



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

Marcionília Fernandes Pimentel

**BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA EM
BAIACUS (*Sphoeroides testudineus*) COLETADOS NO
ESTUÁRIO DO RIO PACOTI-CE.**

FORTALEZA

2013

Marcionília Fernandes Pimentel

BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA EM
BAIACUS (*Sphoeroides testudineus*) COLETADOS NO
ESTUÁRIO DO RIO PACOTI-CE.

Tese apresentada ao Curso de Ciências Marinhas
Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, da
Universidade Federal do Ceará, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciências Marinhas Tropicais.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Leticia Veras Costa-Lotufo

Fortaleza - Ceará
2013

Marcionília Fernandes Pimentel

BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA EM BAIACUS (*Spherooides testudineus*) COLETADOS NO ESTUÁRIO DO RIO PACOTI-CE.

Tese apresentada ao Curso de Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais.

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dra. Sandra Tédde Santaella
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Denis Moledo Abessa
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira
Universidade Federal de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Sendo a vida danada como ela é, durante estes quatro anos de doutorado muita coisa me aconteceu. Perdas e ganhos (ainda bem!) tanto no âmbito pessoal quanto profissional e algumas dificuldades se interpuseram no caminho fazendo com que eu por vezes duvidasse que esta tese estaria pronta hoje. E se ela o está, não devo me apropriar dos méritos, pois aqui tem o dedo de muita gente que participou de maneira efetiva nesta construção e que não podem ser, de forma alguma, esquecidas.

Pra começar, devo dizer que NADA disso seria possível sem uma **Leticia Lotufo** do meu lado. Aliás, penso eu que o mundo seria um lugar muito melhor de se viver se cada um tivesse a sua. Como esse milagre ainda não é possível, só posso me considerar sortuda e afortunada por vir conseguindo manter a minha durante lindos 9 anos. Munida de uma fonte interior que aparentemente não se esgota ela sempre está pronta pra me trazer a sua paz, estímulo, instigação, alegria, confiança, sabedoria, exemplo, iniciativa, carinho e coragem. Ela não só é minha orientadora como é parte do que eu sou agora. E tenho muito orgulho disso.

Ao **Laboratório de Ecotoxicologia Marinha** que por tantos anos foi a minha segunda casa, lugar que magnetiza a alegria. Agradeço a todos que passaram (ou que ainda estão) e deixaram sua marca na minha vida e no meu trabalho de alguma forma. Não vou citar o nome de todos mas cada um sabe do meu carinho, do bem que me fazem, da alegria que eu sinto em estar perto compartilhando conhecimento, trabalho, o alimento e gargalhadas sem fim. Sou profundamente grata por cada pequena coisa, porque nada que passamos juntos foi em vão e eu realmente posso dizer que AMO esse pessoal.

Especificamente com relação a este trabalho, não posso deixar agradecer de forma direta à **Évila Damasceno**, a Boneca, por toda dedicação e carinho dispensados sempre com tanta leveza. Apesar de ter chegado novinha e aparentemente inexperiente, ela me ensina todos dias e vivemos em constante estado de troca, o qual considero como algo sagrado. Eu nunca vou esquecer dessa parceria que tanto me comove. Igualmente agradecida à **Lígia Maria**, **Lucas Buruaem** e **Paula Jimenez** que também doaram carinhosamente parte de seus tempos preciosos a este trabalho, me ensinando, acompanhando e auxiliando, em Fortaleza ou fora dela. É muito gratificante ser equipe.

Amadora como eu só, jamais teria conseguido ir no rio e coletar os peixes sem o auxílio da minha brigada da pescaria. Um muito obrigada ao meu querido amigo e guru ictiológico **Luiz Eduardo** pela sabedoria e carinho; ao **Roberto Kobayashi** pelas dicas e suporte sempre presente; ao **Tarso** e ao

querido **Nel** pelas tarrafadas certeiras; **Diego Wilke** e **Raquel Brito** pelas caronas, companhia e apoio logístico. Agradeço à **Carla Rezende** e **Carol Cerqueira** pela ajuda nos primeiros momentos ainda agoniados e desajeitados de dissecação; ao **Luiz Buda** e **Janaina Bernardo** pelos translados aquáticos do CEAC e ao **Breno Luiz** pela eterna água no balde.

Quem esteve por perto pôde testemunhar o quão árduo foi para mim migrar do sacrifício de artemias para o de peixes. Desde o primeiro ano da pesquisa até o seu término, o momento de sacrificar nunca se tornou "natural" como outrora imaginei que seria. Portanto, este parágrafo não é de agradecimento, trata-se de um pedido especial de perdão à Mãe Terra por todos os peixes que tiveram suas vidas interrompidas para a realização deste trabalho. Que fique aqui registrado o meu mais profundo respeito por todos os seres da natureza.

O sucesso na confecção e análise das lâminas histológicas (após diversos fracassos) foi possível por meio do apoio de: **Patrícia Marçal** (Laboratório de Oncologia Experimental); **Leonardo Peres**, **Robson Mendes** e meu grande amigo **Roberto Feitosa** (Laboratório de Embriologia e Histologia animal); **Graça Lima** e **Rodrigo Maggioni** (CEDECAM). Agradeço em especial, com o coração palpitando de bem querer ao querido **Filipe Araújo**, um grande presente que esse doutorado me deu. Ele me segurou a mão, me ajudou imensamente com toda sua sabedoria histológica e encheu meus dias de alegria com seus biscoitinhos e causos da Madalena. Gratidão maior do mundo.

O meu muito obrigada a todos que compõem a liga dos laboratórios amigos nos quais também pude contar com equipamentos, reagentes e boa acolhida: **EQUAL** e **LECA** (LABOMAR) e **NEPEA** (UNESP, São Vicente). Um abraço caloroso em todos, de um por um, por cada pequena coisa. (Especialmente à **Roberta Antonioli** pela hospitalidade). Falando em reagentes e amigos, aproveito o ensejo para agradecer também à **Daniele Dietrich** (Universidade Federal do Paraná) pelos plasmas e anticorpos gentilmente cedidos. Foi uma sorte ter esbarrado nessa moça doce e inteligente que sempre esteve presente (mesmo que não de corpo presente) com atenção e generosidade neste trabalho, tirando dúvidas sobre vitelogeninas enquanto eu ainda estava achando tudo muito nebuloso.

Estar disponível para participar de bancas, avaliar trabalhos e atuar em sua melhoria faz parte das atribuições dos docentes. Contudo, atender aos convites e exercer tais tarefas com todo o cuidado, humildade, leveza e simpatia depende das idiossincrasias de cada professor e não tem norma nem estatuto no mundo que garanta isso. Logo, agradeço de coração aos quatro membros da banca que aceitaram ao meu convite de pronto, com alegria e comprometimento. São eles:

Sandra Santaella, que pela quarta vez se dispôs a contribuir na minha formação acadêmica com toda a sua bagagem na qual tanto confio. E mais uma vez atendeu ao meu chamado com toda doçura mesmo estando de férias.

Rodrigo Maggioni, que adiou um pouco sua merecida viagem de férias para poder contribuir com este trabalho. Meu total agradecimento pela generosidade, com admiração, confiança e respeito pelo profissional com esse tipo de espírito.

Denis Abessa, meu professor e amigo. Somos capazes de rir de bobagens pela mesma quantidade de horas que podemos discutir Ecotox. Me encho de contentamento sabendo que, mais uma vez, posso contar com sua sapiência e com suas contribuições sempre pertinentes que melhoram muito a qualidade de nossos trabalhos. Isso sem falar na boa energia que sua presença traz.

Camilo Pereira, é uma grande satisfação e uma honra poder contar com a presença de um pesquisador que considero tão talentoso neste meu fechamento. Uma das pessoas mais amáveis e leves que já tive o prazer de conhecer. Que seja bem vindo e que eu possa responder à altura.

Aqui, um agradecimento especial ao **LABOMAR**. E quando eu digo LABOMAR, me refiro a todos que o compõe, pessoas que fazem meu dia-a-dia tão contente com corredores e escadas alegres, restaurante animado, laboratórios receptivos e estacionamento festivo. Obrigada aos funcionários que me foram gentis e que me auxiliaram de alguma forma, aos meninos da limpeza e aos porteiros. Ao **Programa de pós graduação em Ciências Marinhas Tropicais**, no qual aprendi bastante, agradeço aos professores dedicados e aos colegas queridos. Foram anos felizes com vocês ao meu lado.

Eu poderia ter feito esse doutorado sem um pingão de glamour, sem viagens, congressos, almoços honestos e sem um computador digno. Se isso não me aconteceu, foi graças à Fundação Cearense de Apoio à pesquisa (**FUNCAP**) e mais recentemente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) que me agraciaram com suas maravilhosas bolsas acumulando cifras nunca dantes vistas em minha conta bancária. Até cimento e tijolo eu comprei com a bolsa de doutorado, não há como não ser agradecida por isso.

Por todo o comprometimento e amabilidade empregados em nossa “jornada da alma”, agradeço à **Raquel Brasil** com a certeza de um trabalho bem feito.

Considero esta defesa de tese como o fechamento de toda uma caminhada acadêmica que vem se desenvolvendo ininterruptamente desde o ano 2000. E durante todo esse tempo teve alguém sempre me arrastando pra cima, que não me deixa desanimar nunca e incentiva com fervor todos os meus projetos. Meu agradecimento mais profundo à **Maria Alice**, aquela mãe que cuida com amor e que se encanta vendo gráficos e tabelas que não compreende, achando lindo só porque foi sua filha quem fez. Ao lado nas apresentações de dança, defesas acadêmicas, enfermidades ou festas. Meu coração é seu.

Ele nem chegou a me ver entrando na universidade, mas estaria orgulhosíssimo de ver doutora a filha a quem julgava "tão sabida". E eu não teria chegado onde cheguei sem os impulsos iniciais dele, o **Seu Pimentel**, a quem agradeço com ternura. Igualmente grata a todos os meus sete irmãos Pimentéis por estarem sempre tão presentes e atentos às minhas invenções, dando suporte, acalentos e pratos de comida: **Júlio, Mirza, Joe, Marcíria, Jos, Marynha e Júnior**. São meus tesouros. Sem esquecer a minha outra irmã com M, **Marcela Davanso**, sem palavras, por tudo.

Creio que precisei passar anos pisando no chão limpo de um apartamento para ter certeza de que prefiro pisar no mato. Devo parte de todo esse bem estar à fantástica **Comunidade do Sítio** que me acolheu de forma afável desde os primeiros momentos. Muito agradecida a todos pelos momentos prazerosos, pois viver junto deles enche a minha vida de alegria.

Por fim, entrego o coração se derramando em agradecimento ao meu amado **Lucas Brito**, que se empenha de forma árdua diariamente pela minha felicidade. Que me dá flores todos os dias quando eu abro as janelas da nossa casa. Ele se enquadra em quase todos os parágrafos acima, pois trabalhou bastante nos bastidores deste trabalho me levando para as coletas, entrando no rio com tarrafa pra pescar, buscando água, buscando eppendorfs congelados lá em Curitiba. Foi também comigo no fim de semana oxigenar os peixes de um por um quando o LABOMAR ficou sem energia e me acalentou quando eu chorei por perder o experimento inteiro. Jamais conseguirei expressar aqui o tamanho da minha admiração por esse companheiro que é tão sábio, agilizado e amoroso. Tomo a liberdade de falar também pelo nosso "pibe", pois tenho certeza de que ele vai se sentir muito aventureiro sendo filho desse verdadeiro artista da natureza. E mais uma vez eu digo: obrigada por dançar comigo todas as manhãs, por me abraçar forte e fazer meus dias mais felizes. Tê-lo ao meu lado é uma forma encantada de viver.

“Intoxicated with a sense of his own power,
mankind seems to be going farther and farther into more
experiments for the destruction of himself and his world”

Rachel Carson
(1907 – 1964)

Biomarcadores de contaminação aquática em baiacus (*Spherooides testudineus*) coletados no estuário do Rio Pacoti. Autora: Marcionília Fernandes Pimentel. Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Letícia Veras Costa-Lotufo. Tese submetida à Coordenação do Curso de Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Marinhas Tropicais.

RESUMO

Durante muitos anos as determinações químicas serviram como indicadores exclusivos e tradicionais de contaminação. Entretanto, nas últimas décadas os estudos ecotoxicológicos vêm contribuindo para a compreensão da degradação do ambiente e no estabelecimento de parâmetros de qualidade. Neste contexto, as análises de biomarcadores representam uma forma de na avaliação da qualidade do ambiente baseada em respostas de parâmetros de saúde dos organismos residentes. O peixe da espécie *Spherooides testudineus* pertencente à família Tetraodontidae foi escolhido como modelo biológico para este trabalho. No capítulo I, tem-se uma avaliação de algumas respostas do baiacu à exposição ao hormônio feminino estradiol (E2) em condições laboratoriais, visando à validação da espécie para estudos de desregulação endócrina e futuros monitoramentos ambientais em estuários tropicais. A biometria não foi um indicador bom dos efeitos de desreguladores endócrinos. Também não foram evidenciadas respostas no índice gonado-somático (IGS), índice hepato-somático (IHS) tampouco a alterações histológicas nas gônadas em nenhum peixe do controle, nem nos tratamentos. A análise do tecido hepático de *S. testudineus* revelou casos de vacuolização celular dos hepatócitos e áreas de necrose. A detecção de vitelogenina plasmática de *S. testudineus* por western blot revelou que a expressão desta proteína estava presente nas fêmeas analisadas, mas também em grande parte dos machos e juvenis inclusive do grupo controle, sugerindo fortemente a presença de contaminantes com potencial de desregulação endócrina no estuário do Rio Pacoti. Esses resultados motivaram a realização do capítulo II deste trabalho, que teve como objetivo uma avaliação da qualidade da foz do estuário do Rio Pacoti por meio da análise de biomarcadores associados aos mais diversos tipos de contaminação. Houve diferença acentuada na proporção sexual encontrada, sendo esta de 1 macho para cada 4,6 fêmeas. O peso total corpóreo apresentou grande variabilidade, com média de $45,07 \pm 32,48$ g, enquanto que o comprimento padrão foi, de certa forma, mais homogêneo (média de $11,34 \pm 2,57$ cm). O coeficiente de variação dos índices IGS e IHS foram de 82,50% e 54,37%, respectivamente. Todas as fêmeas coletadas apresentaram ovários contendo ovócitos pre-vitelogênicos na grande maioria pertencentes à fase II de maturação gonadal. Apenas 2 machos foram coletados e identificados por meio da histologia, além de 22 animais juvenis, cujas gônadas não encontravam-se diferenciadas. Na avaliação histopatológica das gônadas não foram detectadas lesões ou anormalidades em nenhum espécime coletado. As principais alterações encontradas nas lâminas de fígado foram vascularização intensa, núcleos picnóticos e áreas de necrose. Além de todas as fêmeas, foi detectada vitelogenina (VTG) no único macho maduro bem como em 14 juvenis. A análise dos biomarcadores enzimáticos revelou que, com exceção da glutathione-S-transferase (GST) a atividade no fígado foi sempre superior à brânquia. Há necessidade de estudos posteriores para análise das respostas enzimáticas em *S. testudineus* de diferentes pontos do Rio Pacoti ou mesmo outros corpos d'água para que essas respostas possam ser mais bem conhecidas e caracterizadas para monitoramentos ambientais futuros. O peixe *S. testudineus* mostrou ser um modelo adequado para avaliação da qualidade do ambiente em estudos de campo. Os dados aqui obtidos também sugerem que Rio Pacoti, um dos importantes recursos hídricos do estado do Ceará, já encontra-se contaminado, uma vez que foi observada grande quantidade de danos no fígado de peixes coletados e, também, por ter sido verificada a evidência de feminização.

