, em seguida foi adicionado a cada tubo: 3 mL de HNO_3 concentrado, 1 mL de HCl e 1 ml de H_2O_2 para a digestão, seguiu-se no microondas Mars, CEM. Ao final do processo o conteúdo de cada tubo foi transferido a tubos tipo falcons e aferidos com água mili-Q ao volume final de 25mL. Posteriormente as análises foram realizadas em um Espectrômetro Óptico de Emissão com Plasma Induzido (ICP-OES) e chama.

Análises estatísticas

Para os dados de concentração de metais no sedimento e tecidos do peixe e as respostas bioquímicas (LPO, GST, Catalase e Acetilcolinesterase) foi realizada uma análise de variância

(ANOVA twoway). Os fatores abióticos das duas áreas foram analisados através de uma análise de componente principal (PCA). Em todas as análises foram consideradas diferenças significativas com $p< 0,05$.

Resultados

Fatores abióticos

Durante o período de amostragem diferenças significativas entre as áreas foram encontradas somente para turbidez, salinidade, pH e condutividade ($p <0,05$). No entanto não há diferenças significativas nas variáveis físicas e químicas entre os períodos sazonais.

Tabela 1 – valores médios dos parâmetros físico-químicos.

Loca de amostragem	**Área I**	**Área II**
Turbidez (NTU)	35,8 (±16,5)	275,1 (±195,3)
Salinidade	22,5 (±3,2)	29,8 (±2,5)
pH	7,5 (±0,2)	8,2 (±0,3)
Condut. elétrica (mS/cm)	31,3 (±2,4)	51,7 (±3,4)
Temperatura (°C)	28 (±1,1)	28 (±0,7)
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6.2 (±57,9)	8.6 (±43,8)

Biometria

Os 160 espécimes de *S. herzbergii* foram mensurados, apresentando uma relação entre peso e comprimento total similares entre indivíduos da mesma área, no entanto ao compararmos os indivíduos de áreas diferentes, ocorreu diferenças significativas ($p<0,05$) (tabela 2). Nessa relação verificamos também uma interação positiva, com crescimento alométrico em ambas as áreas (área I ($R^2 = 0,924$) e área II ($R^2 = 0,978$)), sendo o crescimento e o aumento de massa para espécie menor na área II.

Tabela 2 - Médias de comprimento total (cm), peso total (g) e Médias (± DP) de S. herzbergii de duas áreas do estuário amazônico.

Biometria/área	**Área I (n=80)**	**Área II (n=80)**
Comprimento Total (cm)	27.2^{a} (± 4.6)	18.8^{b} (± 4.9)
Massa (g)	233.3^{a} (± 67.7)	132.6^{b} (± 50.5)

Análise dos parâmetros bioquímicos

Nos tecidos dos peixes capturados em ambas as áreas foi observado diferenças significativas para Glutationa-S-Transferase (GST) nas brânquias e catalase (CAT) no fígado ($p<0,05$). Contudo não ocorreu diferença para AChE no tecido nervoso nem para o LPO nos tecidos branquial e hepático entre os animais de ambas áreas. Os animais capturados na área II apresentaram valores de atividades enzimáticas superiores que os da área I.

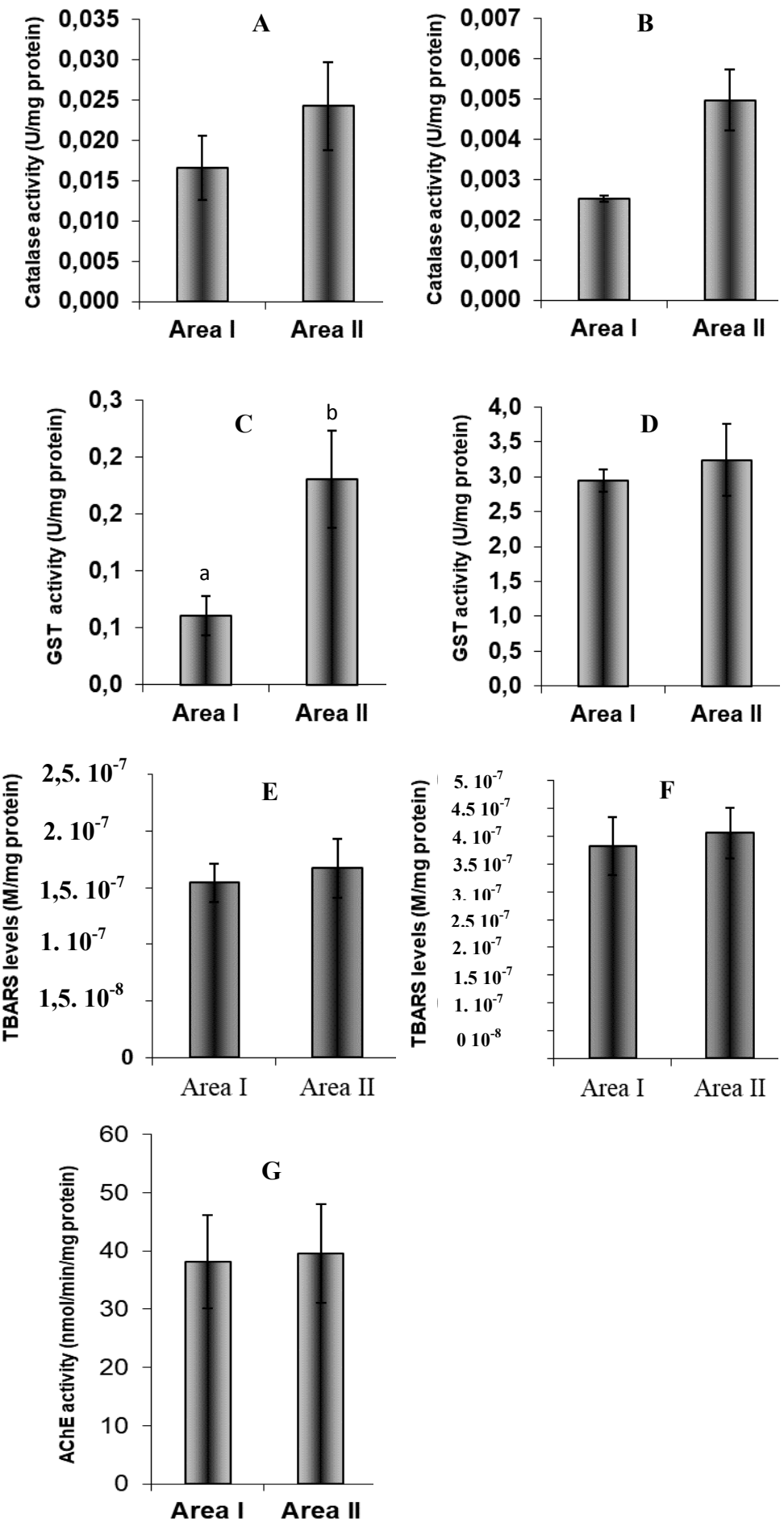
A
Catalase activity (U/mg protein)
0,035
0,030
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
0,000
Area I
Area II
B
Catalase activity (U/mg protein)
0,007
0,006
0,005
0,004
0,003
0,002
0,001
0,000
Area I
Area II
C
GST activity (U/mg protein)
0,3
0,2
0,2
0,1
0,1
0,0
a
b
Area I
Area II
D
GST activity (U/mg protein)
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Area I
Area II
E
TBARS levels (M/mg protein)
2,5. 10-7
2. 10-7
1,5. 10-7
1. 10-7
1,5. 10-8
0
Area I
Area II
F
TBARS levels (M/mg protein)
5. 10-7
4.5 10-7
4. 10-7
3.5 10-7
3. 10-7
2.5 10-7
2. 10-7
1.5 10-7
1. 10-7
0 10-8
Area I
Area II
G
AChE activity (nmol/min/mg protein)
60
50
40
30
20
10
0
Area I
Area II

Fig 2. – Atividade dos marcadores de estresse oxidativo e da enzima acetilcolinesterase nos em *Sciades herszbergii* de área I e área II. A - Atividade da Catalase nas brânquias; B – Atividade da Catalase no fígado; C - Atividade de GST nas brânquias; D – Atividade da GST no fígado; E – Peroxidação Lipídica (LPO) nas brânquias; F - Peroxidação Lipídica (LPO) no fígado. e G - Atividade de Acetilcolinesterase no cérebro**.** Valores expressos em médias e a e b mostram valores estatisticamente diferentes.

Análise de Metais

No sedimento

Foram verificadas diferenças significativas na concentração de metais entre as duas áreas ($p<0,05$) para o alumínio, ferro, níquel, cobre, cádmio (Tabela 1). Onde as maiores concentrações desses metais foram determinadas na área II.

Tabela 3 – Análise da concentração média (mg/kg) de metais no sedimento em duas áreas do estuário amazônico.

Amostra/metais	**Al** mg/L	**Fe** mg/L	**Ni** mg/L	**Cu** mg/L	**Cd** mg/L	**Hg** mg/L
Área I	0,6618* (±0,14)	0,5958* (±0,06)	0,000312* (±0,00)	0,000278* (±0,00)	0,00001* (±0,00)	0,00002* (±0,00)
Área II	46,6454* (±6,96)	26,521* (±3,95)	0,018* (±0,00)	0,015* (±0,00)	0,0003* (±0,00)	0,0003* (±0,00)

(*) indica diferenças entre as áreas (±) desvio padrão

Nos Tecidos: Branquial, Hepático e Nervoso

Ao analisarmos a concentração de metais nos três tipos de tecido (nervoso, hepático e muscular) foi verificado diferenças significativas na concentração de metais entre os tipos de tecidos e entre as áreas. Alumínio, ferro, níquel, cádmio e mercúrio tiveram maior concentração nos tecidos dos animais capturados na área II (tabela 2).

Tabela 4 – Média (±DP) da concentração (mg/kg) de metais em tecidos de *S. herzbergii* em duas áreas do estuário amazônico.

Metal	Área I (n=80)			Área II (n=80)		
	Cérebro	**Fígado**	**Músculo**	**Cérebro**	**Fígado**	**Músculo**
Alumínio	0,026 (±0,002)	0,031 (±0,013)	0,026 (±0,026)	0,027 (±0,003)	0,065 (±0,069)	0,111* (±0,032)
Ferro	0,152 (±0,132)	1,227 (±0,905)	0,036 (±0,006)	0,996 (±1,856)	0,707 (±0,818)	0,133* (±0143)
Níquel	NI	0,002 (±0,0009)	0,002 (±0,001)	0,065* (±0,015)	0,027* (±0,008)	0,017 (±0,024)
Cobre	NI	0,032 (0,015)	NI	0,014 (±0,026)	0,017* (±0,009)	0,014 (±0,005)
Cádmio	NI	NI	NI	0,00044 (±0,0001)	0,0012 (±0,0004)	0,0016* (±0,0006)
Mercúrio	NI	NI	NI	NI	8,98 (±2,66)	8,88 (±2,21)