Aquatic contamination biomarkers in puffer fish (*Sphoeroides testudineus*) collected at Pacoti river estuary. Author: Marcionilia Fernandes Pimentel. Supervisor: Prof. Dr. Leticia Veras Costa-Lotufo. PhD Thesis submitted to Marine Tropical Sciences program from the Marine Sciences Institute, Federal University of Ceara

ABSTRACT

For many years chemical data have served as the exclusive and more traditional indicators of contamination. However, in the last decades ecotoxicological studies have contributed in understanding environmental degradation and in the establishment of new environmental quality parameters. In such context, biomarkers analyses focus on the evaluation of environmental quality and responses to pollutants based on health parameter measurements of local organisms. The fish *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus, 1758) belongs to the family Tetraodontidae and was chosen as biological model for this study. In chapter I, the answer of *S. testudineus* submitted to the feminine hormone estradiol (E2) under laboratorial conditions is evaluated, aiming at the validation of this species for studies with endocrine disruption and monitoring of tropical estuary contamination. The biometry was not a good indicator of the effects of endocrine disruption, as no alterations were observed. There were no alterations of GSI and HIS in E2-treated groups as well. Histopathological analysis of gonadal tissues showed no alteration, while in the hepatic tissue, there were evidences of tissue damage, including vacuolization, picnosis and necrotic areas. Vitellogenin (VTG) detection in plasma of *S. testudineus* using western blot demonstrated that a positive band was observed in the females, but also in most males and juveniles including those from the control group. These data strongly suggested the presence of endocrine disruptors in the estuary of Pacoti river and prompted us to chapter II of this working, that aimed to the evaluation of the environmental quality of Pacoti river quality using *S. testudineus* as the indicator and different biochemical biomarkers and histopathology as endpoints. There was an accentuated difference in the number of male and female fishes (1 male to 4.6 females). The body weight showed a great variation (mean \pm SD = 45.07 \pm 32.48g), while the length was much more homogen (mean \pm SD = 11.34 \pm 2.57cm). The variation coefficient of GSI and HSI was 82.50% e 54.37%, respectively. All females presented ovary containing previtellogenic oocytes and were mainly in the phase II of gonadal maturation. There were only 2 male identified trough histology and 22 juveniles with undifferentiated gonads. While there were no lesions or alterations in the gonads, the liver tissue presented intense vacuolization, picnosis and some necrotic areas. Vitellogenin was detected on the plasma of females, one male and 14 juveniles, reinforcing the presence of endocrine disruptors in the estuary. The analysis of enzymatic biomarkers showed that the activity of analyzed enzymes, with the exception of GST, were higher in the liver than in the gills. To better understand the real meaning of this enzymatic fluctuation, more studies are necessary with fishes from unpolluted areas. Although the present work is still a preliminary analysis, *S. testudineus* could be considered a suitable model to evaluate environmental quality. Present data strongly suggest the contamination of Pacoti river estuary, one of the most important water resources from Ceará state, since there evidences of liver damage and also feminization.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Principais classes de contaminantes encontrados no ambiente e exemplos. Fonte: Newman e Unger (2003).21
- Tabela 2.** Estimativa da excreção diária (μg) per capita de estrogênios.36
- Tabela 3.** Relação entre os danos de fígado, concentrações de estradiol e tempos de exposição. Sendo o símbolo - a representação de ausência e os números e letras entre () representam o n de peixes onde as alterações foram encontradas seguido do gênero: fêmea (F), macho (M) e indiferenciado (I).....68
- Tabela 4.** Detecção de vitelogenina por formação de bandas de WB de acordo com o gênero dos peixes, concentração de estradiol e tempo de exposição. A marcação em vermelho indica a detecção "indevida" de vitelogenina que, em princípio, apenas deveria ser detectada em fêmeas. (X: não foi possível a realização de WB).71
- Tabela 5.** Distribuição do gênero dos espécimes de *S. testudineus* coletados no estuário do Rio Pacoti de acordo com as datas. As células contendo ? representam animais cujos sexos não puderam ser determinados.....100
- Tabela 6.** Parâmetros biológicos. Médias seguidas pelo erro e desvio padrão do peso corporal total, comprimento padrão, peso das gônadas e do fígado, índice gonadossomático (IGS), índice hepatossomático (IHS) e índice de condição (IC) de *Sphoeroides testudineus* coletados no estuário do Rio Pacoti, entre julho de 2010 e janeiro de 2012.....101
- Tabela 7.** Parâmetros biológicos. Médias seguidas pelo erro e desvio padrão do peso corporal total de *Sphoeroides testudineus* coletados no estuário do Rio Pacoti acordo com o gênero.....102
- Tabela 8.** Ocorrência de alterações no fígado de 21 baiacus *Sphoeroides testudineus* coletados no Rio Pacoti de acordo com o gênero.....106
- Tabela 9.** Detecção de vitelogenina em amostras de plasma de 35 baiacus *Sphoeroides testudineus* coletados no estuário Rio Pacoti de acordo com o gênero.....107
- Tabela 10.** Biomarcadores bioquímicos. Médias seguidas pelo erro e desvio padrão da atividade da EROD, GST, GR e LPO medidas em *Sphoeroides testudineus* coletados no estuário do Rio Pacoti acordo com o órgão investigado (fígado (F) e brânquias (B)).....109
- Tabela 11.** Valores de atividade da EROD em fração citosólica (S9) de diferentes espécies de peixes. Os dados mostram média ± 1 de desvio padrão.....115

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécime de *Sphoeroides testudineus* (Fonte: Prieur Christophe <http://www.fishbase.us/photos/thumbnaillsummary.php?ID=1242>.....26
- Figura 2.** Resultado de busca textual no banco de dados Web of Science® com relação à quantidade de publicações ao longo dos anos, desde 1994 a 2013. Tópico pesquisado: *endocrine disruptors*, e após refinamento de resultados com o tópico *fish*. (Fonte: Web of Science, acessado em 26 de junho de 2013. <http://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do>).34
- Figura 3.** Representação das estruturas moleculares dos hormônios femininos: 17 β -estradiol (natural) e 17 α - etinilestradiol (sintético).....35
- Figura 4.** Representação esquemática do sistema endócrino em humanos adaptada de Ghiselli e Jardim (2007) e de um peixe teleósteo típico (Pait e Nelson, 2002).38
- Figura 5.** Representação esquemática da vitelogênese em peixes, onde a linha cheia representa a via normal de indução vitelogenina na fêmea e as linhas tracejadas mostram as vias de exposição a estrogênios exógenos. O estrogênio endógeno é produzido pelo ovário sob a estimulação dos hormônios folículo-estimulante e luteinizante (FSH / LH), passa para a circulação e induz a síntese de vitelogenina no fígado. A vitelogenina então passa para a circulação e é incorporada pelos oócitos em desenvolvimento e armazenadas, como vitelo, nos embriões. O estrogênio exógeno pode ser incorporado por via oral e/ou através da brânquia e/ou a superfície da pele. Em peixes machos expostos, a vitelogenina se acumula no plasma (Tyler et al 2008).41
- Figura 6.** Em A: Fenótipo de intersex com a presença de ovócitos (oo) no tecido testicular preenchido com spermatogônias (Spg) do trabalho de Geraudie *et al.* (2011); Em B: Presença de *ovo-testis* com um grande ovócito localizado entre espermatozóides e espermatogônias (Diniz *et al.* 2010).....42
- Figura 7.** Ponto de coleta no estuário do Rio Pacoti (foz 3 ° 49 '04,51 "S; 38 ° 24' 35,54"); Datum: WGS 84 – Fonte: Google Earth TM.49
- Figura 8.** Coleta dos espécimes de *Sphoeroides testudineus* no estuário do Rio Pacoti. (A): Ponto de coletado localizado à foz do rio; (B e C): coleta por meio de pesca artesanal utilizando-se tarrafa; (D): espécimes de baiacu recém coletados.50
- Figura 9.** Resumo das condições de teste referente à exposição por via intraperitoneal.53
- Figura 10.** Representação do processamento dos peixes utilizados no experimento. Cada animal foi inicialmente anestesiado e sacrificado com posteriores medições biométricas e retirada de tecidos. O sangue foi imediatamente centrifugado e armazenado em freezer -70°C enquanto os órgãos destinados à histologia foram fixados.....55

- Figura 11.** Valores médios obtidos da mensuração do peso corpóreo de *S. testudineus* de acordo com a dose de estradiol e tempo de exposição. a, $p < 0,05$, t-student comparando a duração do tratamento entre os grupos de um mesmo tratamento.....62
- Figura 12.** Valores médios obtidos da mensuração do comprimento padrão de *S. testudineus* de acordo com a dose de estradiol e tempo de exposição. a, $p < 0,05$, t-student comparando a duração do tratamento entre os grupos de um mesmo tratamento.....62
- Figura 13.** Valores médios obtidos do índice de condição de *S. testudineus* de acordo com a dose de estradiol e tempo de exposição. a, $p < 0,05$, t-student comparando a duração do tratamento entre os grupos de um mesmo tratamento.63
- Figura 14.** Valores médios do índice gônado-somático de *S. testudineus* de acordo com a dose de estradiol e tempo de exposição.....64
- Figura 15.** Cortes transversais de gônadas femininas de *Sphoeroides testudineus*. (A): secção de ovário com destaque para as lamelas ovígeras (l) (10x); (B) porção ampliada mostrando oogônias (oog) e ovócitos pre-vitelogênicos (opv) (20x); (C) corte de ovário maduro com lamelas preenchidas com ovócitos vitelogênicos (ov) (10x) e (D) detalhe dos ovócitos vitelogênicos com evidência na membrana vitelínica (mv) e camada de células foliculares (ccf) (20x).....66
- Figura 16.** Cortes transversais de gônadas masculinas de *Sphoeroides testudineus*. (A): visão geral do testículo com destaque para grande número de espermatozóides (nos tons mais fortes de roxo) (20x); (B) porção ampliada mostrando espermatogônias (esg), espermatócitos (esc) e espermatozóides (espz) (100x).66
- Figura 17.** Cortes transversais de gônadas de exemplares juvenis de *Sphoeroides testudineus*. (A): visão geral da gônada indiferenciada (4x); (B) porção ampliada em que se evidenciam as células ainda indirefenciadas(40x).....67
- Figura 18.** Valores médios do índice hepato-somático de *S. testudineus* de acordo com a dose de estradiol e tempo de exposição. a, $p < 0,05$, t-student comparando a duração do tratamento entre os grupos de um mesmo tratamento.....68
- Figura 19.** Secções transversais de fígado do baiacu *Sphoeroides testudineus*. (A): Aparência normal do tecido hepático com presença de porções de tecido pancreático (tp) e vasos sanguíneos (vs) entre os hepatócitos (hp) (20x); (B) visão geral de fígado com intenso grau de vacuolização citoplasmática (20x); (C): vacúolos no detalhe (vcl)(40x).....69
- Figura 20.** Secções transversais de fígado do baiacu *Sphoeroides testudineus*. (A): Foco de parasitas (20x); (B): Área de necrose (40x).....69
- Figura 21.** Exemplo de revelação em membrana de western blotting. S: padrão de peso molecular; C+: controle positivo com plasma de fêmea de *Rhamndia quelen* em vitelogênese; C-: controle negativo com soro de camundongo; A: fêmea (5 mg/Kg–

29 dias); B: indiferenciado (10 mg/Kg– 29 dias); C: macho (controle – 15 dias); D: fêmea (5 mg/Kg – 15 dias); E: macho (10 mg/Kg – 15 dias); F: fêmea (controle – 29 dias); G: indiferenciado (controle – 29 dias). Os números com orientação vertical representam o peso molecular em quilodaltons (KDa).....70

Figura 22. Relações entre: comprimento-peso total (A), gônadas-peso total (B) e fígado-peso total (C) de 31, 59 e 31(respectivamente) baiacus coletados no Rio Pacoti.....102

Figura 23. Secções transversais de gônadas de *Spherooides testudineus*. (A) uma gônada juvenil com células indiferenciadas (ci) (40x); (B) uma gônada de macho com espermátides (spd), espermatócitos (sc) e espermatogônias (sg) (100x), (C) corte de ovário com destaque para as lamelas ovígeras (10x), e (D) uma porção magnificada da gônada feminina destacando-se as oogonias (oog) e os ovócitos pre- vitelogênicos (opv) (40x).....104

Figura 24. Secções transversais de fígado do baiacu *Spherooides testudineus*. (A) tecido pancreático (tp) (20x); (B) vasos sanguíneos (vs) (20x); (C) vacuolização citoplasmáticas (vcl) (20x); (D) área de necrose (ncs) (40x).....105

Figura 25. Exemplos de detecção por western blotting de vitellogenina (presumida) dos baiacus *Spherooides testudineus* coletados no Rio Pacoti. (S) padrão de peso molecular; (Rq) plasma de fêmea vitelogênica de *Rhambdia quelen* como controle positivo; (F) amostras de plasma de fêmeas de *S. testudineus*; (M) plasma de espécime macho e (I) indiferenciados. Os números orientados verticalmente representam o peso molecular em KDa (kilodaltons).....106

Figura 26. Resultado do ensaio de atividade enzimática da Glutathione S-transferase (GST), Glutathione Redutase (GR) e peroxidação lipídica (LPO) em fígado (F) e brânquias (B) de *S. testudineus* coletados no Rio Pacoti.....108

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA.....	Análise de variância.
APA	Área de Proteção Ambiental.
BSA	Bovine serum albumine.
CAT.....	Catalase.
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno.
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente.
CV.....	Coefficiente de variação.
DE	Desreguladores endócrinos.
DES	Dietilestilbestrol.
DP.....	Desvio padrão médio.
E2	17 β -estradiol.
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assays.
EPM.....	Erro padrão da média.
EROD	7-etoxioresorufina-O-deetilase.
EROS	Espécies reativas de oxigênio.
ETAR.....	Estação de Tratamento de Águas Residuárias.
GR	Glutaciona redutase.
GPx.....	Glutaciona peroxidase
GSH.....	Glutaciona.
GST	Glutaciona-s-transferase.
HE	Hematoxilina-Eosina.
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística.
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.
IC	Índice de condição.

IGS	Índice gonado-somático.
IHS.....	Índice hepato-somático.
LPO	Lipoperoxidação.
NFDM	Non-fat dehydrated milk.
OD	Oxigênio dissolvido.
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development.
pH	Potencial hidrogeniônico.
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride.
SEMACE.....	Superintendência Estadual do Meio Ambiente do Ceará.
SOD.....	Superóxido dismutase.
TBARS	Ácidos tiobarbituricos.
TBT.....	Tributilestanho.
USEPA	Agência Americana de Proteção Ambiental.
VTG	Vitelogeninas.
WB	Western blotting.

LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES

- ANEXO 1.** Decreto estadual de criação da Área de Proteção Ambiental (APA) do Rio Pacoti.
Fonte:http://antigo.semace.ce.gov.br/biblioteca/legislacao/conteudo_legislacao.asp?cd=75.....135
- APÊNDICE 1.** Valores de peso total corpóreo (g) do baiacu *Sphoeroides testudineus* após exposição ao hormônio feminino 17β -Estradiol (E2). Mensurações realizadas no início e no final do experimento, acompanhados pelo delta de variação...142
- APÊNDICE 2.** Valores do índice gônado-somático (IGS) e índice hepato-somático (IHS) do baiacu *Sphoeroides testudineus* após exposição ao hormônio feminino 17β -Estradiol (E2).....143

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	20
CAPÍTULO I.	
CARACTERIZAÇÃO DE EFEITOS ASSOCIADOS À DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA DO HORMÔNIO FEMININO 17 β -ESTRADIOL EM <i>SPHOEROIDES TESTUDINEUS</i>	28
RESUMO	29
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
2. OBJETIVOS	48
3. MATERIAL E MÉTODOS	49
4. RESULTADOS	61
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	82
CAPÍTULO II.	
AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA EM TECIDOS DE <i>SPHOEROIDES TESTUDINEUS</i> COLETADOS NO ESTUÁRIO DO RIO PACOTI - CE	83
RESUMO	84
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	85
2. OBJETIVOS	93
3. MATERIAL E MÉTODOS	94
4. RESULTADOS	100
5. DISCUSSÃO	110

6. CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
ANEXOS	135
APÊNDICES	142

INTRODUÇÃO GERAL

1. Poluição, Ecotoxicologia e os biomarcadores de contaminação

Desde seu surgimento na terra, quanto mais o homem utiliza os recursos do meio, maior quantidade de resíduos e subprodutos desta utilização é lançada no mesmo. O marcante crescimento da população mundial nas últimas décadas com inserção de novos bens de consumo e hábitos de vida elevou sobremaneira a demanda por novas tecnologias e produtos resultando, assim, no descarte de muitas substâncias que têm, geralmente, o oceano atuando como receptor final. É importante destacar que mesmo quando os poluentes oriundos das atividades antrópicas são lançados no ar ou solo, eles fatalmente alcançam o ambiente aquático, isto é, os rios, lagos, estuários, mares e, conseqüentemente, o oceano como um todo (Sousa, 2002).

Marques Jr. e colaboradores (2002) afirmam que as regiões costeiras são especialmente vulneráveis ao impacto da poluição devido à intensa ocupação humana, geralmente próxima a baías e estuários. Nos últimos dados divulgados sobre as áreas de grande concentração populacional, as zonas costeiras constam como detentoras de mais de 40% da população mundial, incluindo 21 das 33 mega-cidades do mundo (Sale *et al.* 2008; SCBD, 2012). Considerando apenas os efluentes líquidos emitidos, esse "inchaço" populacional na zona costeira agrava ainda mais a situação de degradação de corpos hídricos adjacentes onde são despejados, diariamente, toda sorte de rejeitos agrícolas, domésticos e industriais. É sabido que a grande maioria destes resíduos acaba interagindo de forma adversa com o meio, de acordo com a peculiaridade das características de cada um. Na visão de Sponza (2003), tanto a descarga deliberada, quanto a emissão acidental de combinações de substâncias químicas no ambiente possuem potencial para alterar a estrutura e o funcionamento de ecossistemas naturais. É comum que os poluentes passem por

transformações físicas, químicas e biológicas fazendo com que até mesmo os organismos de níveis tróficos superiores possam ser atingidos, por meio de mecanismos de biomagnificação de alguns compostos. Sendo assim, esta grande quantidade e variedade de poluentes ocasiona, muitas vezes, impactos irreversíveis. Na Tabela 1, encontram-se listadas as principais classes de contaminantes (seguidas de exemplos) presentes no ambiente de acordo com Newman e Unger (2003).

Tabela 1. Principais classes de contaminantes encontrados no ambiente e exemplos. Fonte: Newman e Unger (2003).

Grandes classes de contaminantes	Exemplos
Metais e metalóides	Alumínio, cádmio, selênio, zinco.
Gases inorgânicos	Dióxido de carbono, dióxido de enxofre.
Nutrientes	Nitrato, nitrito.
Compostos orgânicos	HPA, BPC, carbamatos, clorofenóis.
Compostos organometálicos	Mercúrio orgânico, chumbo orgânico.
Compostos emergentes	Alquilfenóis, perfluorooctanos sulfonados.

Em monitoramentos ambientais existem diversas formas disponíveis de se avaliar os graus de poluição. É sabido que a degradação aquática pode ser acessada tanto por determinação direta da concentração de contaminantes (quantificação química) quanto por indicadores biológicos. Durante muitos anos as determinações químicas serviram como indicadores exclusivos e mais tradicionais de contaminação. Entretanto, nas últimas décadas os estudos ecotoxicológicos fundamentados em bioensaios realizados em laboratório vêm sendo bastante utilizados em análises de poluição de corpos d'água como forma de integrar melhor, explicar resultados objetivamente e subsidiar a tomada de decisões rápidas e seguras. Entende-se por toxicidade qualquer efeito adverso manifestado por organismos testes, o que pode incluir desde alterações genéticas, imobilidade, deformidades até letalidade. Tais

respostas às agressões ambientais podem ser detectadas nos mais diversos níveis de organização biológica e ecológica, desde alterações em processos bioquímicos em compartimentos subcelulares de indivíduos até em uma comunidade inteira, passando pelo organismo como um todo, sistemas fisiológicos, populações etc (Sousa, 2002). Apesar das determinações químicas continuarem sendo úteis em diagnósticos ambientais, dificilmente refletem de forma direta o efeito das concentrações de contaminantes medidas na saúde da biota. Isso se dá porque, nestes casos, não é considerada a biodisponibilidade de tais substâncias, as complexações destas no ambiente nem o efeito de misturas complexas (sinergismo, adição, antagonismo) (Ait-Aissa *et al.* 2003; Svensson *et al.* 2005). Devido a este fato, a Ecotoxicologia é uma ciência que busca esclarecer quais são os efeitos tóxicos destas substâncias biologicamente ativas sobre os organismos. É válido salientar que os efeitos destes contaminantes dependem da forma como os mesmos entram em contato com o organismo, ou seja, se o xenobiótico é ingerido diretamente do ambiente, absorvido dermicamente, por brânquias, superfícies pulmonares ou consumido por meio da cadeia trófica (Mozeto & Zagatto, 2006; Newman & Unger, 2003).

Além dos bioensaios, os estudos em que se utilizam biomarcadores de contaminação são desenvolvidos e inseridos no ramo Ecotoxicologia. As análises de biomarcadores se valem da possibilidade de avaliar o estado de degradação de um determinado ambiente por meio de parâmetros de saúde dos organismos inseridos neste, pois expressam os efeitos provocados por poluentes (Walker *et al.* 1996). Estas alterações podem acontecer nos mais diversos níveis de organização biológica, desde mudanças em vias bioquímicas, danos moleculares, genéticos, mudança no padrão fisiológico, alterações morfológicas, comportamentais, reprodutivas, etc.

Os biomarcadores costumam ser classificados como de *exposição* ou *efeito*. Bianchini *et al.* (2006) definem como biomarcador de *exposição* qualquer alteração biológica

que dê indícios de que o organismo está sendo exposto a um contaminante. Os de *efeito* são aqueles que evidenciam algum efeito tóxico em decorrência da exposição ao contaminante. As vantagens de indicadores biológicos em relação à determinação direta da concentração de poluentes são o baixo custo, método de análise relativamente simples e, principalmente, a possibilidade de quantificar de forma precoce os danos causados pelos contaminantes nos organismos expostos (Bianchini *et al.* 2006).

Os peixes fazem parte do mais numeroso grupo dentre os vertebrados e possuem grande importância ecológica e econômica (Fávaro & Oliveira, 2012). São componentes essenciais nas cadeias tróficas aquáticas atuando significativamente como presas e como predadores além de exibirem as mais diversas estratégias comportamentais e reprodutivas. Apesar de algumas limitações como a alta mobilidade e do fato de nem sempre serem muito sensíveis a determinados poluentes, esta diversidade de hábitos e comportamentos aumentam o potencial de exposição dos peixes, por estarem em contato com diversas matrizes e compartimentos biológicos (Rand, 2008; Sepulveda *et al.* 2002). Devido a este fato, os peixes são organismos-modelo relevantes e representativos e, por isso, foram escolhidos para este trabalho.

2. Modelo biológico

A família tetraodontidae (gr. *Tetra* = quatro + *Odontus* = dentes) compreende os peixes comumente chamados de baiacus que se diferenciam por determinadas características intrínsecas, como a capacidade de inflar o corpo (estratégia de defesa contra predação) e a presença de maxilas modificadas com duas placas dentíferas inferiores e superiores (Figueiredo & Menezes, 2000). O curioso ato de inflar sob situações de estresse é possível por causa do estômago modificado com divertículo capaz de armazenar grande quantidade de ar ou água (Noletto, 2009). Seus habitats são basicamente marinhos em regiões

tropicais dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico, porém algumas espécies são residentes de águas rasas doces ou salobras de estuários e não apresentam comportamento migratório (Fávaro *et al.* 2009; Figueiredo & Menezes, 2000; Ribeiro, 2007; Shultz, 2002; Targett, 1978).

Todas as espécies desta família apresentam hábitos bentônicos, são carnívoras e muitas são tóxicas devido à presença da tetraodontotoxina que atua no sistema nervoso central e periférico podendo causar envenenamento. Pelo fato de não serem plenamente palatáveis, as espécies pertencentes a esta família não são economicamente relevantes no Brasil, ao contrário do Japão onde os tetraodontídeos possuem alto valor e o consumo está condicionado às refinadas técnicas de preparo (Possatto, 2006). Uma informação adicional que pode ser dada a respeito destes animais é que os baiacus lisos possuem o menor genoma entre todos os vertebrados e, por isso, sua genética é bastante estudada (Noletto, 2009).

O peixe da espécie *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus, 1758) pertencente à família Tetraodontidae, escolhido como modelo biológico para este trabalho, é um animal de fundo, habita baías, enseadas, estuários e pode penetrar na água doce por tolerar grandes variações de salinidade (Prodocimo & Freire, 2004; Targett, 1978). Trata-se de uma espécie abundante e sua ocorrência na América se dá desde Nova Jersey (EUA) até o estado de Santa Catarina (Brasil) sendo, possivelmente, a espécie de baiacu mais comum no litoral brasileiro (Figueiredo & Menezes, 2000; Possatto, 2006).

S. testudineus é um peixe carnívoro importante para as teias tróficas das quais participa, alimentando-se principalmente de moluscos e crustáceos (Targett, 1978). O hábito alimentar é bentofágico, preso ou próximo ao substrato, hábito este possibilitado pelo achatamento dorso-ventral com boca terminal (Chiaverini, 2008; Lemos, 2006). Foi evidenciado no trabalho de Chiaverini (2008) que os indivíduos juvenis possuem atividade

alimentar mais elevada que os adultos sendo ambos especialistas em crustáceos e moluscos e com ciclo e ritmo alimentar diurno.

No Brasil o consumo de *S. testudineus* por humanos é pouco praticado e até desaconselhado, pois pode ser fatal, uma vez que o animal é extremamente tóxico devido à presença da tetraodontoxina (Froese & Pauly, 2013; Rocha *et al.* 2002). Landsberg *et al.* (2006) traz um caso originalmente relatado por Benson (1956) de uma mulher que morreu 45 min após ingerir fígado do baiacu *S. testudineus*.

No Brasil, há relativamente pouca literatura sobre a espécie levando-se em consideração a sua importância ecológica para as biocenoses onde está inserido, principalmente quando se trata de avaliações ambientais com uso de biomarcadores.

É importante que a escolha do organismo modelo utilizado em investigações ambientais obedeça a alguns pré-requisitos inerentes ao propósito. Neste caso, foram nove as principais motivações que nos fizeram optar por *S. testudineus* para o presente trabalho. A saber: **1. Abundância e facilidade de obtenção** - Não requer técnicas intrincadas de pesca para ser coletado; **2. Importância na cadeia trófica** - Garante boa representação ecológica (Targett, 1978); **3. Hábitos bentônicos** - Sabe-se que o sedimento é um compartimento onde ocorre acumulação expressiva de contaminantes (Adams *et al.* 1992). Sendo assim, estando este animal em contato constante com o sedimento, pode-se inferir que o mesmo encontra-se exposto à maior contaminação que os peixes da coluna d'água; **4. Cosmopolitismo** - Marcante presença em todos os estuários do estado (ZEE, 2005) e em quase todos os estuários do país (Froese & Pauly, 2013); **5. Pouca importância econômica** - O fato de ser considerado descarte da pesca artesanal (por não ser comestível) faz com que seu uso em monitoramentos não introduza um impacto grande, como poderia ocorrer caso o animal já sofresse com as pressões da pesca; **6. Facilidade de identificação no campo** - Permite que não sejam coletados organismos desnecessariamente que acabariam sendo descartados; **7.**

Comportamento não-migratório - Apoiado na afirmação de Figueiredo e Menezes (2000) de que estas espécies não apresentam comportamento migratório e podem permanecer em um mesmo local durante todo o ano, Noletto (2009) sugere que tal comportamento garante uniformidade nos padrões genéticos populacionais, além de serem representativos do ponto de coleta; **8. Boa adaptação às condições de laboratório** - Ribeiro (2007) concluiu em seu trabalho que o baiacu *S. testudineus* se adapta facilmente a condições de laboratório e demonstrou ser apropriado para bioensaios e estudos de biomarcadores; **9. Escassez de dados** - Novos dados sobre a biologia da espécie e o nível de respostas aos métodos empregados são extremamente relevantes.

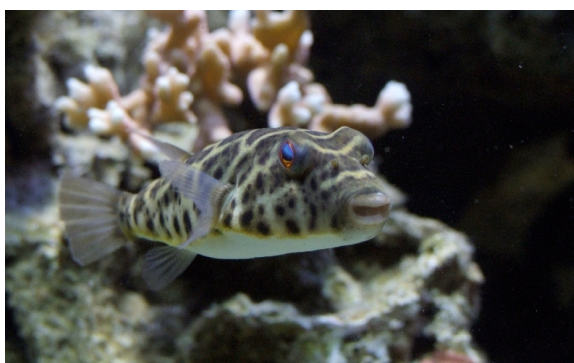


Figura 1. Espécime de *Sphoeroides testudineus* (Fonte: Prieur Christophe)
(<http://www.fishbase.us/photos/thumbnailsummary.php?ID=1242>)

3. Apresentação dos capítulos

Partindo da problemática global de contaminação de estuários, tem-se aqui como principais objetivos: 1. a utilização do baiacu *Sphoeroides testudineus* em estudos com biomarcadores de contaminação aquática; 2. a avaliação da viabilidade deste animal como organismo modelo para tais estudos; 3 a investigação da exequibilidade dos métodos empregados. Para tanto, foi necessário dividir esta tese em dois capítulos a fim de facilitar a

compreensão dos resultados, ainda que tais investigações não tenham sido realizadas separadamente sob o ponto de vista cronológico.

No capítulo I intitulado **CARACTERIZAÇÃO DE EFEITOS ASSOCIADOS À DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA DO HORMÔNIO FEMININO 17 β -ESTRADIOL EM *SPHOEROIDES TESTUDINEUS***, tem-se uma avaliação de algumas respostas do baiacu à exposição ao hormônio feminino estradiol (E2) em condições laboratoriais. Trata-se de uma caracterização preliminar para que o comportamento do organismo frente à perturbação endócrina seja conhecido levando, conseqüentemente, à validação da espécie para estudos de desregulação endócrina e monitoramentos ambientais futuros em estuários tropicais.

Apesar de ainda se tratar de um estudo de caracterização, o capítulo II (**AValiação de Biomarcadores de Contaminação Aquática em Tecidos de *SPHOEROIDES TESTUDINEUS* Coletados no Estuário do Rio Pacoti - CE**) traz uma avaliação da qualidade da foz do estuário do Rio Pacoti pela análise de biomarcadores associados a diversos tipos de contaminação; além de contribuir para o conhecimento da biologia de *S. testudineus* coletados no estuário supracitado.

CAPÍTULO I

**CARACTERIZAÇÃO DE EFEITOS ASSOCIADOS À DESREGULAÇÃO
ENDÓCRINA DO HORMÔNIO FEMININO 17β -ESTRADIOL EM
*SPHOEROIDES TESTUDINEUS***

RESUMO

As substâncias que geram efeitos femininos são conhecidas como estrogênicas e há inúmeros estudos que atestam a ocorrência destas em concentrações toxicologicamente relevantes em ambientes aquáticos. Os estrogênios são compostos que participam da reprodução tanto em machos quanto em fêmeas atuando como mensageiros químicos. São hormônios predominantemente femininos, e o 17 β -estradiol (E2) é o mais importante. Devido à associação específica entre a síntese de vitelogeninas (VTG) e a estimulação por estrógenos, a análise da presença desta proteína no plasma de juvenis e machos tem sido indicada em todo o mundo como um bom biomarcador para a avaliação da estrogenicidade de vários contaminantes em peixes. O baiacu *S. testudineus* foi escolhido como modelo neste trabalho para que suas respostas à parâmetros comumente utilizados em estudos de desregulação endócrina sejam caracterizadas. Em virtude da carência de estudos ligados à temática da desregulação endócrina, aliada à necessidade de padronização de modelos que possibilitem o início deste tipo de estudo em nossos corpos d'água, esta etapa do trabalho teve como principais objetivos: avaliar a resposta do baiacu *Sphoeroides testudineus* à exposição ao hormônio feminino 17 β -Estradiol (E2) em condições laboratoriais por meio de dados biométricos, dos biomarcadores VTG, IGS, IHS e histopatologia de gônadas e fígado; e a avaliação/validação da espécie para estudos posteriores de desregulação endócrina. As concentrações testadas foram: 5 e 10mg E2 Kg⁻¹ (peso corpóreo). Para cada concentração foram testados dois tempos de exposição que foram 15 e 29 dias, tendo assim o total de 9 peixes por período. Não foi observada diferença significativa em nenhum parâmetro biométrico, IGS ou IHS. Em nenhum espécime de nenhum dos tratamentos foram encontradas lesões ou anormalidades nas gônadas, todas as estruturas estavam dentro dos padrões normais descritos para peixes teleósteos. Nas amostras de fígado foram observados diferentes níveis de vacuolização citoplasmática, desde moderadas até vacuolização intensa. Além de vacuolização, outras alterações foram encontradas, como presença de parasitas e áreas de necrose. Feita a revelação das membranas de WB, houve formação de bandas duplas fortes em uma região onde se localizam proteínas de peso molecular de aproximadamente 270 kDa. A expressão de VTG foi detectada em machos maduros e juvenis tanto advindos da exposição ao estradiol quanto nos peixes do controle. A detecção de VTG em animais do controle sugere fortemente a presença de contaminantes com potencial de desregulação endócrina no estuário do Rio Pacoti. Não há como sabermos se o baiacu *Sphoeroides testudineus* responde bem aos parâmetros por nós utilizados uma vez que houve interferência por contaminação prévia, anterior à exposição. Há que se ressaltar que a exposição deles no ambiente pode ter limitado ou aumentado a sua resistência e mascarado estes resultados. São necessários estudos complementares contando com maiores concentrações de E2 e também com maior número de machos expostos com ampliação do *n* amostral e escolha de um ambiente menos impactado para que estas questões sejam elucidadas.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os ecossistemas aquáticos são de fundamental importância para a manutenção da vida no planeta. A qualidade da água de rios, lagos e mares reflete, conseqüentemente, na qualidade de todas as comunidades que dependem direta ou indiretamente destes ambientes. Infelizmente, a intervenção do homem, por meio do lançamento de substâncias oriundas do avanço desenfreado da industrialização e do progresso tecnológico em todas as esferas, é a grande responsável pela poluição de nossos recursos naturais. Somado a isto, o aumento da população mundial que gera quantidades enormes de lançamento de dejetos em corpos hídricos de toda sorte, torna o quadro ainda mais alarmante.

1.2. Compostos Emergentes e Desreguladores Endócrinos

Dentre as classes de contaminantes que ultimamente mais têm preocupado os técnicos de órgãos ambientais estão os chamados compostos emergentes, substâncias cujas conseqüências ecotoxicológicas de seu lançamento no ambiente ainda são relativamente desconhecidas. Categorizados de acordo com os impactos que podem ser causados na saúde humana e no ambiente, os compostos emergentes encontram-se enquadrados nos seguintes grupos: hormônios esteróides; compostos farmacologicamente ativos; produtos de higiene e cuidado pessoal; pesticidas, herbicidas e inseticidas; produtos químicos de uso doméstico; subprodutos de desinfecção; metais; surfactantes e metabólitos; retardantes de chama; aditivos industriais; aditivos da gasolina; nanopartículas; entre outros (United States, 2009). Não se trata apenas de produtos químicos produzidos nos últimos anos, mas também de compostos que foram intensamente utilizados no passado e estão sendo detectados com cada vez mais freqüência em diversos compartimentos ambientais (Sodré *et al.* 2007).

Estes produtos têm sido detectados em quantidades significativas nos mais diversos ecossistemas e, por se tratarem de compostos cujas caracterizações são escassas, ainda não há legislação vigente disponível para que níveis seguros de emissão no ambiente sejam regulamentados (Simões, 2010).

Exemplificando a presença no ambiente com os fármacos, já existem diversos estudos relatando a ocorrência de uma vasta gama desse grupo de contaminantes (80 a 100) de diferentes classes (anti-inflamatórios, beta-bloqueadores, anti-epilépticos, os reguladores de lipídeos, antibióticos, etc.) e alguns metabólitos no ambiente de muitos países. Geralmente, estas substâncias são detectadas em esgoto tratado, rios e riachos, água do mar, águas subterrâneas e até mesmo em água potável (Fent *et al.* 2006).

Sodré *et al.* (2007) examinaram a ocorrência de 15 compostos emergentes em águas superficiais da região metropolitana de Campinas (SP) e foram detectados: cafeína, di-n-butilftalato, bisfenol A, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, paracetamol e ácido acetilsalicílico. Os autores chamam a atenção para a necessidade da implantação de novas tecnologias nas estações de tratamento de água para a eliminação destes compostos que podem ser transferidos para a água potável.

Marcadamente nas duas últimas décadas, houve aumento da preocupação na comunidade científica e na atenção da mídia no que tange aos efeitos perigosos que podem ser causados ao sistema endócrino tanto de humanos como de animais. E, certamente, o maior problema relacionado à emissão dos compostos emergentes no ambiente é a desregulação endócrina causada por muitos deles (naturais ou sintéticos) em organismos aquáticos. Os desreguladores endócrinos são substâncias capazes de interferir direta ou indiretamente no sistema endócrino dos organismos podendo afetar a saúde, o crescimento e a reprodução (Bila & Dezotti, 2007). Em fases iniciais do desenvolvimento embrionário animal os desreguladores endócrinos podem ser prejudiciais acumulando-se no tecido adiposo, atravessando a placenta

ou, no caso dos mamíferos, podem ser transferidos por meio da amamentação (Duarte, 2008). Quando ocorre exposição nestas fases precoces do desenvolvimento as conseqüências podem ser evidenciadas na fase adulta, principalmente com surgimento de problemas no sistema reprodutor.

Bila *et al.* (2007) destacam entre os interferentes endócrinos substâncias sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, bifenilas policloradas, bisfenol A, 17 α - etinilestradiol, entre outras) e substâncias naturais (17 β -estradiol, estrona e fitoestrogênios) e alertam para o fato de que podem ser deletérias em concentrações da ordem de ng/L. Estes compostos agem de formas variadas: mimetizando hormônios endógenos, sendo antagonistas destes, alterando seu padrão de síntese ou modificando o nível de seus receptores atrapalhando, assim, o funcionamento normal do sistema endócrino e neuroendócrino (Sonnenschein & Soto, 1998).