*indica diferenças entre as áreas; (±) desvio padrão; NI – Não identificado

ANVISA-Valores máximos de metais no sedimento: Hg (0,002 mg/L; Al (0,2 mg/L); Fe (5,0 mg/L); Ni (0,025 mg/L) ; Cu (0,013 mg/L) e Cd (0,01 mg/L)

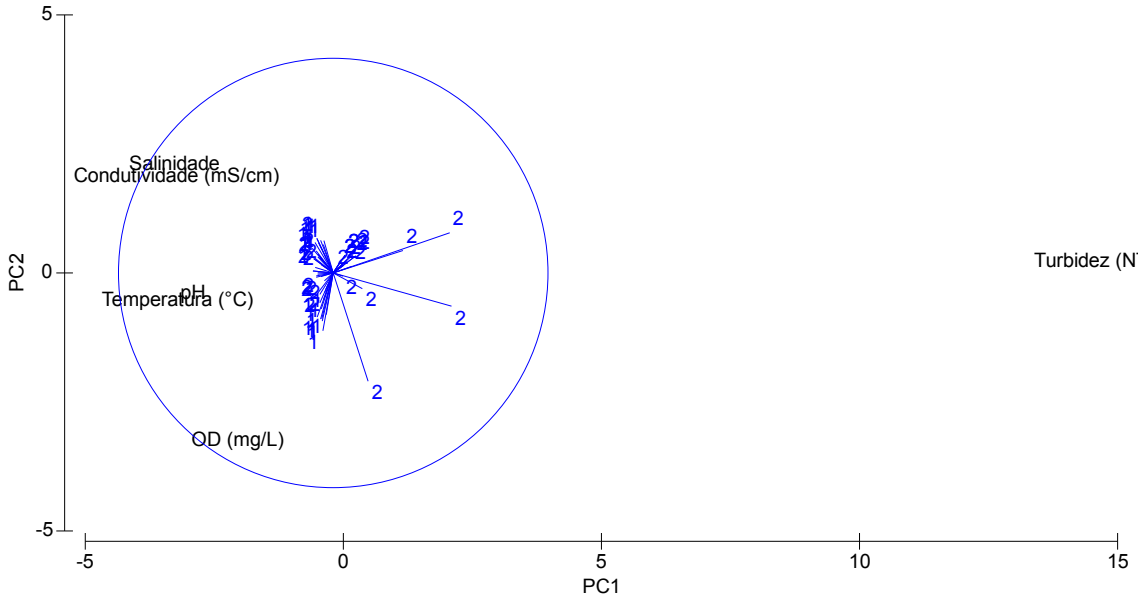

Fig. 3 – Análise de PCA. Área I e II e fatores abióticos

A análise de componentes principais (PCA) revelou que o fator abiótico com variação mais significativa foi a turbidez na área II.

Discussão

As águas de ecossistemas estuarinos amazônicos são fortemente influenciadas pela sazonalidade regional. Essa sazonalidade é regida pela presença ou o afastamento da Zona de Convergência Intertropical que regula as chuvas e os ventos na região Norte brasileira. Além da sazonalidade temos o regime de macromarés. As grandes descargas fluviais, principalmente durante o período chuvoso, fornecem elevada quantidade de sedimentos, nutrientes dissolvidos e material orgânico para os ecossistemas aquáticos locais (Pardal et al., 2011.; Rosa Filho et al., 2018). A área I se apresentou dentro do padrão esperado para estuários amazônicos, porém, a área II sofreu influencia da atividade portuária e da drenagem do canal principal da baía que elevou a turbidez durante o período seco. A atuação de ventos com maior intensidade neste período promoveu uma maior oxigenação das águas. Esse processo favoreceu a precipitação do ferro férrico em hidróxido de ferro. Desse modo, o sedimento da área II funcionou como uma depósito de ferro.

A área I, mais protegida pelo manguezal da ação dos ventos, possui águas mais ricas em matéria orgânica particulada e dissolvida e, muitas vezes, pode ocorrer situações anaeróbicas. Nesse caso, ocorre a liberação do ferro ferroso, que estava precipitado no sedimento para coluna d'água. Desse modo, o sedimento da área I funcionou como uma fonte de ferro à coluna d'água. Além disso, a ressuspensão dos sedimentos através das mudanças hidrogeoquímicas associadas às variações de maré pode conduzir à remobilização dos metais para a coluna de água (Maranho et al. 2010, Borges et al., 2018). Em consequência, há maior biodisponibilidade de metais e bioacumulação na cadeia trófica, em especial nos peixes (Jesus et al., 2004; Beladel et al., 2012; Marx and Kamber, 2014).

A alimentação do *S. herzbergii* é rica em crustáceos e peixes. Os caranguejos e camarões possuem a hemocianina que utiliza o cobre no transporte de oxigênio na sua molécula e os peixes possuem a hemoglobina com ferro na sua molécula que auxilia no transporte de oxigênio no sangue desses organismos. Isso pode explicar as concentrações de ferro e cobre nos tecidos hepáticos de *S. herzbergii* da área I forem superiores aos da área II, provavelmente uma maior diversidade alimentar, por não apresentar atividades antrópicas como atividade portuária, apesar das concentrações nos sedimentos desses metais serem superiores na área 2.