Os fatos que levaram ao "descobrimento" dos desreguladores endócrinos como potencialmente nocivos são descritos em trabalhos que se tornaram verdadeiros clássicos para que fosse traçado o histórico desta problemática ambiental. Talvez o exemplo mais emblemático seja o enorme dano causado por um estrogênio sintético chamado Dietilestilbestrol (DES) receitado para mais de 5 milhões de gestantes entre os anos 1950 e 1970 com a finalidade de prevenir abortos e complicações na gravidez. Após transcorridas décadas é que foi constatada uma série de problemas com a prole das mulheres que fizeram uso deste medicamento como câncer da vagina, deformação no útero, infertilidade nas filhas, e criptoquirdia nos filhos. Também foi observado crescimento nas mamas em homens que trabalharam na fábrica de DES. O medicamento foi banido para essa finalidade por se tratar de uma substância altamente estrogênica mas as conseqüências desastrosas de seu uso podem ser observadas até os dias de hoje (Colborn *et al.* 1993; Markey *et al.* 2003; Olea *et al.* 2002).

Desta vez na vida selvagem, um clássico exemplo de efeitos fisiológicos e ecológicos causados por interferentes endócrinos ocorreu com crocodilos do lago Apokpa na

Califórnia-EUA e foi documentado por Guillette Jr *et al.* (1994). Amplamente citado, o estudo chamou a atenção para o declínio da população de crocodilos associado a uma série de anomalias possivelmente causadas pelo vazamento de uma mistura de pesticidas (DDT e DDE) em 1980. Os autores observaram que as fêmeas exibiam uma morfologia anormal nos ovários, diminuição da capacidade de chocar os ovos, e os machos apresentaram um decréscimo significativo de níveis plasmáticos de testosterona além da diminuição do tamanho do pênis.

Outro caso de interferência endócrina causada pela contaminação ambiental que se tornou famoso em todo o mundo foi o da inequívoca relação estabelecida entre a ação do tributilestanho (TBT) utilizado em tintas anti-incrustantes para cascos de navios e o aparecimento de uma anomalia sexual em moluscos gastrópodes. O fenômeno conhecido como *imposex* consiste na indução de um hermafroditismo nas fêmeas fazendo com que elas desenvolvam órgãos reprodutores masculinos e, conseqüentemente, levando a espécie a um declínio populacional. As observações feitas em campo foram reproduzidas em condições controladas no laboratório levando à conclusão de que há, de fato, um mecanismo de causa e efeito entre TBT e *imposex*. Após a proibição do uso de TBT pôde-se observar a redução de suas concentrações no ambiente assim como um decréscimo na incidência de *imposex* (Fernandez *et al.* 2002; WHO, 2002).

Os dois últimos casos supracitados, dos crocodilos do Lago Apokpa e do *imposex* causado pelo TBT, são exemplos de casos de contaminação por desreguladores endócrinos que culminaram em sérias conseqüências ecológicas locais para as espécies atingidas. Existe hoje uma necessidade vital em se compreender e investigar os mecanismos de causa e efeito envolvidos na desregulação endócrina para que seja possível estabelecer o potencial de interferência em níveis de organização biológica mais altos que o do indivíduo. Para isso, Taylor *et al.* (1999) recomendam o uso de estudos semicontrolados em campo ou mesocosmos seguidos de modelos disponíveis em computador que possam interpretar os dados de

laboratório e campo e extrapolar para as populações.

Notadamente nos últimos anos, o tema da desregulação endócrina vem ganhando maior atenção por parte dos órgãos ambientais, obtendo cada vez mais espaço na produção de conhecimento científico e na mídia em geral. Observando-se os dados disponíveis no Web of Science®, é possível notar o crescimento do número de publicações ao longo das duas últimas décadas, após busca pelo tópico *endocrine disruptors*. Na Figura 2 pode-se observar o resultado desta busca em forma de gráfico, além do refinamento de resultados com o tópico *fish*

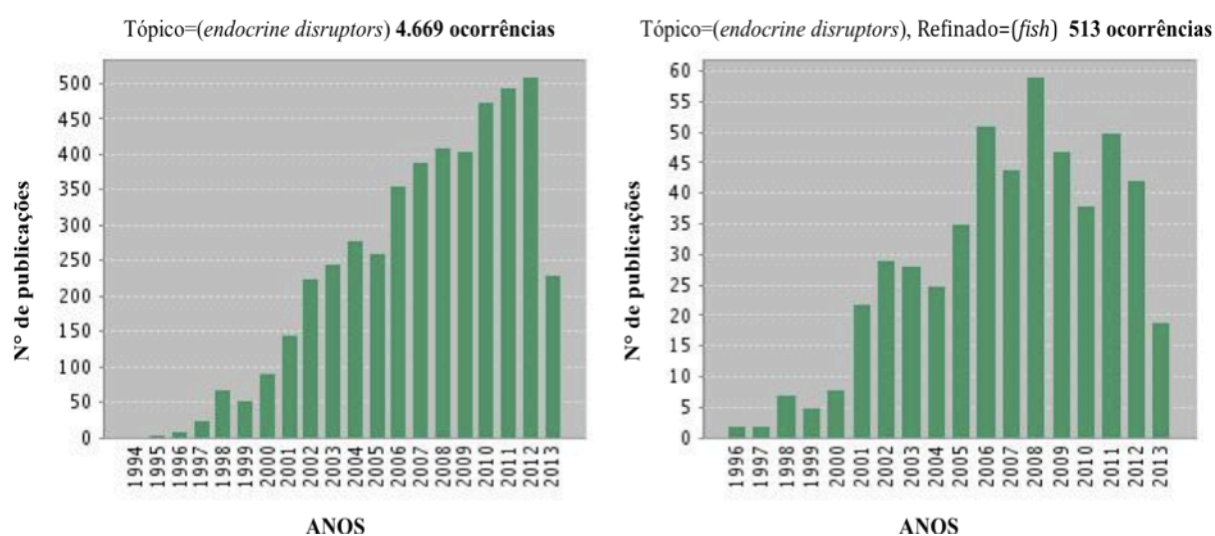


Figura 2. Resultado de busca textual no banco de dados Web of Science® com relação à quantidade de publicações ao longo dos anos, desde 1994 a 2013. Tópico pesquisado: *endocrine disruptors*, e após refinamento de resultados com o tópico *fish*. (Fonte: Web of Science, acessado em 26 de junho de 2013. <http://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do>).

1.3. Estrogênios ambientais

Como afirmado por Ghiselli e Jardim (2007), as substâncias que geram efeitos femininos são conhecidas como estrogênicas e há inúmeros estudos que atestam a ocorrência destas em concentrações toxicologicamente relevantes em ambientes aquáticos (Matozzo *et al.*, 2008). Bila e Dezotti (2007) definem uma substância estrogênica como uma "substância cujo

efeito se dá através do receptor de estrogênio, iniciando uma cascata de efeitos específicos no tecido ou na célula similar aos iniciados pelo 17 β -estradiol".

Os estrogênios são compostos que participam da reprodução, tanto em machos quanto em fêmeas, atuando como mensageiros químicos. São hormônios predominantemente femininos, sendo o 17 β -estradiol (E2) o mais importante. Sabe-se que o E2 serve de molde para síntese de outros hormônios como os sintéticos (Froehner *et al.* 2012).

De modo geral, a excreção tanto de humanos quanto de animais consiste na principal fonte de compostos estrogênicos no ambiente. O fato de os receptores de estrógeno terem uma especificidade relativamente baixa facilita a ação oportunista dos xenoestrogênios (Matozzo *et al.* 2008).

Como estabelecido entre os estudiosos do tema, o maior aporte de substâncias estrogênicas no ambiente se dá pelos esgotos domésticos, principalmente com a excreção dos compostos, endógenos ou não, utilizados na fabricação de pílulas contraceptivas como o 17 β -estradiol, 17 α - etinilestradiol (Figura 3), estriol e estrona (Bila & Dezotti, 2007). E como bem aponta Witosrch (2002), os estímulos provocados por hormônios dependem de quantidades absolutamente diminutas destes fazendo com que baixíssimas concentrações ambientais já se tornem potencialmente perigosas.

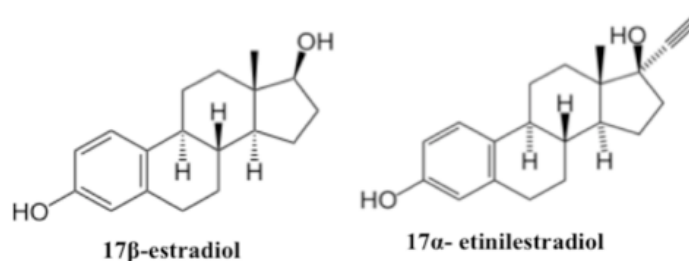


Figura 3. Representação das estruturas moleculares dos hormônios femininos: 17 β -estradiol (natural) e 17 α -etinilestradiol (sintético).

Estes compostos são excretados diariamente, principalmente nas grandes cidades, em quantidades variáveis. Bila e Dezotti (2007) apresentam em sua revisão uma estimativa da excreção diária (μg) per capita de estrogêneos que pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2. Estimativa da excreção diária (μg) per capita de estrogênios.

Categoria	estrone	17 β - estradiol	estriol	17 α - etinil- estradiol
Homens	3,9	1,6	1,5	-
Mulheres menstruando	8	3,5	4,8	-
Mulheres na menopausa	4	2,3	1	-
Mulheres grávidas	600	259	6.000	-
<i>Mulheres</i>	-	-	-	35

*Fonte: adaptado do trabalho de Bila e Dezotti (2007)

As autoras também apontam em sua revisão que ainda que os seres do sexo masculino excretem estes compostos em forma de compostos conjugados não ativos, eles podem ser encontrados em efluentes na forma ativa, dando indicações de que a ativação pode ocorrer durante os processos de tratamento.

Como revisado por Porte *et al.* (2006), a natureza lipofílica e persistente dos xenoestrógenos bem como dos seus metabólitos pode fazer com que sejam bioacumulados e biomagnificados em diferentes compartimentos ambientais e nos próprios tecidos dos organismos. O comportamento estável no ambiente deve-se ao fato de serem geralmente liberados como conjugados inativos (Froehner *et al.* 2012).

Nesse contexto, há uma evidente necessidade de se desenvolver estudos focados não só em quantificações destes contaminantes estrogênicos no ambiente, mas também dos efeitos potenciais deles nos mais diversos ecossistemas. A urgência em se caracterizar níveis possíveis de emissões, encontrar soluções para remoção destas substâncias dos efluentes e

detectar tais compostos em águas para abastecimento tem gerado uma demanda por modelos biológicos eficientes tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Com efeito, órgãos ambientais governamentais ou não-governamentais em todo o mundo estão empenhados em desenvolver programas, projetos, padronizações e trocas de informações no que concerne aos estudos com desreguladores endócrinos (Ex: *US-Environmental Protection Agency, World Health Organization, Organization for Economic Co-operation and Development, Europe Union, International Programme on Chemical Safety*, dentre outros).

1.4. Feminização em peixes

Assim como nos humanos, o sistema endócrino dos peixes é formado pela presença de várias glândulas distribuídas ao longo do corpo secretando hormônios específicos de forma a controlar uma vasta gama de processos biológicos (Figura 4) (Pait & Nelson, 2002). Os hormônios sintetizados pelo hipotálamo e hipófise também controlam as funções fisiológicas de outras glândulas, como a tireóide e as gônadas, em um complexo controle neuroendócrino. O eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal coordena uma série de eventos reprodutivos em peixes teleósteos, desde o desenvolvimento dos tecidos gonadais até a fertilização de gametas maduros (Thomas, 2008).

A maioria dos dados disponíveis na literatura acerca dos efeitos biológicos de contaminantes desreguladores endócrinos e seus mecanismos de ação em organismos marinhos advém dos estudos com vertebrados (Porte *et al.* 2006). Dentre estes, o grupo dos peixes tem sido majoritariamente pesquisado por apresentar certas vantagens como abundância, facilidade de coleta e, principalmente, similaridade com o sistema endócrino humano (Okoumassoun *et al.* 2002; Pait & Nelson, 2002; Thomas, 2008).

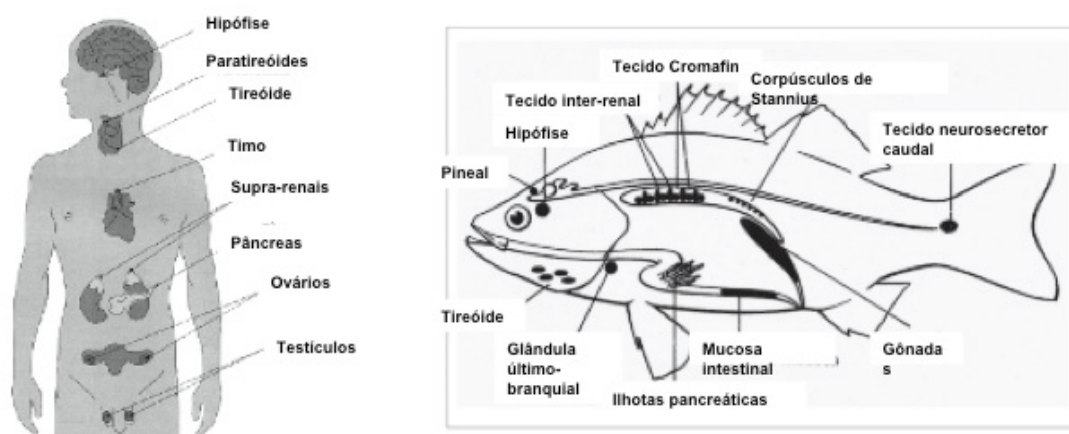


Figura 4. Representação esquemática do sistema endócrino em humanos adaptada de Ghiselli e Jardim (2007) e de um peixe teleosteo típico (Pait e Nelson, 2002).

É sabido que muitos interferentes endócrinos agem por competição com os hormônios endógenos pelos receptores celulares podendo resultar em efeitos de feminização ou masculinização do organismo (Ghiselli & Jardim, 2007). O fenômeno da feminização, particularmente, vem sendo cada vez mais reportado em populações de peixes de vários ambientes marinhos e dulcícolas por todo o planeta e ocorre quando os compostos estrogênicos desencadeiam respostas femininas em machos podendo limitar a capacidade reprodutiva destes organismos. (Roepke *et al.* 2005). Os estudos em que se aborda o efeito de hormônios naturais ou sintéticos em peixes vêm sendo desenvolvidos, como já visto, há décadas. Após um minucioso levantamento bibliográfico, é possível citar aqui algumas das espécies mais utilizadas em tais estudos. São elas: halibut (*Paralichthys olivaceus*), carpa (*Cyprinus carpio*), three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), peixe-zebra (*Danio rerio*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), fathead minnow (*Pimephales promelas*), roach (*Rutilus rutilus*), peixinho-dourado (*Carassius carassius*), medaka (*Oryzias latipes*) e killifish (*Fundulus heteroclitus*), dentre outros (Metcalf *et al.* 2010; Scholz & Klüver, 2009).

A técnica de induzir a feminização ou masculinização em estoques de aquicultura através da exposição a hormônios esteroides ou análogos sintéticos já é conhecida há décadas e tem sido bastante utilizada para fins comerciais. Sabe-se que o uso destes hormônios pode

maximizar o crescimento corpóreo em várias espécies de peixes cultivados (Devlin & Nagahama, 2002; Nagahama, 2000). No entanto, quando o fenômeno ocorre no ambiente de forma descontrolada, ele pode afetar a capacidade reprodutiva e gerar sérias conseqüências ecológicas. Segundo Leatherland (2010), as espécies de peixe que correm maiores riscos em nível de população são aquelas que possuem vida curta e estratégias reprodutivas que envolvem comportamentos sincronizados entre pares de macho e fêmea.

Alguns fatores podem influenciar o fenômeno da feminização em peixes, entre eles, a idade do indivíduo. Peixes em estágios iniciais de vida aparentam ser mais sensíveis, porém, vários estudos indicam que alterações também podem ser induzidas em animais que foram expostos a altas concentrações de estrogênios/androgênios (Leatherland, 2010). Jobling e Tyler (2003) afirmam que os casos mais severos de intersexualidade estão geralmente relacionados a longos períodos de exposição à poluição e, conseqüentemente, em animais de mais idade. Intersexualidades gonadais são consideradas normais em espécies de peixe que apresentam hermafroditismo por toda a vida ou em alguma fase dela. Contudo, são consideradas aberrações quando ocorrem na diferenciação gonadal de espécies gonocoristas (Leatherland, 2010; Yamazaki, 1983).

1.5. Biomarcadores de feminização

Os estudos de desregulação endócrina em peixes vêm sendo conduzidos fazendo-se uso de certos biomarcadores que se consolidaram e mostraram-se boas ferramentas para análises pontuais ou monitoramentos ao longo do tempo. Foi a partir dos esforços empregados em se desenvolver técnicas seguras, rápidas e eficientes de investigação acerca da interferência de contaminantes no equilíbrio endócrino que se estabeleceram estes indicadores. Aqui trataremos da detecção/quantificação de vitelogeninas, histopatologia de gônadas e índices

corporais uma vez que foram escolhidos como parâmetros analisados no presente trabalho.

Em organismos ovíparos, o grupo das fosfolipoglicoproteínas chamadas vitelogeninas (VTG) são precursoras do vitelo do ovo e são sintetizadas por fêmeas maduras em resposta a estrogênios endógenos (normalmente, o estradiol) (Cheek *et al.* 2001; Roubal *et al.* 2003; USEPA, 2003). Após a sua síntese, que ocorre no fígado, são transportadas pela corrente sanguínea até a incorporação nos ovócitos (ovário) onde desencadearão as reações para formação de vitelo (Roy *et al.* 2004). As vitelogeninas possuem papel crítico para o sucesso reprodutivo de espécies ovíparas, pois servirão de reserva energética durante todo o desenvolvimento embrionário (Roubal *et al.* 2003).

Os peixes em estágio juvenil e os machos possuem o gene para síntese de vitelogenina, porém na forma reprimida. Assim, no plasma sanguíneo de organismos machos e juvenis a proteína não deveria ser detectada, a não ser que tenham sido expostos a xenoestrogênios os quais são capazes de ativar estes genes. Por causa da associação específica entre a síntese de VTG e a estimulação por estrógenos, a análise da presença desta proteína no plasma de juvenis e machos tem sido utilizada em todo o mundo como um bom biomarcador para a avaliação da estrogenicidade de vários contaminantes em peixes (Cheek *et al.* 2001; Matozzo e Marin, 2008; Roubal *et al.* 2003; Roy *et al.* 2004; USEPA, 2003). Na Figura 5 (Tyler *et al.* 2008) é possível visualizar um esquema da vitelogênese em peixes estimulada tanto naturalmente quanto exogenamente.

Os mais comuns dentre os diferentes métodos disponíveis para detecção e/ou mensuração de VTG em peixes são o imunoenensaio ELISA (enzyme-linked immunosorbant assays), cromatografia GC-MS (cromatografia gasosa – espectrometria de massas), detecção por Western blotting ou por mRNA. A matriz biológica mais comumente utilizada em tais análises é o plasma sanguíneo, apesar de também se utilizar homogenatos do corpo inteiro no caso de animais muito pequenos (Cheek *et al.* 2001; Vázquez *et al.* 2009; USEPA, 2003). O

muco corpóreo também já foi validado para análise de VTG com sucesso e mostrou-se uma boa alternativa de coleta não invasiva (Vázquez *et al.* 2009).

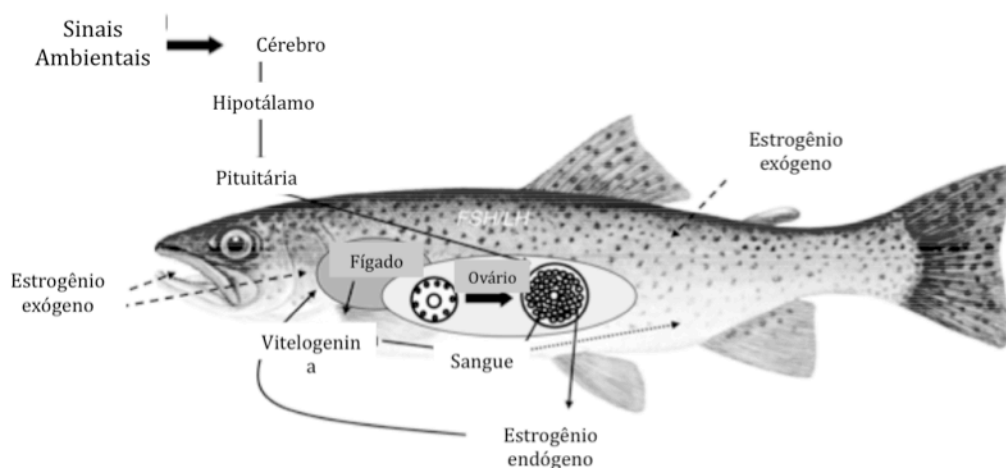


Figura 5. Representação esquemática da vitelogenese em peixes, onde a linha cheia representa a via normal de indução vitelogenina na fêmea e as linhas tracejadas mostram as vias de exposição a estrogênios exógenos. O estrogênio endógeno é produzido pelo ovário sob a estimulação dos hormônios folículo-estimulante e luteinizante (FSH / LH), passa para a circulação e induz a síntese de vitelogenina no fígado. A vitelogenina então passa para a circulação e é incorporada pelos oócitos em desenvolvimento e armazenadas, como vitelo, nos embriões. O estrogênio exógeno pode ser incorporado por via oral e/ou através da brânquia e/ou a superfície da pele. Em peixes machos expostos, a vitelogenina se acumula no plasma (Tyler *et al.* 2008).

As respostas obtidas com dosagem de VTG servem tanto para investigar se substâncias suspeitas têm, de fato, potencial estrogênico quanto para estabelecer “rankings” de estrogenicidade entre elas (Gimeno *et al.* 1998). E mais, geram dados que podem ser integrados com outras análises permitindo que se estabeleçam análises de risco de uma determinada substância ou ambiente.

As clássicas e bem consolidadas técnicas em histopatologia são ferramentas úteis na Ecotoxicologia e, mais especificamente, como biomarcadores em estudos de desregulação endócrina. Por meio da visualização microscópica de estruturas reprodutivas dos organismos é possível detectar sinais conclusivos de desordem endócrina que, geralmente, podem ser diretamente relacionados com exposição a hormônios estrogênicos, androgênicos, substâncias antagonistas ou mimetizantes (Leatherland, 2010).

Os compostos químicos com atividade hormonal são considerados causa principal da ocorrência fora das frequências normais de aberrações gonadais em peixes selvagens (Scholz & Klüver, 2009). Estas anomalias causadas no sistema reprodutivo de peixes por interferentes endócrinos são estudadas tendo diversas espécies como modelo (Bila & Dezotti, 2007). Defeitos histológicos associados a poluentes com ação endócrina descritos na literatura incluem: atresia de ovócitos em fêmeas; fibrose em testículos (Leatherland, 2010); vacuolização, redução do diâmetro dos túbulos seminíferos, atrofia do epitélio germinativo (Douxflis *et al.* 2007; Gimeno *et al.* 1998); presença de ovócitos em testículos (Figura 6) (Diniz *et al.* 2010; Geraudie *et al.* 2011) dentre outros. As análises histológicas podem contribuir enormemente para a avaliação da significância ecotoxicológica de outros biomarcadores (ex. bioquímicos) (van der Oost *et al.* 2003).

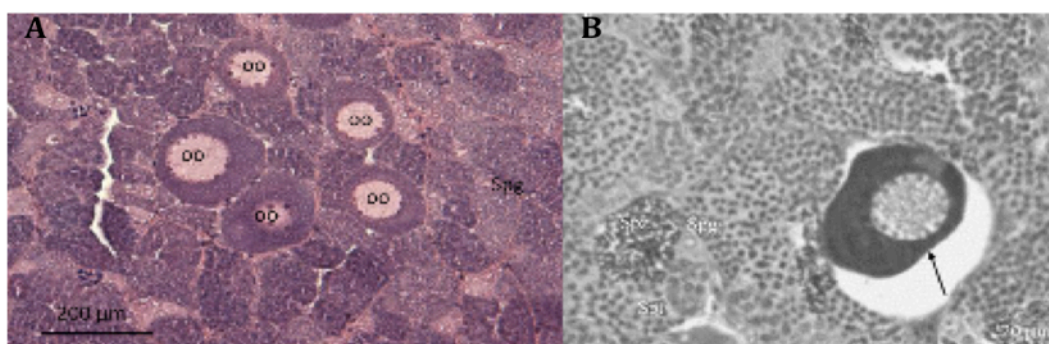


Figura 6. Em A: Fenótipo de intersex com a presença de ovócitos (oo) no tecido testicular preenchido com espermatogônias (Spg) do trabalho de Geraudie *et al.* (2011); Em B: Presença de *ovo-testis* com um grande ovócito localizado entre espermatozoides e espermatogônias (Diniz *et al.* 2010).

Associado às averiguações histológicas, o índice gonado-somático (IGS) é também bastante utilizado como biomarcador de exposição de organismos aquáticos a estrogênios ambientais e baseia-se na relação entre o peso das gônadas com relação ao peso do corpo (Carballo *et al.* 2005; Hirai *et al.* 2006; Panter *et al.* 2006). Alguns pesquisadores também utilizam o índice hepato-somático (IHS) encontrando (ou não) diferenças significativas da relação em animais de diferentes tratamentos (Christiansen *et al.* 1998; Diniz *et al.* 2005;

Diniz *et al.* 2010; Rasmussen & Korsgaard, 2004) ou pontos de coleta (Prado *et al.* 2011).

Além dos marcadores supracitados (tidos como principais), é comum encontrar outros tipos em avaliações de químicos e monitoramentos ambientais. A aromatase, por exemplo, é uma enzima pertencente à superfamília do citocromo P450 e tem sido escolhida como biomarcador para estudos de desregulação endócrina em peixes. Tem papel fundamental na conversão irreversível de hormônios androgênicos (ex. testosterona) em estrogênicos (ex. 17- β - estradiol) (Geraudie *et al.* 2011; Hinfrey *et al.* 2010). Isso significa que uma atividade exagerada da enzima pode resultar em efeitos estrogênicos (Cantonnet *et al.* 2011; Evans, 2007) e, por conta desta característica, passou a ser medida para fins de correlação com a estrogenicidade do meio ou de algum composto. É vasta a gama de autores que utilizaram a medição da atividade da aromatase com este intuito, dentre eles pode-se citar: Douxfils *et al.* (2007) e Hinfrey *et al.* (2010). Além da atividade da aromatase, pode-se citar a medição de oscilações nos níveis de hormônios esteróides (Geraudie *et al.* 2010; Solé *et al.* 2003a e 2003b); detecção imuno-histoquímica (Pinto *et al.* 2009; Stoker *et al.* 2008); inviabilidade dos gametas (Porte *et al.* 2006); sucesso na eclosão dos ovos (Panter *et al.* 2006); comportamento reprodutivo (Douxfils *et al.* 2007; Toft & Baatrup, 2001 e 2003); dentre outros.

A grosso modo, em se tratando de feminização em peixes, quando as alterações biológicas alcançam níveis tanto fisiológicos quanto morfológicos têm-se um indicativo de danos irreversíveis (van der Oost *et al.* 2003). Também por isso, é importante notar que os efeitos nefastos oriundos da exposição de peixes a contaminantes desreguladores endócrinos nem sempre podem ser acessados utilizando-se apenas um tipo de biomarcador. Qualquer proposta para um estudo ambientalmente relevante e robusto deve envolver um esforço integrativo de medições e análises para que os possíveis danos sejam detectados em diferentes níveis de organização biológica. Por isso, é sempre recomendado o uso de mais de um tipo de biomarcador em qualquer estudo.

1.6. *Status* dos estudos em desregulação endócrina no Brasil

A costa brasileira é ocupada por uma parcela significativa da população, pois, além da tendência mundial em se habitar faixas próximas ao litoral (SCBD, 2012), os acontecimentos históricos que envolvem a ocupação do nosso país favoreceu este fenômeno. De acordo com o censo demográfico realizado pelo IBGE em 2010, cerca de 25,58% da população brasileira ocupam a zona costeira e a maioria destas pessoas exerce atividades relacionadas principalmente à pesca, ao turismo ou exploração de combustíveis (Brasil, 2011). Diretamente atrelados a esta tendência de migração para grandes cidades litorâneas estão os problemas gerados pela poluição aquática, tanto de origem doméstica quanto industrial, sendo esta última devida, principalmente, ao crescimento desenfreado das demandas por bens de consumo.

Por já se saber que os esgotos domésticos consistem na principal fonte de compostos estrogênicos para o ambiente, a carência de instalações adequadas para sua coleta, tratamento e deposição na maioria das cidades da zona costeira brasileira torna-se ainda mais preocupante (Abessa *et al.* 2005). Apesar de todas as opções existentes atualmente para um tratamento adequado de águas residuárias domésticas e industriais, o que se nota no Brasil é uma realidade bastante diferente, pois, geralmente, os esgotos são lançados aos corpos hídricos receptores passando apenas por etapas preliminares e secundárias. Etapas estas que, geralmente, não são eficientes na retirada ou inativação de compostos desreguladores endócrinos dos efluentes (Bila & Dezotti, 2007). Há que se alertar que a situação pode ser ainda pior do que se estima ao levarmos em consideração a enorme quantidade de lançamentos clandestinos em corpos d'água espalhados por todo o país totalmente alheios a qualquer fiscalização ou acompanhamento dos órgãos competentes.

Em sua revisão sobre este tema, as pesquisadoras Bila e Dezotti, (2007) alertam

para o fato de que em meio às toneladas de substâncias lançadas anualmente no ambiente, uma quantidade considerável consiste em desreguladores endócrinos. Em termos de regulamentação, o Brasil ainda anda a passos lentos quando se trata destes compostos e mais especificamente aos problemas com hormônios esteróides no ambiente. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) lançou recentemente um apanhado com todas as resoluções vigentes publicadas entre setembro de 1984 e janeiro de 2012. Dentre as resoluções, a de nº 430, de 13 de maio de 2011 que complementa e altera a Resolução no 357/2005, dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes e não é feita nenhuma menção a qualquer tipo de monitoramento de hormônios esteróides sintéticos ou naturais (Brasil, 2012). Apesar de o parâmetro não ser plenamente legislável uma vez que não há limites seguros permissíveis, é mais que urgente a implementação de técnicas de detecção e tratamento que atenuem ou mesmo resolvam o problema o que já é realidade em muitos países da Europa e deveria ser tratada com mais cuidado por nossos governantes.

No que concerne à produção científica, o tema desregulação endócrina ainda é abordado de forma bastante incipiente no Brasil. Porém, há um número relativamente crescente de pesquisadores brasileiros realizando estudos com esta classe de compostos. Notadamente, tais pesquisadores encontram-se bastante concentrados na região sudeste e sul do Brasil.

Em 2007 foram publicadas (em português) duas revisões abordando o tema, sob autoria de Ghiselli e Jardim (2007) e Bila e Dezotti (2007). Na área do saneamento ambiental e tratamento de resíduos, têm-se como exemplo os estudos acerca de remoção de estrogênios e xenoestrogênios realizados por Bila *et al.* (2007) e Maniero *et al.* (2008) utilizando ozonização e Pereira *et al.* (2011) que lançaram mão de processos de desinfecção na remoção dos compostos. Ainda citando trabalhos ligados ao tratamento de efluentes, Esplugas *et al.* (2007) revisaram a ozonização e técnicas avançadas de oxidação para remover desreguladores endócrinos, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal em resíduos aquáticos.

Investigações sobre a ocorrência de estrogênios no ambiente foram realizadas por Kuster *et al.* (2009) em águas superficiais do Rio de Janeiro, por Sodré *et al.* (2010) no Rio Atibaia (São Paulo) e Froehner *et al.* (2012) em sedimentos de mangues da Bahia, Paraná e Santa Catarina. Além destas detecções ambientais, Verbinnen e Nunes (2010) determinaram recentemente a quantidade de hormônios em água potável.

A escassez de trabalhos a respeito deste tipo de contaminação se agrava quando se trata de dados sobre os efeitos tóxicos na biota e, mais especificamente, de efeitos endócrinos em peixes. Prado *et al.* (2011) utilizaram uma série de biomarcadores para analisar indicadores de saúde e reprodução no lambari *Astyanax fasciatus* coletados no reservatório de Furnas, em Minas Gerais. Foram encontrados sinais de feminização e intersex em peixes coletados em pontos a jusante das descargas municipais, o que evidencia contaminação por xenoestrogênios. Os autores chamam atenção para a evidência de desregulação endócrina em peixes de Furnas e possível risco para a saúde humana e da fauna.

No trabalho de Moura Costa *et al.* (2010), peixes machos da espécie *Rhamdia quelen* tiveram feminização induzida por 17- β -estradiol para que fossem conhecidos os efeitos fisiológicos dose-dependentes da exposição. Além de biomarcadores bioquímicos (VTG, SOD, CAT, GST, GPx, GSH), foram verificados danos de DNA e anomalias histológicas. Alguns dos resultados obtidos pelos autores foram: aumento na expressão de vitelogenina em machos expostos ao hormônio feminino e danos no fígado.

Possivelmente, um dos maiores desafios encontrados pelos pesquisadores dispostos a desbravar o campo da feminização de peixes no Brasil é a dificuldade em se comparar os resultados encontrados nos nossos modelos biológicos tropicais com a vasta gama de organismos de locais temperados que já vêm sendo estudados há décadas. Atualmente, várias espécies de peixes estão validadas como modelos biológicos para o estudo de desregulação endócrina em muitos países, tendo protocolos de procedimentos e respostas bem

estabelecidos e consolidados (OECD, 1999), mas a maioria destas espécies não é encontrada aqui no Brasil e principalmente nas águas quentes da Região Nordeste. Costa (2006) alerta para a necessidade de se gerar dados com espécies nativas que possam auxiliar nas discussões para tomada de decisões do país.

Sendo assim, sabendo-se da importância que o grupo dos peixes representa nas diversas teias tróficas, inclusive servindo de alimento para o homem, é imperativo o esforço em se caracterizar estes efeitos nos peixes tropicais para que sejam utilizados como modelo em monitoramentos ambientais.

Baseado no exposto, o baiacu *S. testudineus* foi escolhido como modelo neste trabalho para que suas respostas a parâmetros comumente utilizados em estudos de desregulação endócrina sejam caracterizadas. Trata-se de um esforço em fase preliminar com o intento maior de que, futuramente, se possa utilizá-lo como espécie sentinela e empregá-lo no monitoramento da poluição por desreguladores endócrinos em estuários brasileiros.

2. OBJETIVOS

Em virtude da carência no Brasil (principalmente no Nordeste) de estudos ligados à temática da desregulação endócrina, aliada à necessidade de padronização de modelos que possibilitem o início deste tipo de estudo em nossos corpos d'água, esta etapa do trabalho teve como principais objetivos:

***Objetivo 1:** Avaliar a resposta do baiacu *Sphoeroides testudineus* à exposição ao hormônio feminino 17 β -Estradiol (E2) em condições laboratoriais por meio de dados biométricos, dos biomarcadores VTG, IGS, IHS e histopatologia de gônadas e fígado;

***Objetivo 2:** Avaliação/validação da espécie para estudos de desregulação endócrina posteriores;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos peixes (organismo-teste)

Em um período de nove meses compreendido entre o mês de maio de 2011 e fevereiro de 2012 foram coletados todos os exemplares de *Sphoeroides testudineus* utilizados nesta etapa experimental do trabalho, perfazendo um total de 54 peixes. Este trabalho foi realizado com autorização prévia do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), por meio do SISBIO (Autorização de número: 24449-1).

3.1.1. Ponto de coleta e variáveis físico-químicas

Todos os espécimes foram coletados num mesmo ponto do estuário do Rio Pacoti, localizado no estado do Ceará, Brasil. O ponto está localizado na foz do rio, próximo à Praia da Abreulândia sob as seguintes coordenadas: 3°49'04,51"S; 38°24'35,54"O (Figura 7).