As duas áreas apresentaram metais traço (alumínio, ferro, níquel, cobre, cádmio e mercúrio) no sedimento, mas a área II as concentrações foram maiores, devido ao complexo portuário de São Luís - MA e o transporte de minério de Ferro. O sedimento é um dos destinos finais dos metais e ele pode sofrer a ação de fatores abióticos (pH, turbidez e condutividade) e em estuários amazônicos a combinação desses fatores pode influenciar a especiação desses metais, aumentando assim a biodisponibilidade na água e possibilitando assim a bioacumulação e transferência para a cadeia trófica (Jesus et al., 2004; Beladel et al., 2012). O que foi verificada pela concentrações cádmio e mercúrio nos animais da área II.

Há relatos que os organismos aquáticos desenvolveram defesas para regular o nível de espécies reativas de oxigênio (EROS), que podem ser geradas como consequência à exposição de metais (Ognjanovic et al., 2008; Olivari et al., 2008; Matos et al., 2013). Tal contaminação por espécies metálicas pode alterar os mecanismos fisiológicos e bioquímicos dos peixes (Wang et al., 2009), ao fomentar o stress oxidativo (Cornejo-Garrido et al., 2011) e ao comprometer a eficácia das defesas antioxidantes, como evidenciado em *Anguilla anguilla* por Nunes et al. (2014a).

No presente estudo verificamos que a maior atividade da enzima CAT foi observada no fígado e nas brânquias dos animais capturados na área II. Verificamos também que esses animais apresentaram maior concentração de espécies metálicas no músculo. Sugerimos que esses compostos ou o seu metabolismo resultaram em efeitos pro-oxidativos que ativou a via metabólica desta enzima em particular. Resultados similares foram observados em *Channa punctatus* exposto aos efluentes de usinas termoelétricas contaminadas por metais (Javed et al. 2016). O papel pro-oxidativo de misturas complexas de metais, cujos efeitos deletérios são contrários pela ativação da enzima CAT.

O metabolismo da glutationa (GSH na sua forma reduzida) é um dos mecanismos mais importantes na proteção celular contra os danos decorrentes dos stress oxidativo. A GSH é um poderoso *scavenger* de radicais livres e atua de modo a eliminar compostos electrofílicos que de outra forma poderiam ser lesivos (Hayes et al., 1999). As GSTs catalisam a conjugação da glutationa reduzida (GSH) e consequentemente podem fomentar a excreção destes compostos eletrólitos, mas também é uma ferramenta antioxidante. Verificamos que os animais da área II apresentaram maior atividade enzimática média quando comparados aos animais da área I. Assim, organismos expostos a contaminantes na área II foram favorecidos pela eficácia do processo de detoxificação, visto que possuem alta atividade de GSTs. Resultados similares foram amplamente reportados na literatura, como o caso do chumbo (*A. anguilla* e *G.*

holbrooki; Nunes et al., 2014a; 2015a; *Pimephales promelas*; Mager et al., 2008; *Scophtalmus maximus*; Nunes et al., 2014b), cobre (*G. holbrooki*; Nunes et al., 2015b; *Pomatoschistus microps*; Vieira et al., 2009; *Gasterosteus aculeatus*; Sanchez et al., 2005; *Clarias gariepinus*; Hoyle et al., 2007; *A. anguilla*; Ahmad et al., 2005), cádmio (*Oncorhynchus kisutch*; Espinoza et al., 2012; *A. anguilla*; Nunes et al., 2014a), zinco (*A. anguilla*; Nunes et al., 2014a). Pode-se sugerir que o metabolismo dos metais eventualmente absorvidos a partir do meio, principalmente em *S. herzbergii* da área II, requerer a ativação da conjugação com a glutationa como forma preferencial de excreção. Por outro lado, e considerando simultaneamente os dados da enzima CAT, é possível sugerir também que o aumento da atividade das isoenzimas GSTs dos animais capturados na área II pode significar um esforço antioxidante a fim de combater o excesso de ROS que deriva da presença de concentrações superiores de metais.

Relativamente à peroxidação lipídica (LPO) não houve diferença significativa entre animais capturados nas duas áreas de estudo. A ocorrência de peroxidação lipídica ou dano peroxidativo por exposição aos compostos metálicos foi amplamente estudada, verificado em em *Clarias gariepinus* quando exposto ao chumbo (Farombi et al. 2007); em *Clarias batrachus* (Maiti et al. (2010) e nas brânquias de *Scophtalmus maximus* (Nunes et al. 2014b); ou após exposição ao cádmio em *Rhamdia quelen* (Pretto et al., 2010), em *Channa punctatus* (Dabas et al. 2012) e em *G. holbrooki* (Nunes et al. (2015b). Dada a inexistência de diferenças entre organismos capturados nas duas áreas em estudo, possivelmente as atividades de CAT e GTS podem ter sido suficientemente eficazes para prevenir a ocorrência de danos oxidativos nos lípidos de membranas.

Ao observar cérebro de *S. herzbergii* provenientes das áreas I/II não houve diferenças estatisticamente significantes da atividade das colinesterases. Apesar de serem considerados inibidores diretos potenciais das colinesterases (Guilhermino et al., 1998), alguns metais podem não exercer totalmente este efeito (Nunes, 2011), pelo que a utilização da inibição colinesterásica como critério toxicológico requer uma avaliação cuidadosa. O estudo conduzido por Elumalai et al. (2007) demonstrou a ocorrência de uma significativa inibição colinesterásica no caranguejo estuarino *Carcinus maenas* após exposição ao metal zinco. No entanto, a exposição de *A. anguilla* ao chumbo, cobre, cadmio e zinco não resultou em quaisquer efeitos anticolinesterásico significante (Nunes et al., 2014a). A ausência de efeitos anticolinesterásicos por parte de alguns metais, como urânio, foi observado em peixes, como o *Carassius auratus* (Nunes et al., 2018); em *G. holbrooki* expostos ao zinco, chumbo e cadmio (Brandão et al., 2013). Assim, evidencia-se que o padrão de resposta em termos da relação das

enzimas colinesterases quando expostas aos metais nem sempre foi coincidente; para além de inerentemente dependente da quantidade de metal que foi absorvida.