As determinações físico-químicas básicas na água do estuário foram feitas no ponto de coleta por 3 dias de amostragem, em conjunto com outro trabalho do grupo e destes foi calculada uma média sendo: oxigênio dissolvido de 7,02mg/L; pH 7,87; temperatura 28,8°C e salinidade 36.

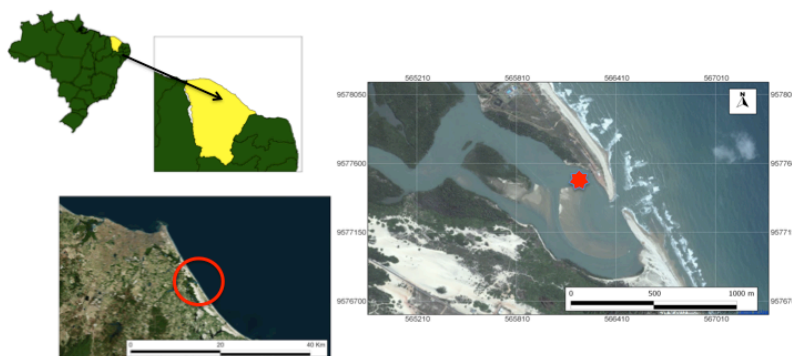


Figura 7. Ponto de coleta no estuário do Rio Pacoti (foz 3 ° 49 '04,51 "S; 38 ° 24' 35,54"); Datum: WGS 84 – Fonte: Google Earth TM.

3.1.2. Captura e transporte

Os animais foram coletados com uma tarrafa comum de pesca artesanal, de forma aleatória, ou seja, os animais não foram escolhidos quanto ao tamanho ou aspecto. Uma vez identificados como sendo da espécie, logo eram transferidos para caixas térmicas contendo água do próprio estuário e mantidos sob constante aeração. Foi garantida a não ultrapassagem de uma densidade máxima de 25 peixes por caixa sendo, assim, transportados até o laboratório cuidadosamente com o mínimo de perturbações possível. Ilustrações relacionadas à coleta podem ser visualizadas na Figura 8.

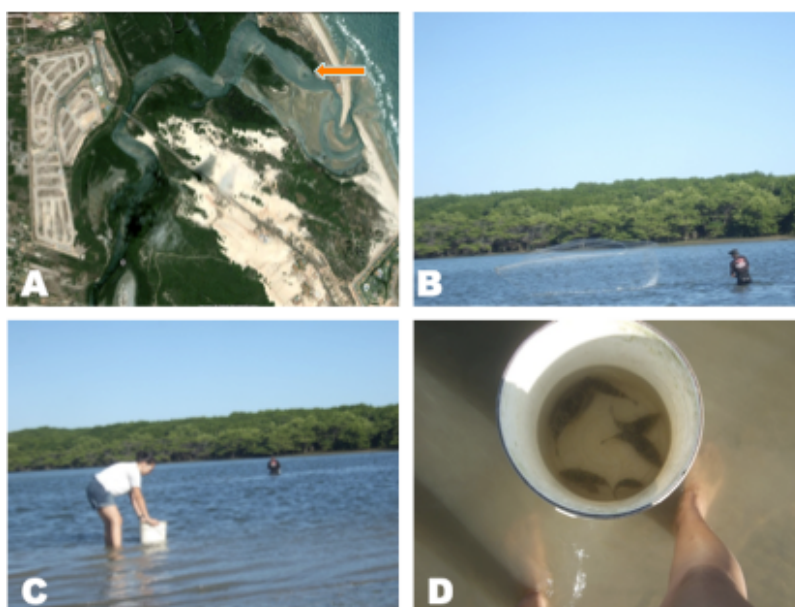


Figura 8. Coleta dos espécimes de *Sphaeroides testudineus* no estuário do Rio Pacoti. (A): Ponto de coleta localizado à foz do rio; (B e C): coleta por meio de pesca artesanal utilizando-se tarrafa; (D): espécimes de baiacu recém coletados.

3.1.3. Aclimação

Após a chegada ao laboratório os animais foram individualmente distribuídos nos aquários de forma aleatória e aclimatados às condições de cativeiro ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo controlado de 12h/12h) por quatro dias antes do início do teste. Cada aquário foi abastecido com 4L de água do mar adicionada de água destilada (salinidade ajustada para 20)

e permaneceram continuamente sob aeração. O oxigênio dissolvido da água do mar utilizada foi mantido em média 6,07 mg/L e o pH manteve-se em média de 7,82. Os peixes foram alimentados com biomassa de *Artemia* sp. em dias alternados durante os quatro dias que precederam o teste e durante sua execução. Durante todo o período de experimento com hormônio feminino foram mantidas as mesmas condições de manutenção acima descritas.

3.2. Exposição ao 17- β Estradiol por via intraperitoneal

3.2.1. Substância e solução estoque

No teste semi-estático por via intraperitoneal foi preparada uma solução-estoque para cada concentração fazendo-se uso de 2 e 4mg de 17 β -Estradiol (E2) (Sigma-Aldrich) dissolvidos em 400 μ L de óleo de canola (Qualità). A solução foi submetida à sonicação por 10 min para a obtenção de maior grau de diluição sendo, em seguida, armazenada protegida da luz em temperatura ambiente.

3.2.2 Grupos experimentais

O desenho experimental consistiu em três grupos (18 peixes em cada um) sendo: controle negativo injetado apenas com o veículo (óleo de canola) e os dois grupos injetados com E2. As concentrações testadas foram: 5 e 10mg E2 Kg⁻¹ (peso corpóreo). Estas concentrações e o tempo de exposição foram escolhidos com base em estudos anteriores realizados com outras espécies (Moura Costa *et al.* 2010; Schwindt *et al.* 2007; Guerreiro *et al.* 2002) uma vez que não há dados disponíveis que envolvam E2 e *S. testudineus*. Para cada concentração foram testados dois tempos de exposição que foram 15 e 29 dias, tendo assim o total de 9 peixes por período.

3.2.3. Administração via intraperitoneal propriamente dita

Antes de qualquer manipulação, cada peixe foi anestesiado por imersão em óleo de cravo (Eugenol - Biodinâmica) diluído em metanol e água do mar (0,04%) durante 1 minuto, ou até percepção visual do estado de anestesia (Kirschbaum & Assunção, 2006). Os peixes foram anestesiados um a um, pesados e, em seguida, delicadamente injetados na sua cavidade peritoneal, utilizando-se seringas de 1mL, as quantidades do hormônio feminino calculadas na hora, de acordo com o peso corporal. Após a injeção os peixes foram colocados de volta em seus aquários para observação do tempo de retorno.

3.2.4. Condições do teste

Foram totalizados 29 dias de teste por exposição via intraperitoneal, sendo os animais mantidos em caixas plásticas contendo 4 litros de água nas mesmas condições já descritas na sessão 3.1.3 *Aclimatação*. Tratando-se de um teste de regime semi-estático, houve renovação total de água nos dias alternados aos da alimentação. De cada concentração, 9 peixes foram amostrados 15 dias depois da injeção (início do teste) e os 9 restantes foram injetados novamente com as mesmas doses e amostrados no último dia de teste (29 dias). O processamento dos peixes será descrito na sessão 3.3.

A Figura 9 traz fotografias do sistema de aquários e um resumo das condições de teste.



Figura 9. Resumo das condições do teste com estradiol (E2) por via intraperitoneal.

3.3. Processamento dos peixes

3.3.1. Anestesia

Como descrito em 3.2.3, antes do processamento propriamente dito cada peixe foi anestesiado por imersão em óleo de cravo (Eugenol - Biodinâmica) diluído em metanol e água do mar (0,04%). Os animais foram submetidos à eutanásia por overdose de anestesia de acordo com as normas de cuidados no tratamento de peixes descritas em Canadá (2005). Todo o procedimento seguiu princípios de ética e respeito com máximo esforço para aliviar a dor dos animais sacrificados.

3.3.2. Biometria

Uma vez assegurada a eficiência da eutanásia, os animais foram pesados em balança analítica (peso total corpóreo) e depois tiveram o comprimento padrão (do focinho à última vértebra) mensurado com um paquímetro.

O índice de condição (IC) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos foi obtido pela fórmula descrita por Mezin e Hale (2000), onde $IC = W/L^3$, onde W corresponde ao peso (g) x 100 e L ao comprimento (cm) elevado a 3ª potência.

3.3.3. Índices Biométricos

Os Índices Gonado-somático (IGS) e Hepato-somático (IHS) baseiam-se na relação em termos percentuais entre o peso do órgão (gônada ou fígado) e o peso total do organismo. Para a sua determinação foi usada a equação: (peso do órgão / peso total) x 100.

3.3.4. Coleta de sangue

Com auxílio de uma tesoura cirúrgica os peixes foram seccionados ventralmente com incisão a partir do orifício anal. As amostras de sangue foram coletadas por punção

cardíaca utilizando-se seringas hipodérmicas de 5mL lavadas com anticoagulante (heparina sódica salina) sendo, na seqüência, transferidas para microtubos mantidos em gelo. Os tubos contendo sangue foram centrifugados sob a força de 4000g durante 10 min a 4C. Após separação dos plasmas, foi adicionado individualmente aos mesmos o anti-proteolítico PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) sob a razão de 10µL para cada 1mL de plasma partindo da solução-estoque 10mM previamente preparada (0,0174g de PMSF em 10mL de etanol absoluto). Os microtubos contendo o plasma foram imediatamente armazenados a -70 ° até a análise de VTG.

3.3.5. Dissecção

O fígado e as gônadas foram retirados pela mesma secção ventral e pesados em balança analítica. Após a pesagem os órgãos foram imediatamente transferidos para solução de Bouin salino onde permaneceram durante 24 horas em temperatura ambiente (25°C) até serem transferidos para álcool 70% onde foram conservados até o início do procedimento histológico.

Nsa Figura 10 é mostrado um fluxograma das etapas do processamento dos animais utilizados neste estudo.

3.4. Processo e análise histológica

O procedimento histológico foi realizado baseando-se nos métodos descritos por Junqueira e Junqueira (1983) com pequenos ajustes de protocolo dos próprios laboratórios nos quais foi conduzida a etapa histológica do trabalho.



Figura 10. Representação do processamento dos peixes utilizados no experimento. Cada animal foi inicialmente anestesiado e sacrificado com posteriores medições biométricas e retirada de tecidos. O sangue foi imediatamente centrifugado e armazenado em freezer -70°C enquanto os órgãos destinados à histologia foram fixados.

3.4.1. Processamento histológico

As amostras de fígado e gônadas previamente fixados em líquido de Bouin e conservados em etanol a 70% foram acondicionadas em cassetes pré-codificados. Os cassetes foram inseridos no processador de tecidos PT 05 (LUPE TEC Tecnologia Aplicada) onde os tecidos passaram pelas etapas iniciais do processamento histológico, consistindo em: **desidratação** através de uma série de concentrações crescentes de etanol, 70%, 80%, 95% e 100%; **diafanização** ou clarificação em xilol; e **impregnação** em parafina liquefeita a 65°C .

Em um emblocador TEC 2800 (Hestion) os tecidos foram emblocados em parafina liquefeita para serem posteriormente cortados. Os cortes histológicos foram obtidos em um micrótomo rotativo RM2125RT (Leica) a $5\mu\text{m}$ de espessura, postos em banho maria para maior abertura dos tecidos e coletados em lâminas de vidro onde permaneceram secando por 24 h para melhor adesão dos tecidos à lâmina. Estes tecidos receberam coloração com

Hematoxilina-Eosina (HE) para possibilitar a visualização dos mesmos, então as lâminas foram montadas utilizando-se lamínulas e entelam (MERCK) para posterior visualização em microscópio óptico.

3.4.2. Visualização e documentação

A observação das secções histológicas foi feita por meio de microscopia de luz (Leica) enquanto a captação das imagens foi feita com câmera digital Power shot S50 (Canon) acoplada. Foi utilizado o programa Zoom browser EX para fotodocumentação das imagens.

3.4.3. Análise qualitativa das lâminas

Foi conduzida a análise histológica das gônadas tanto para fins de sexagem dos animais quanto para, em fêmeas maduras, determinar o estágio de maturação de acordo com Vazzoler, 1996. Além disso, foram realizadas avaliações comparativas para identificação de possíveis aberrações gonadais que podem estar relacionadas à desregulação endócrina. Estas avaliações foram guiadas por Carballo *et al.* (2005); Cheek *et al.* (2001); Diniz *et al.* (2005); Gimeno *et al.* (1998); Hashimoto *et al.* (2003); Jobling *et al.* (1998); Leino *et al.* (2005); Rasmussen & Korsgaard, (2004); Vázquez *et al.* (2009); além de outros.

O exame histológico também foi realizado no fígado e, para este fim, seguimos as classificações de condições normais e danos hepáticos de Morrison *et al.* (2006); Newman e Unger (2003); Oliveira *et al.* (2012). A situação das gônadas e do fígado dos animais do controle foi comparada à dos peixes tratados com estradiol a fim de avaliar os efeitos do hormônio na estrutura dos órgãos.

3.5. Detecção de VTG por *Western blotting*

A presença ou ausência de vitelogenina no plasma dos peixes foi verificada através do ensaio imunológico de Western Blotting adaptado do original descrito por Towbin *et al.* (1979). O método consiste em quatro passos definidos onde o produto final é a formação de bandas (ou não) de acordo com a proteína que se deseja verificar. Os quatro passos são: quantificação de proteínas totais; corrida de eletroforese (SDS-PAGE); eletrotransferência e imunodetecção.

Dada a indisponibilidade de um anticorpo comercial específico para o peixe estudado, optou-se por um do tipo policlonal (Abcam) com capacidade para reconhecer vitelogenina em 8 espécies diferentes de peixe: salmão (*Salmo salar*), truta (*Salmo trutta*), bacalhau (*Gadus morhua*), pregado (*Scophthalmus maximus*), solha (*Platichthys flesus*), bodião (*Ctenolabrus rupestris*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) e peixe-zebra (*Danio rerio*). Sendo assim, a detecção de vitelogenina de *Sphoeroides testudineus* pelo método de Western Blotting teve que passar por uma fase de testes e padronização. O anticorpo comercial foi satisfatório tendo reagido bem com a vitelogenina do baiacu.

3.5.1. *Quantificação de proteínas totais*

Como pré-requisito fundamental para a execução do ensaio de western blotting é preciso ter o conhecimento da quantidade de proteínas totais nas amostras. Neste trabalho seguiu-se o método descrito inicialmente por Lowry *et al.* (1951), porém com uma série de adaptações, uma vez que foi utilizado o kit DC *Protein Assay* (BioRad Laboratories) em microplacas de 96 cavidades. Para a calibração foi preparada uma curva padrão com concentrações crescentes de *bovine serum albumine* (BSA - Sigma) em solução salina que abrangeu de 0,2 a 2mg/mL (BSA/sol. salina). A própria solução salina foi usada como

"branco" da curva. A leitura das absorvâncias realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620nm.

A quantidade de proteínas foi obtida plotando-se os valores de absorvância na curva de BSA cujos valores da concentração de proteínas são conhecidos. Foi gerada uma curva a partir de regressão linear feita no programa Excel 2008 (versão 12.2), sendo os valores de absorvância substituídos na equação da curva para se identificar as concentrações de proteínas das amostras.

3.5.2. Eletroforese (SDS-PAGE)

As proteínas foram separadas com base no peso molecular por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (8%) descontínuo (Laemmli 1970, com adaptações), também conhecida como SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Foram montados os aparatos com capacidade para dois géis no sistema vertical (Amersham Biosciences, modelo miniVE) com posterior introdução do gel de resolução (8%) seguido do gel de concentração (5%) e tampão de corrida.

As amostras foram diluídas no tampão de amostra contendo *Blue Juice 5X* (Invitrogen). Teve-se o cuidado de mantê-las em gelo durante qualquer manipulação para reduzir ao máximo a degradação das proteínas. De posse dos valores de proteínas totais, foi calculado (também em Excel 2008, versão 12.2) o volume de amostra a ser inoculado para a corrida a fim de que todos os poços contivessem a mesma quantidade de proteína. Cada poço (linha) do gel de concentração foi carregado com o volume correspondente a 30µg de proteína com uma seringa de Hamilton. Em cada gel foi reservado um poço para inoculação de soro de camundongo que serviu como controle negativo. Para o controle positivo utilizou-se o plasma de outra espécie de peixe, o jundiá (*Rhamndia quelen*) previamente injetado com 17β-estradiol e cedido por Daniele Dietrich Moura Costa da Universidade Federal do Paraná.

Foram utilizados padrões de peso molecular para identificação do "tamanho" das proteínas (*Full-Range Rainbow Marker* 12 – 225 kDa; GE Healthcare e *Kaleidoscope Prestained Standards* 7 – 215 kDa ; BioRad). A corrida aconteceu em temperatura ambiente durante 2 horas sob voltagem de 100 V e amperagem 30 mA.

3.5.3. Eletrotransferência

Terminada a corrida, os géis foram retirados do aparato e postos em contato direto com membranas de PVDF (BioRad: poro de 0,2 µm) as quais possuem alta afinidade com proteínas para que as mesmas pudessem ser transferidas. Os géis e as membranas (previamente imersas em metanol) foram dispostos entre esponjas e papéis de filtro e banhadas em tampão próprio para transferência com aplicação de um campo elétrico pelo modo de imersão (Amershan Bioscience, blot module para miniVE). A transferência se deu a uma voltagem de 100 V e 300 mA por 2h a 4 °C (fonte elétrica Amershan Biosciences, modelo ES301).

3.5.4. Imunodeteção

Encerrada a transferência, as membranas contendo as proteínas transferidas do gel foram bloqueadas durante 1 h em uma solução 5% de NFDM (*non-fat dehydrated milk* - Molico, Nestlé) em TBS sob agitação constante. Após isto feito, realizou-se lavagem das membranas em TBS acrescido de tween (TBS-T) durante 10 min repetidos 3 vezes. A incubação das membranas com o anticorpo primário (1:2500) foi feita *overnight* com diluição do mesmo em solução 5% de BSA em TBS sob agitação constante.

No dia seguinte, após sucessivas lavagens com TBS-Tween (3 de 10 minutos), as membranas foram incubadas sob agitação durante 2 h com o anticorpo secundário (Anti-rabbit IgG, Cell Signaling) a 0,0375% diluído em TBS + NFDM. As membranas foram

submetidas a uma outra rodada de lavagens e, por fim, as bandas foram detectadas por uma reação colorimétrica resultante da exposição das membranas a uma solução de BCIP/NBT (Perkin Elmer). A reação aconteceu sem incidência direta de luz e foi interrompida por meio de banho em água destilada. As membranas foram, então, acondicionadas entre papéis secos e posteriormente escaneadas para documentação.

3.6. Análise dos dados

Os dados serão apresentados como média e desvio padrão, e foram trabalhados utilizando-se Excel 2008 and GraphPad Prism 4.0, tanto para análises como para criação de gráficos.

Para a avaliação da ocorrência de diferenças significativas, os valores obtidos nos diferentes tratamentos (controle, E2 5 mg/kg e E2 10 mg/kg) e duração do tratamento (15 e 29 dias) foram comparados por ANOVA com índice de significância de 5%. Para a averiguação de diferenças significativas entre 15 e 29 dias de tratamentos, foram comparados os valores obtidos num mesmo grupo experimental por t-student com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

O primeiro objetivo deste capítulo foi avaliar a resposta do baiacu *Sphoeroides testudineus* à exposição ao hormônio feminino 17 β -Estradiol (E2) em condições laboratoriais por meio de dados biométricos, dos biomarcadores IGS, IHS, histologia de gônadas e fígado e detecção de VTG plasmática.

4.1. Biometria

A biometria foi realizada a partir da medida do comprimento e do peso dos animais. Na figura 11 estão apresentados os valores médios de peso corpóreo de todos os peixes de acordo com a dose de estradiol e tempo de exposição obtidos ao final do experimento. Quando todos os grupos foram comparados por ANOVA, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$). Entretanto, observamos que o peso dos animais tratados durante 29 dias foi sempre menor que dos peixes tratados por 15 dias, e que essa diferença foi significativa para o grupo controle quando comparamos os dois tempos de tratamento (controle 15 dias e controle 29 dias) por t-student ($p < 0,05$). Deste modo, toda a análise foi feita entre grupos controle e tratados (5 e 10mg E2 Kg⁻¹) de maneira independente para cada tempo de exposição. Ainda assim, não observamos diferença no peso após exposição ao estradiol independente da duração da exposição.

Com relação ao comprimento padrão, também não foram observadas diferenças significativas quando da comparação de todos os grupos ou dentro dos diferentes tempos de tratamento ($p > 0,05$) (Figura 12). Sendo assim, não detectou-se nenhum efeito do estradiol nos animais sujeitos às concentrações e tempo de exposição utilizados.

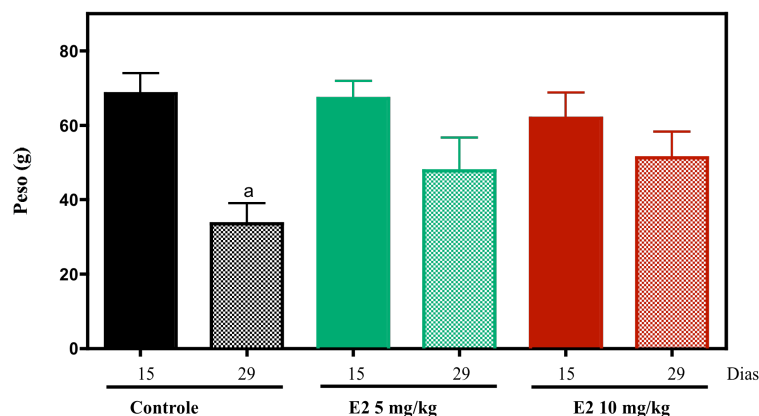


Figura 11. Valores médios obtidos da mensuração do peso corpóreo de *S. testudineus* de acordo com a dose de estradiol e tempo de exposição. a, $p < 0,05$, t-student comparando a duração do tratamento entre os grupos de um mesmo tratamento.

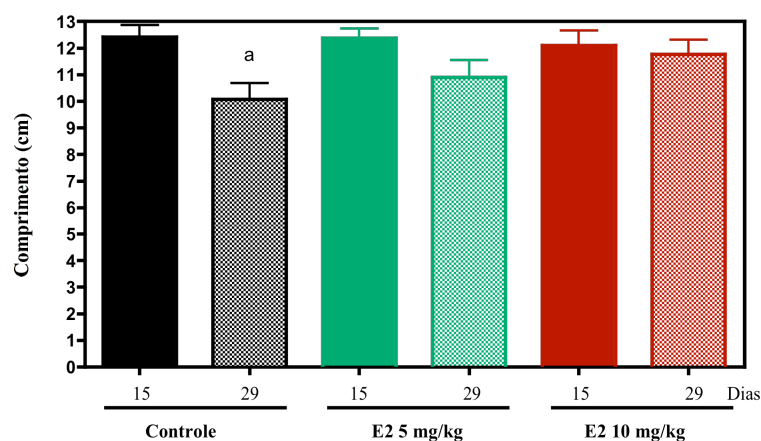


Figura 12. Valores médios obtidos da mensuração do comprimento padrão de *S. testudineus* de acordo com a dose de estradiol e tempo de exposição. a, $p < 0,05$, t-student comparando a duração do tratamento entre os grupos de um mesmo tratamento.

Nas comparações par a par, apenas o grupo controle 29 dias foi diferente do grupo controle 15 dias, sugerindo mais uma vez que o crescimento dos animais foi comprometido pelo método utilizado. No apêndice 1 são mostrados os valores de peso para todos os animais no início e no final do experimento.

Muitos autores utilizam a relação entre as medidas de peso corpóreo e comprimento para estabelecer o índice de condição, um tipo de parâmetro que está relacionado à saúde do organismo. A figura 13 mostra o índice de condição nos diferentes grupos experimentais para os dois tempos de exposição utilizados. Quando todos os grupos foram comparados por ANOVA, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$). Entretanto, observamos diferença significativa para o grupo controle quando comparamos os dois tempos de tratamento (controle 15 dias e controle 29 dias) por t-student ($p < 0,05$). Deste modo, toda a análise foi feita entre grupos controle e tratados (5 e 10mg E2 Kg⁻¹) de maneira independente para cada tempo de exposição. Ainda assim, não observamos diferença após exposição ao estradiol independente da duração da exposição.

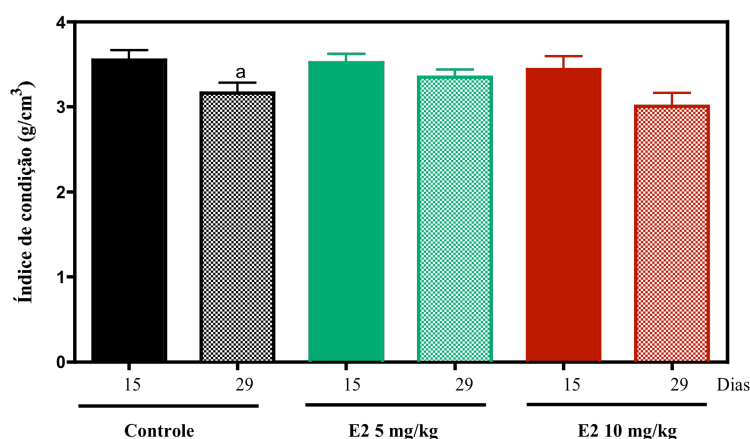


Figura 13. Valores médios obtidos do índice de condição de *S. testudineus* de acordo com a dose de estradiol e tempo de exposição. a, $p < 0,05$, t-student comparando a duração do tratamento entre os grupos de um mesmo tratamento.

4.2. Avaliação de efeito nas gônadas

4.2.1. Índice gônado-somático (IGS)

O IGS é obtido pela relação do peso da (gônadas / peso corpóreo) x 100, e os valores de IGS obtidos nos diferentes grupos está mostrado na figura 14. Não ocorreram

diferenças significativas quando comparamos todos os grupos ($p > 0,05$), ou os grupos de cada tempo de exposição (15 ou 29 dias) isoladamente ($p > 0,05$). É válido notar a grande variabilidade apresentada (dados mostrados no apêndice 2), ressaltando a influência do estado de maturação no peso da gônada e, conseqüentemente, no cálculo do índice gonado-somático. Apesar de não existirem diferenças significativas, há uma clara tendência de aumento do IGS com o aumento da concentração de hormônio após 29 dias de tratamento.

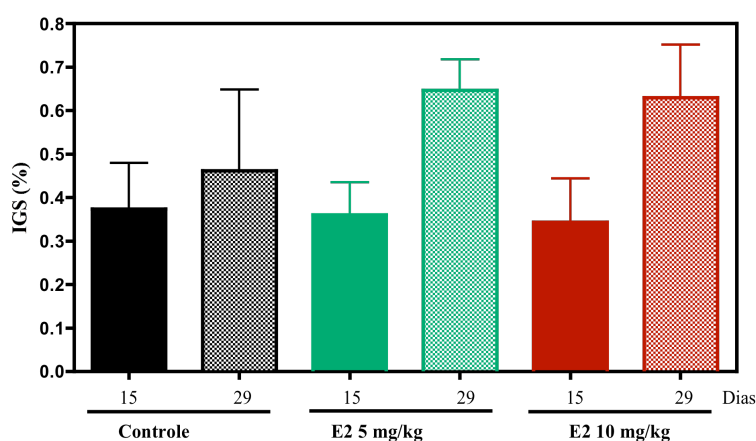


Figura 14. Valores médios do índice gonado-somático de *S. testudineus* de acordo com a dose de estradiol e tempo de exposição.

4.2.2. Análise histológica das gônadas

Na ausência de dimorfismo sexual em *S. testudineus* optou-se pela histologia das gônadas para a sexagem dos indivíduos além da avaliação de possíveis danos causados pelo hormônio feminino empregado no experimento.

Macroscopicamente, as gônadas de ambos os gêneros apresentaram aparência pareada tendo cada porção um aspecto cilíndrico. Constatou-se a presença de 20 fêmeas em todo o experimento. Com exceção de uma fêmea, todas as outras apresentaram ovócitos pre-vitelogênicos na maioria pertencentes à fase II de maturação gonadal de acordo com a classificação de Vazzoler (1996). Neste estágio, o ovário é cercado por uma parede delgada e

estendem-se a partir deste as chamadas dobras ou lamelas ovígeras, que contém os ovócitos, estes formando o epitélio germinativo. As células germinativas, durante a primeira fase de desenvolvimento, são chamadas oogônias e encontram-se na superfície das lamelas. As oogônias são arredondadas com núcleo proeminente contendo um nucléolo e pequena quantidade de citoplasma delgado eosinofílico circundando o núcleo basofílico. As oogônias ampliam-se e tornam-se oócitos primários, ou ovócito previtelogenico. Apenas uma fêmea apresentou ovário maduro apresentando lamelas preenchidas com ovócitos vitelogênicos em fase III. Segundo Vazzoler (1996), neste estágio de desenvolvimento o ovócito é delimitado pela membrana vitelínica e mais a camada de células foliculares formando o chamado *fóliculo ovocitário*, unidade fundamental do ovário (Figura 15).

Randomicamente distribuídos entre os tratamentos do teste, 10 machos foram identificados por histologia. Os testículos apresentaram-se formando túbulos seminíferos preenchidos com células germinativas: espermatogônias (esg), espermatócitos (esc), espermatídes (espd) e espermatozóides (espz) (Figura 16). Estas células são esféricas e formam grupos.

Além de machos e fêmeas, 23 animais cujas gônadas não se encontravam suficientemente diferenciadas para que pudessem ser classificados foram denominados indiferenciados (Figura 17).

Em nenhum espécime de nenhum dos tratamentos foram encontradas lesões ou anormalidades nas gônadas em nível microscópico. Todas as estruturas encontraram-se dentro dos padrões normais descritos para peixes teleósteos.

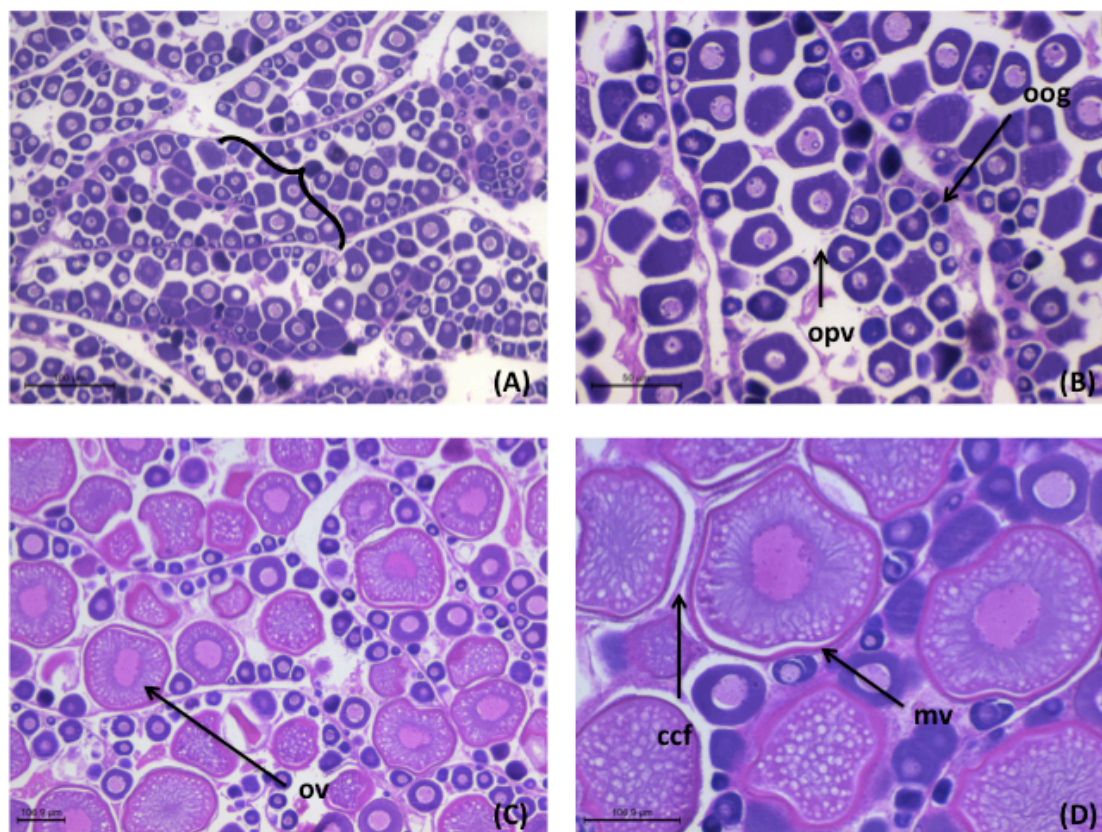


Figura 15. Cortes transversais de gônadas femininas de *Spherooides testudineus*. (A): secção de ovário com destaque para as lamelas ovíferas (l) (10x); (B) porção ampliada mostrando oogônias (oog) e ovócitos pre-vitelogênicos (opv) (20x); (C) corte de ovário maduro com lamelas preenchidas com ovócitos vitelogênicos (ov) (10x) e (D) detalhe dos ovócitos vitelogênicos com evidência na membrana vitelínica (mv) e camada de células foliculares (ccf) (20x).

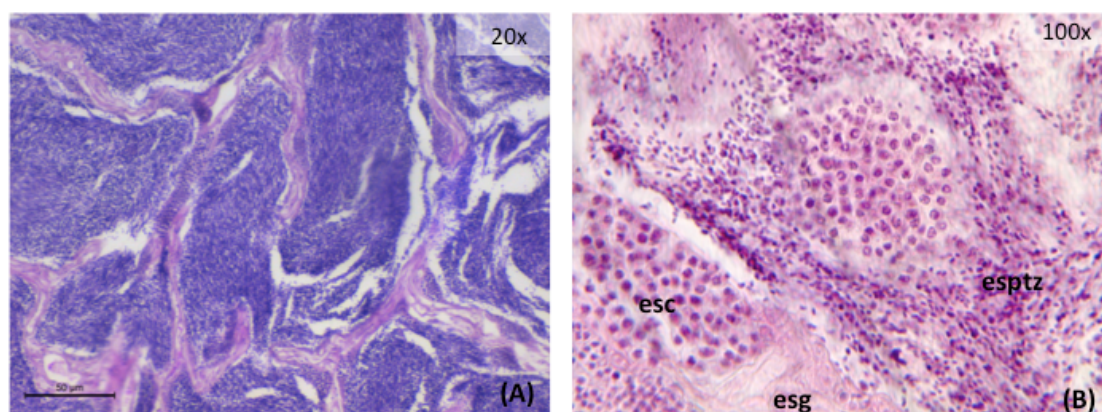


Figura 16. Cortes transversais de gônadas masculinas de *Spherooides testudineus*. (A): visão geral do testículo com destaque para grande número de espermatozoides (nos tons mais fortes de roxo) (20x); (B) porção ampliada mostrando espermatogônias (esg), espermatócitos (esc) e espermatozoides (esptz) (100x).

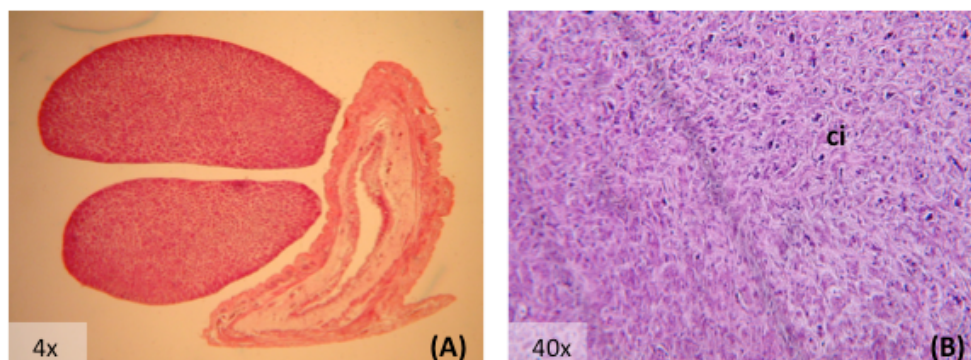


Figura 17. Cortes transversais de gônadas de exemplares juvenis de *Spherooides testudineus*. (A): visão geral da gônada indiferenciada (4x); (B) porção ampliada em que se evidenciam as células ainda indifenciadas (ci) (40x).