No entanto, os dados aqui obtidos apesar de sugerirem a ocorrência de uma evidente resposta antioxidante, com alterações nas atividades das enzimas antioxidantes CAT e GST não implicam na ocorrência de dano oxidativo, considerando que não houve aumento das concentrações de malondialdeído. Assim, pode sugerir-se que os compostos metálicos presentes na água não foram absorvidos em quantidade suficiente para causar efeito anticolinesterásico direto e que o efeito prooxidativo do seu metabolismo não foi suficiente para causar desnaturação proteica e o comprometimento da função colinesterásica em exemplares de *Sciades herzbergii* capturados nas áreas de estudo.

Conclusão

Concluímos que a alta concentração de metais no sedimento e nos peixes coletados na área II (com histórico de contaminação), aliados a alta ou inatividade enzimática das enzimas de estresse oxidativo mensurados nos espécimes da mesma área, refletem o risco que a biota aquática sofre diante da atividades antrópicas. Mesmo que a alta atividade das enzimas de estresse oxidativo reflita em uma tentativa do peixe de se proteger e de se adaptar a habitats contaminados. Com essas análises podemos considerar *S. herszbergii* como um eficiente biomonitor da qualidade ambiental da água.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro foi fornecido pela REDE VALE / FAPESPA ICAAF nº 02/2012. Agradecemos ao Programa de Treinamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e a Universidade de Aveiro – PT Prof. Dr. Bruno Nunes pelo processamento das amostras. Este trabalho foi também apoiado pelos Fundos Europeus através do COMPETE e pelos Fundos Nacionais através da Fundação Portuguesa de Ciência (FCT) nos projetos PEst-C / MAR / LA0017 / 2013 e PEst-C / MAR / LA0015 / 2013.

Referências

Abadi DRV, Dobaradaran S, Nabipour I, Lamani X, Ravanipour M. Comparative investigation of heavy metal, trace, and macro element contents in commercially valuable fish species harvested off from the Persian Gulf. Environ. Sci. Pollut. Res., 2014.

Ahmad I, Oliveira M, Pacheco M, Santos MA (2005). *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without β-naphthoflavone pre-exposure. Chemosphere 61(2): 267–275

Alsop, D., Lall, S.P., Wood, C.M. Reproductive Impacts and physiological adaptations of zebra fsh to elevated dietary nickel. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol., 165: 67-75. 2014.

Ashraf W., Seddigi, Z., Abulkibash, A., Khalid M. Levels of selected metals in canned fish consumed in Kingdom of Saudi Arabia. Environ. Monit. Assess. v. 117, p271–279. 2006.

Bauvais C, Zirah S, Piette L, Chaspoul F, Coulon ID. Sponging up metals: Bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. Mar. Environ. Res, 104: 20-30. 2015.

Beladel, B., Nedjimi, B., Mansouri, A., Benamar, M. E. A. Trace elements determination in Algerian wheat by instrumental neutron activation analysis (INAA). J. Radioanal. Nucl. Ch. 2012.

Bertin G, Averbeck D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Biochimie 88:1549-1559. 2006.

Beutler, E. Red cell metabolism: A manual of biochemical a methods. Grune & Stron, New York, 1975.

Bourret, V., Couture P, Campbell PGC, Bernatchez L. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (Perca flavescens) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. Aquat. Toxicol. 86, 76–90. 2008.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v.72, p.248-254, 1976.

Brandão F, Correia AT, Gonçalves F, Nunes B (2013). Effects of anthropogenic metallic contamination on cholinesterases of *Gambusia holbrooki*. Marine Pollution Bulletin 76(1–2): 72–76. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.09.029

Borges AV, Darchambeau F, Teodoru CR, Marwick TR, Tamooh F, Geeraert N, Omengo FO, Guérin F, Lambert T, Morana C, Okuku E. Seasonal and inter-annual variations in carbon fluxes in a tropical river system (Tana River, Kenya). Aquatic Sciences, , 80:19, 2018.

Carvalho-Neta, R.N.F.; Torres JR., A.R.; Abreu-Silva, A.L. Biomarkers in Catfish *Sciades herzbergii* (Teleostei: Ariidae) from Polluted and Non-polluted Areas (São Marcos' Bay, Northeastern Brazil). Appl. Bioch. Biot*.,* v.166, p.1-12, 2012.

Carvalho-Neta, R. N. F., Sousa, D. B. P., Almeida, Z. S., Santos, D. M. S., Tchaicka, L. A histopathological and biometric comparison between catfish (Pisces, Ariidae) from a harbor and a protected area, Brazil. Aquatic Biosystems, 10, 12. 2014.

Chen, Y.Y., Zhu, J.Y., Chan, K.M. Effects of cadmium on cell proliferation, apoptosis, and proto-oncogene expression in zebrafish liver cells. Aquat. Toxicol. 157, 196–206. 2014.

Costa, S.C.C, Hartz, S M. Evaluation of trace metals (cadmium, chromium, copper and zinc) in tissues of a commercially important fsh (*Leporinus obtusidens*) from Guaíba lake, southern Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology, 52: 241-250.2009.

Dabas A, Nagpure NS, Kumar R, Kushwaha B, Kumar P, Lakra WS (2012). Assessment of tissue-specific effect of cadmium on antioxidant defense system and lipid peroxidation in freshwater murrel, Channa punctatus. Fish Physiology and Biochemistry 38(2):469-82.

Dhanakumar S, Solaraj G Mohanraj R. Heavy metal partitioning in sediments and bioaccumulation in commercial fish species of three major reservoirs of river Cauvery delta region, India. Ecotoxicol. Environ. Saf. 113: 145-151. 2015.

Ellman, G.C. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology**,** v.21, n.19, p.88-95, 1961.

Espinoza HM, Williams CR, Gallagher EP (2012). Effect of cadmium on glutathione S-transferase and metallothionein gene expression in coho salmon liver, gill and olfactory tissues. Aquatic Toxicology 110-111:37-44.

Elumalai M, Antunes C, Guilhermino L (2007). Enzymatic biomarkers in the crab Carcinus maenas from the Minho River estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury. Chemosphere 66(7): 1249–1255.

Farombi EO, Adelowo OA, Ajimoko YR (2007). Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. International Journal of Environmental Research and Public Health 4(2):158-65.

Giltrap M, Ronan J, Bignell JP, Lyons BP, Collins E, Rochford H, McHugh B, McGovern E, Bull L,Wilson J. Integration of biological effects, fish histopathology and contaminant measurements for the assessment of fish health: A pilot application in Irish marine Waters. Marine Environmental Research, 129, 113-132. 2017.

Giovannini, M. G.; Lana, D.; Pepeu, G. The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory. Neurobiology of learning and memory, v. 119, p. 18-33, 2015.

George, S.G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic conjugating enzymes in fish. In: Mallins D.C., Ostrander G.K. Aquatic Toxicol.: molecular, biochemical and cellular perspectives. London, p. 37–85. 1994.

Gorayeb, A, Lombardo, M.A, Pereira, L.C.C. Environmental Conditions in Urban Area of the Caeté River Hydrographic Basin – Oriental Brazilian Amazon. Revista da Gestão Costeira Integrada 2:59-70. 2008.

Guardiola,F.A., Cuesta, A., Meseguera, J., Martínez, S., Martínez-Sánchez, M.J., Pérez-Sirvent, C., Esteban, M.A. Accumulation, histopathology and immunotoxicological effects of waterborne cadmium on gilthead seabream (Sparus aurata). Fish & Shellfish Immunology Vol. 35, Issue 3, 792-800, 2013.

Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M. C., Soares, A. M. V. M., 1998. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? Biomarkers 3(2), 157-163. https://doi.org/10.1080/135475098231318

Habig, WH, Jakoby, W.B. Assays for diferentiation of glutathione S-transferases. Methods Med. Res. 77, 398-405. 1981.

Hayes, J. D., & McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. In Free Radical Research. https://doi.org/10.1080/10715769900300851

Hoyle I, Shaw BJ, Handy RD (2007). Dietary copper exposure in the African walking catfish, Clarias gariepinus: Transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. Aquatic Toxicology 83(1): 62–72.

Ivanina AV, Habinck E, Sokolova I M. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, Crassostrea virginica Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part C 148:72-79. 2008.

Isaac V.J and Espirito-Santo. Small-scale fshing landings in the municipality of Bragança – PA, Brazil: effort and production. Boletim do Laboratório de Hidrobiologia, 25(1):31-48. 2012.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Chemistry And Human Health Division Clinical Chemistry. Heavy metals - a meaningless term? Pure and Applied Chemistry. v. 74, n. 5, p. 793–807. IUPAC Technical Report. 2002.

Jardim, W.F.; Medição e interpretação de valores do potencial redox (EH) em matrizes ambientais. Química Nova, v. 37, n. 7, p. 1233-1235, 2014.

Javed, M, Ahmad, I, Usmani, N. Ahmad, M. Bioaccumulation, oxidative stress and genotoxicity in fsh (Channa punctatus) exposed to a thermal power plant efuent. Ecotoxicol. Environ. Saf. 127, 163–169. 2016.

Jesus, H.C., Costa. E. A., Mendonça, A. S. F., Zandonade, E. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória-ES. Quim. Nova, v. 27, p. 378-386. 2004.

Kennedy CJ. The toxicology of metals in fishes. Academic Press, San Diego, California, USA. 2011.

Kim, I., Lee, B.-T., Kim, H.-A., Kim, K.-W., Kim, S.D., Hwang, Y.-S. Citrate coated silver nanoparticles change heavy metal toxicities and bioaccumulation of Daphnia magna. Chemosphere. 143,99-105. 2015.

Kumar, G., Degheidy, H., Casey, B.J., Goering, P.L. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. Food Chem. Toxicol. 85, 45–51. 2015.

Kunita, N.M.1; Oliveira, C.A.L.1*; Oliveira, S.N.1; Yoshida, G.M.1; Rizzato, G.S.1;
Resende, E.K.2 e Ribeiro, R.P.1. Genetic evaluation for body traits in farmed nile tilapias. Arch. Zootec. 62 (240): 555-566. 2013.

Krug, R. de R.; Krug, H.N. As gratificações e frustrações da docência em educação Física escolar para os acadêmicos do CEFD/UFSM em situação de estágio. Revista Digital Lecturas: Educación Física y Deportes. Buenos Aires, a.13, n.125, p.1-10, 2008.

Mager EM, Wintz H, Vulpe CD, Brix KV, Grosell M (2008). Toxicogenomics of water chemistry influence on chronic lead exposure to the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquatic Toxicology 87(3): 200–209.

Maiti AK, Saha NC, Paul G (2010). Effect of lead on oxidative stress, Na+K+ATPase activity and mitochondrial electron transport chain activity of the brain of Clarias batrachus L. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 84(6):672-6.

Maranho, L.A, Abreu, IM, Santelli, RE, Cordeiro, RC, Soaresgomes, A, Moreira, LB, Morais, RD, Abessa, D.M.S. Acute and chronic toxicity of sediment samples from Guanabara Bay (RJ) during the rainy period. Brazilian Journal of Oceanography, v. 58 (special issue IV SBO), p. 77-85. 2010.

Marengoni, M.G., klosowski, E.S., Oliveira, K.P., Chambo, A.P.S., Gonçalves, A.C.Jr.. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do reservatório da usina hidrelétrica de itaipu binacional. quim. nova, vol. 36, no. 3, 359-363, 2013.

Marx SK., Kamber, B.S.Trace-element systematics of sediments in the Murray–Darling Basin, Australia: Sediment provenance and palaeoclimate implications of fine scale chemical heterogeneity. Appl. Geochem, v. 25, p. 1221 - 1237. 2014.

Matos RC, Bessa M, Oliveira H, Gonçalves F, Pereira ML, Nunes B (2013). Mechanisms of kidney toxicity for chromium- and arsenic-based preservatives: potential involvement of a pro-oxidative pathway. Environmental Toxicology and Pharmacology 36(3): 929-936. DOI: 10.1016/j.etap.2013.08.006

Miola, B., Morais, J.O., Pinheiro, L. S .Trace metal concentrations in tropical mangrove sediments, NE Brazil. Marine Pollution Bulletin Vol 102, Issue 1, 206-209. 2016.

Moiseenko, TI, Kudryavtsea, L.P. Trace metal accumulation and fish pathologies in areas affected by mining and metallurgical enterprises in the Kola region, Russia. Environmental Pollution, 114: 285-297. 2011.

Monferrán, M.V., Garnero, P., Bistoni, M.A., Anbar, A.A., Gordon, G.W. and Wunderlin, D.A. From water to edible fish. Transfer of metals and metalloids in the San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina). Implications associated with fish consumption. Ecological Indicators, 63: 48–60. 2016.

Montes, C.S.; Ferreira, M.A.P.; Santos, S.S.D. *et al*. Branchial histopathological study of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) in the Guajará bay, Belém, Pará State, Brazil. *Act. Scient. Biolog. Sci.*, v.32, p.93-99, 2010.

Nunes B (2011). The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 212: 29-59. DOI: 10.1007/978-1-4419-8453-1_2

Nunes B, Capela RC, Rodrigues S, Caldeira C, Gonçalves F, Correia AT (2014a). Chronic effects of lead, copper, zinc, and cadmium on biomarkers of the European eel, *Anguilla anguilla*. Environmental Science and Pollution Research 21(8):5689-700. DOI: 10.1007/s11356-013-2485-0

Nunes B, Brandão F, Sérgio T, Rodrigues S, Gonçalves F, Correia AT (2014b). Effects of environmentally relevant concentrations of metallic compounds on the flatfish *Scophtalmus maximus*: biomarkers of neurotoxicity, oxidative stress, and metabolism Environmental Science and Pollution Research 21(12): 7501-7511. DOI: 10.1007/s11356-014-2630-4

Nunes B, Caldeira C, Pereira J, Gonçalves F, Correia AT (2015a). Chronic effects of realistic concentrations of non-essential and essential metals (lead and zinc) on oxidative stress biomarkers of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 69(4):586-95. doi: 10.1007/s00244-015-0190-3.

Nunes B, Caldeira C, Pereira JL, Gonçalves F, Correia AT (2015b). Perturbations in ROS-related processes of the fish *Gambusia holbrooki* after acute and chronic exposures to the metals copper and cadmium. Environmental Science and Pollution Research 22(5):3756-65. DOI: 10.1007/s11356-014-3580-6

Ognjanovic BI, Dorordevic NZ, Perendndija BR, Despotootovic SG, Žikic RV, Štajn AS, Saicic ZS 2008. Concentration of Antioxidant Compounds and Lipid Peroxidation in the Liver and White Muscle of Hake (*Merluccius merluccius* L.) in the Adriatic Sea. Archives of Biological Sciences. 60, 601-607.

Olivari FA, Hernández PP, Allende ML (2008). Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. Brain Research 1244: 1-12.

Pardal, E.C.; Pereira, L.C.C.; Guimarães, D.O.; Oliveira, S.M.O.; Trindade, W.N.; Costa, R.M. Influence of oceanographic conditions on the spatial and temporal distribution of chlorophyll-a in the coastal waters of the Brazilian Amazon region (São Luís-MA). J. Coastal. Res., SI64, p. 421-424, 2011.

Paixão J.F., de Oliveira OM, Dominguez J.M., Coelho A.C., Garcia K.S., Carvalho G.C., Magalhães W.F. Relationship of metal content and bioavailability with benthic macrofauna in Camamu Bay (Bahia, Brazil). Mar Pollt Bull 60(3):474-81. 2009.

Palermo, F.F., Risso, W.E, Simonato, J.D., Martinez, C.B.R. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neo tropical fsh Prochilodus lineatus. Ecotoxicol. Environ. Safe. 116: 19-28. 2015.

Pretto A, Loro VL, Morsch VM, Moraes BS, Menezes C, Clasen B, Hoehne L, Dressler V (2010). Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (Rhamdia quelen) exposed to cadmium. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 58(4): 1008-14

Pyle, J. M.; Spear, F. S.; Wark, D. A.; Daniel, C. G.; Storm, L. C.. Contributions to precision and accuracy of monazite microprobe ages. American Mineralogist, v. 90, p. 547-577, 2005.

Pyle, G, Couture, P, Farrell, AP, Wood, CM, Brauner, CJ. Nickel. In: Fish physiology 31 A: Homeostasis and toxicology of essential metals. Elsevier, London, pp. 253-289. 2012.

S. K. Richetti, D. B. Rosemberg, J. Ventura-Lima, J. M. Monserrat, M. R. Bogo e C. D. Bonan. “Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain

is altered by heavy metal exposure". Em: *NeuroToxicology* 32.1, 116–122. 2010.

Rosa Filho, J. S. PEREIRA L. C. C., Monteiro. M. C.; Aviz. D., Braga, C. F.; Costa, R. A. M.; Asp, N. E.; Beasley, C. R.; (Ben thic Estuarine Assemblages of the Brazilian North Coast (Amazonia Ecoregion). In: Lana P., Bernardino A. (eds) Brazilian Estuaries. Brazilian Marine Biodiversity. Springer, Cham, pp 39-74, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319

Santos, R.M.B., Sanches Fernandes, L.F., Pereira, M.G., Cortes, R.M.V., Pacheco, F.A.L. Water resources planning for a river basin with recurrent wildfires. Sci. Total Environ. 526, 1–13. 2015.

Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Porcher JM, Aït-Aïssa S (2005). Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels.Environ Toxicol Pharmacol. 19(1): 177-83.

Salomão, M. S. M. B; Molisani, M. M.; Ovalle, A. R. C.; Rezende, C. E.; Lacerda, L. D.; Carvalho, C. E. V. Hydrol. Proces. *15*, 587.2001.

Sfakianakis DG, Renieri E, Kentouri M, Tsatsakis AM. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. Enviro. Res. 137: 246-255. 2015.

Sharma DK, Ansari BA. Effects of deltamethrin on CAT, LPO and GSH in Tissues of zebrafish *Danio rerio***.** Res. J. of Environ. Toxicol. 7 (1): 38-46. 2013.

Srikanth, K, Pereira, E, Duarte, A. C., Ahmad, I. Glutathione and its dependent enzymes" modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish - a review. Environmental Science and Pollution Research 20:2133–2149. 2013.

Tapia, J, Vargas-Chacoff, L, Bertran, C, Pena-Cortes, F, Hauenstein, E, Schlatter, R, Jimenez, C, Tapia, C. Heavy metals in the liver and muscle of Micropogonias manni fsh from Budi

Lake, Araucania Region, Chile: Potential risk for humans. Environ. Monit. Assess., 184: 3141-3151. 2012.

Trindade, W. N., Pereira, L. C. C., Guimarães, D. O., Silva, I. R., Costa, R. M. The effects of sewage discharge on the water quality of the beaches of São Luis (Maranhão, Brazil). Journal of Coastal Research. 64, 1425-1429. 2011.

Uluturhan, E., Kucuksezgin, F. Heavy metal contaminants in Red Pandora (Pagellus erythrinus) tissues from the eastern Aegean Sea, Turkey. Water Res. 41, 1185–1192, 2007.

Valle Junior, R. F.; Varandas, S. G. P.; Fernandes, L. S.; Pacheco, F. A. L. Multi criteria analysis for the monitoring of aquifer vulnerability: a scientific tool in environmental policy. Environmental Science & Policy, v. 48, p. 250-264, 2015.

Vieira LR, Gravato C, Soares AMVM, Morgado F, Guilhermino L (2009). Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. Chemosphere 76(10): 1416–1427.

Wang N, Nkejabega N, Hien NN, Huynh TT, Silvestre F, Phuong NT, Danyi S, Widart J, Douny C, Scippo ML, Kestemont P, Huong DT (2009). Adverse effects of enrofloxacin when associated with environmental stress in Tra catfish *(Pangasianodon hypophthalmus*). Chemosphere. 77, 1577-1584.

Zanette J, Nunes FF, Medeiros ID, Siebert MN, Mattos JJ, Lüchmann KH, Melo CMR & Bainy ACD. Comparison of the antioxidant defense system in Crassostrea rhizophorae and Crassostrea gigas exposed to domestic sewage discharges. Marine Environmental Researc 66:196-198, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (GERAL)

Após a obtenção e análise dos resultados podemos afirmar que os biomarcadores histológicos, imunohistoquímico, bioquímicos e análise de metais realizadas nesse estudo evidenciam claramente os efeitos deletérios ocasionados na biota aquática quando expostas a uma concentração de metais. Embora não letal, mas extremamente prejudicial a homeostase do animal, o que pode culminar com o aumento da susceptibilidade a doenças e podendo levar a morte do animal. *S. herszbergii* se mostrou um eficiente biomonitor da qualidade de água, pois é capaz de acumular metais e ser responsivo ao estresse oxidativo, refletindo assim uma provável adaptação a vida em habitats contaminados. Baseados nessas análises, podemos considerar que a espécie é um eficiente biomonitor da qualidade ambiental da água.