4.3. Avaliação de efeitos hepáticos

4.3.1. Índice hepato-somático (IHS)

O IHS é obtido pela relação do (peso do fígado / peso corpóreo) x 100, e os valores de IHS obtidos nos diferentes grupos está mostrado na figura 18. Não ocorreram diferenças significativas quando comparamos todos os grupos ($p > 0,05$), ou os grupos de cada tempo de exposição (15 ou 29 dias) isoladamente ($p > 0,05$). Vale ressaltar que no grupo controle 29 dias, o IHS foi estatisticamente menor que no grupo controle 15 dias (t-student, $p < 0,05$), provavelmente devido às alterações de crescimento observadas.

4.3.2. Análise histológica do fígado

As amostras de fígado examinadas por microscopia de luz revelaram, em geral, parênquima hepático de aparência normal com a presença do tecido pancreático e vasos sanguíneos dispersos entre os hepatócitos. Diferentes níveis de vacuolização citoplasmática foram observados em algumas amostras, desde moderadas até vacuolização intensa (Figura 19). Associa-se o processo de vacuolização a reservas lipídicas no tecido hepático, caracterizadas principalmente pela falta de coloração com hematoxilina/eosina.

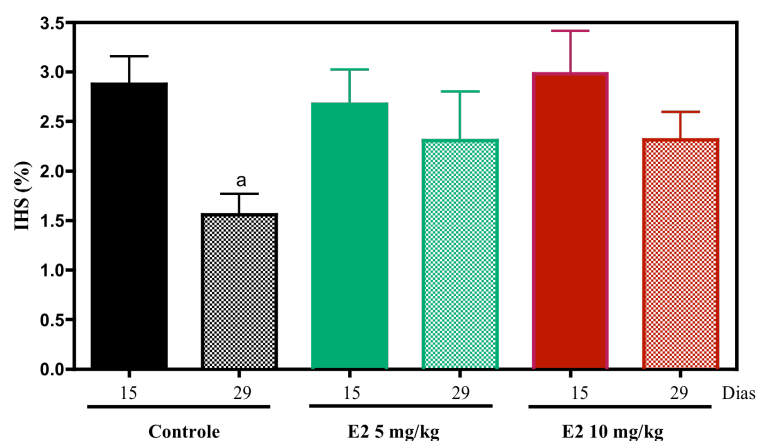


Figura 18. Valores médios do índice hepato-somático de *S. testudineus* de acordo com a dose de estradiol e tempo de exposição. A = diferença significativa ($p < 0,05$) t-student comparando a duração do tratamento entre os grupos de um mesmo tratamento.

Além de vacuolização, outras alterações foram encontradas, como presença de parasitas e áreas de necrose (Figura 20). As relações entre os danos de fígado, concentrações de estradiol e tempos de exposição encontram-se sumarizadas na tabela 3.

Tabela 3. Relação entre os danos de fígado, concentrações de estradiol e tempos de exposição. Sendo o símbolo - a representação de ausência e os números e letras entre () representam o n de peixes onde as alterações foram encontradas seguido do gênero: fêmea (F), macho (M) e indiferenciado (I).

ALTERAÇÃO OBSERVADA	Controle		5 mg/kg		10 mg/kg	
	15 dias	29 dias	15 dias	29 dias	15 dias	29 dias
Vacuolização intensa	(3M)	-	(2F) (3M) (1I)	(1F) (2I)	(1F) (3M) (3I)	(1F) (1M) (1I)
Presença de parasitas	(1M)	(3I)	-	(2F)	(1I)	-
Áreas de necrose	-	-	(1F) (1I)	(1F) (1I)	(1I)	(1F)

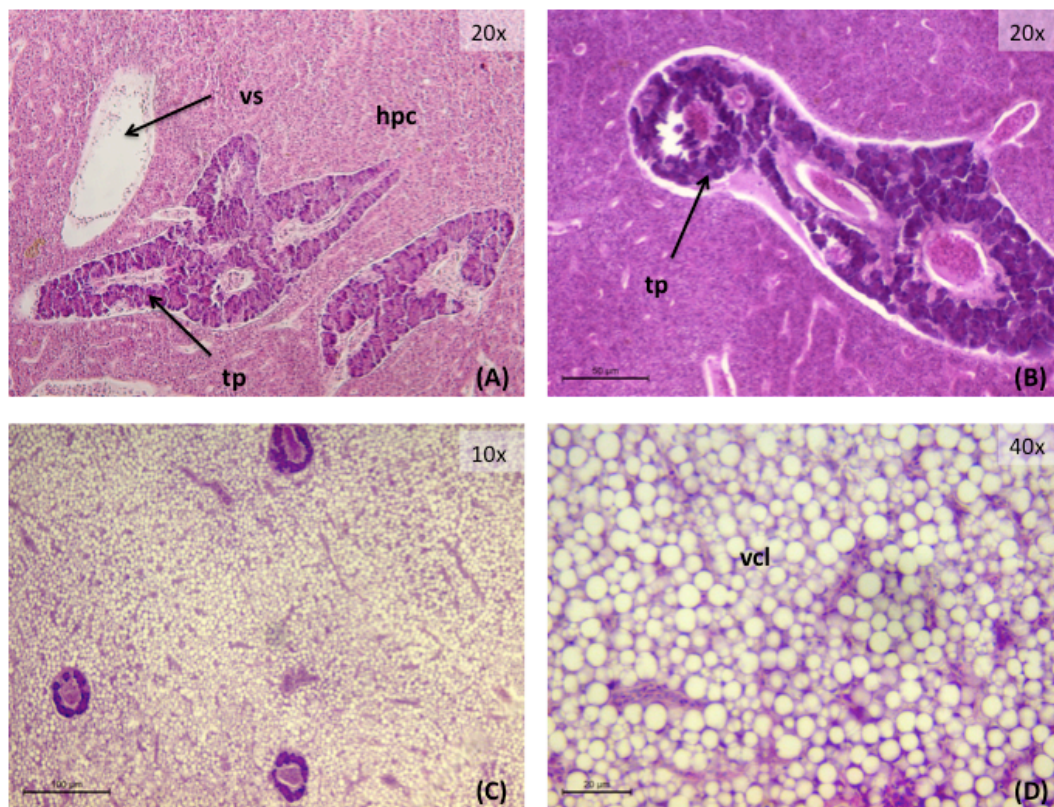


Figura 19. Secções transversais de fígado do baiacu *Sphoeroides testudineus*. (A) e (B): Aparência normal do tecido hepático com presença de porções de tecido pancreático (tp) e vasos sanguíneos (vs) entre os hepatócitos (hpc) (20x); (C) visão geral de fígado com intenso grau de vacuolização citoplasmática (20x); (D): vacúolos no detalhe (vcl)(40x).

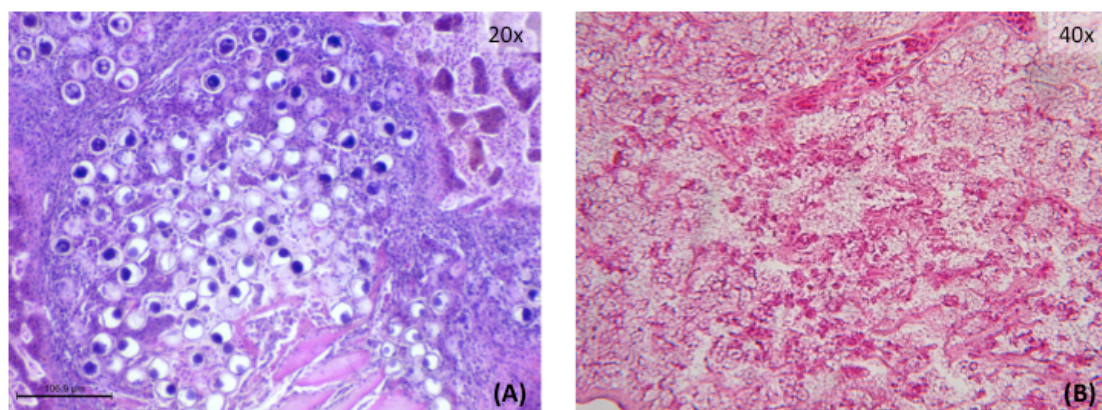


Figura 20. Secções transversais de fígado do baiacu *Sphoeroides testudineus*. (A): Foco de parasitas (20x); (B): Área de necrose (40x).

4.4. Detecção de vitelogenina (VTG)

A análise da presença de vitelogenina no plasma dos animais foi feita pela técnica de *western blot*, que consistiu resumidamente na eletroforese da mistura de proteínas seguida da detecção por uso de anticorpo específico para a proteína de interesse e revelação por uso de anticorpo secundário ligado à fosfatase alcalina. Feita a revelação das membranas, houve formação de bandas duplas fortes em uma região onde se localizam proteínas de peso molecular de aproximadamente 270 kDa. Na Figura 21 pode ser observado um exemplo de membrana ilustrativa onde as bandas foram reveladas após ensaio de WB.

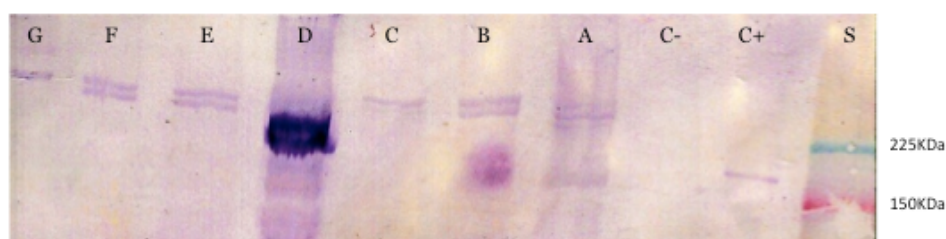


Figura 21. Exemplo de revelação em membrana de western blotting. S: padrão de peso molecular; C+: controle positivo com plasma de fêmea de *Rhamndia quelen* em vitelogênese; C-: controle negativo com soro de camundongo; A: fêmea (5 mg/Kg– 29 dias); B: indiferenciado (10 mg/Kg– 29 dias); C: macho (controle – 15 dias); D: fêmea (5 mg/Kg – 15 dias); E: macho (10 mg/Kg – 15 dias); F: fêmea (controle – 29 dias); G: indiferenciado (controle – 29 dias). Os números com orientação vertical representam o peso molecular em quilodaltons (KDa).

A expressão de VTG foi detectada em machos maduros e juvenis tanto advindos da exposição ao estradiol quanto nos peixes do controle. O resultado total da detecção de vitelogenina de acordo com o gênero dos peixes, concentração de estradiol e tempo de exposição pode ser visualizado na Tabela 4. É importante mencionar que todas as fêmeas confirmadas pela histologia e avaliadas quanto à produção de VTG apresentaram banda correspondente, como esperado. Por outro lado, 6 dos 10 machos confirmados pela histologia apresentaram banda para VTG, independente do grupo experimental. Dentre 23 os animais com gônada indiferenciada, temos banda positiva para VTG em 16.

Tabela 4. Detecção de vitelogenina por formação de bandas de WB de acordo com o gênero dos peixes, concentração de estradiol e tempo de exposição. A marcação em vermelho indica a detecção "indevida" de vitelogenina que, em princípio, apenas deveria ser detectada em fêmeas. (X: não foi possível a realização de WB).

		Banda	Gênero			Banda	Gênero			Banda	Gênero
Controle	15 dias	Sim	Indiferenciado	5mg E2 Kg ⁻¹	15 dias	Sim	Indiferenciado	10mg E2 Kg ⁻¹	15 dias	Sim	Indiferenciado
		Não	Indiferenciado			Sim	Indiferenciado			Sim	Indiferenciado
		Sim	Macho			Sim	Fêmea			Sim	Macho
		Sim	Macho			Sim	Fêmea			Sim	Macho
		Sim	Macho			X	Macho			X	Indiferenciado
		Sim	Fêmea			Não	Indiferenciado			Sim	Indiferenciado
		Sim	Macho			Não	Macho			Sim	Fêmea
		Sim	Indiferenciado			Sim	Fêmea			Não	Macho
		Sim	Fêmea			Não	Macho			Sim	Fêmea
		Sim	Indiferenciado			Sim	Fêmea			Sim	Indiferenciado
		Sim	Indiferenciado			Sim	Fêmea			Sim	Indiferenciado
		Sim	Fêmea			Sim	Fêmea			Sim	Fêmea
		Sim	Indiferenciado			Sim	Fêmea			Não	Indiferenciado
		Sim	Indiferenciado			Sim	Fêmea			Sim	Fêmea
		Sim	Indiferenciado			Sim	Fêmea			Sim	Fêmea
Não	Indiferenciado	Sim	Indiferenciado	Sim	Fêmea						
	29 dias				29 dias				29 dias	Sim	Indiferenciado

5. DISCUSSÃO

A validação de uma espécie como organismo-modelo para estudos de feminização de campo passa necessariamente por uma etapa experimental em laboratório. Isso porque é preciso que se conheça e caracterize as respostas da espécie de forma induzida de acordo com a metodologia que se pretende utilizar para que depois as respostas encontradas em campo possam ser comparadas. Com este propósito, inúmeros grupos de pesquisa espalhados pelo mundo se valeram do hormônio feminino 17β -estradiol (E2) para desenvolver estas caracterizações. Quer seja utilizando E2 como controle positivo em experimentos (Christiansen *et al.* 1998; Coronado *et al.* 2008; Gimeno *et al.* 1998; Guerreiro *et al.* 2002), ou mesmo empregando-o com o fim de induzir machos a produzirem vitelogeninas para serem utilizadas nas pesquisas de purificação ou produção de anticorpos ou outras averiguações (Leonardi *et al.* 2009; Pait & Nelson, 2003; Roubal *et al.* 1997; Roy *et al.* 2004; Schwindt *et al.* 2007), ou simplesmente para validar uma nova metodologia/espécie (Hirai *et al.* 2006; Leino *et al.* 2005; Leonardi *et al.* 2009; Moncaut *et al.* 2003; Moura Costa *et al.* 2010; Toft & Baatrup, 2001; Zlabek *et al.* 2009).

O baiacu *Sphoeroides testudineus* foi escolhido como modelo neste trabalho para que suas respostas aos parâmetros comumente utilizados em estudos de desregulação endócrina fossem caracterizadas utilizando-se, para isso, o 17β -Estradiol. A intenção por detrás desta investigação preliminar foi a busca por uma espécie sentinela que pudesse ser empregada no monitoramento da poluição por desreguladores endócrinos em estuários brasileiros.

Como recomendado por Taylor *et al.* (1999), para estabelecer a responsividade de novos organismos sentinela aos desreguladores endócrinos é fundamental que se submeta a espécie candidata à exposição aos hormônios naturais em condições controladas de

laboratório utilizando biomarcadores já padronizados na investigação destas respostas. Zlabek *et al.* (2009) consideram esta etapa como essencial, por gerar dados valiosos sobre o efeito dos produtos químicos no *status* fisiológico do peixe. Chamam a atenção, ainda, para a escassez de estudos laboratoriais em condições controladas que validem os estudos de monitoramento com biomarcadores em áreas impactadas.

A começar a discussão dos resultados pela biometria, é importante que se diga que parâmetros como peso e comprimento não são biomarcadores específicos para desregulação endócrina e sim relacionados ao *status* geral de saúde. Contudo, tais medidas foram aqui incluídas por entendermos que, em se tratando de uma caracterização preliminar das respostas da espécie escolhida, o panorama de dados gerais relevantes e mensuráveis devem ser levados em consideração por serem importantes para a interpretação dos resultados. Segundo Ankley *et al.* (2009), estes indicadores gerais de saúde tanto em estudos experimentais como de campo atuam como biomarcadores de alta relevância ecológica.

Não houve diferença no peso corpóreo total nem no comprimento após exposição ao estradiol, independente da dose e da duração da exposição, e conseqüentemente o índice de condição também manteve-se inalterado. De acordo com alguns autores, a biometria não é um bom indicador dos efeitos de desreguladores endócrinos (Pait & Nelson, 2003; Solé *et al.*, 2003). Como pode ser visto no trabalho de Pait e Nelson (2003) de padronização da resposta do peixe *Fundulus heteroclitus* a desreguladores endócrinos como 17 β -estradiol, bifenol-A, 4-nonilfenol e 4-(*tert*-octil)-fenol, nenhum dos compostos alterou o índice de condição dos peixes tratados, mesmo após 32 dias de tratamento, quando outros parâmetros já encontravam-se bastante alterados. Por outro lado, em estudos ambientais é comum observar alterações do índice de condição que podem refletir desde a presença de contaminantes no ambiente como a própria disponibilidade de alimento (Prado *et al.* 2011; Sanchez *et al.* 2008a).

Apesar da biometria não ter variado na presença do hormônio, houve variação entre o início e final do experimento dentro de todos os grupos, principalmente no grupo controle, o que sugere que os animais não estavam bem aclimatados à condição experimental. Salvo por algumas exceções, o peso dos animais tratados por 29 dias foi sempre menor que dos peixes tratados por 15 dias (apêndice 1). A falta de diversificação na dieta (baseada apenas em biomassa de *Artemia* sp.) e o regime de confinamento, além da manipulação para troca de água e anestesia na reaplicação do hormônio e do veículo podem ter sido os responsáveis por este quadro.

Em sua investigação de efeitos bioquímicos após a exposição de *S. testudineus* a hidrocarbonetos, Ribeiro (2007) concluiu que estes animais adaptam-se facilmente a condições laboratoriais sendo, desta forma, apropriados para ensaios com biomarcadores bioquímicos e histopatológicos. A autora trabalhou com peixes de comprimento e peso médios semelhantes ao deste trabalho numa proporção de 10 peixes para cada 75L de água, ou seja, uma quantidade quase duas vezes maior de água. Além disso, seus peixes puderam ser alimentados uma vez ao dia com camarões frescos num período de exposição bem menor: 7 dias. Estes dados evidenciam a necessidade de ajuste no modelo experimental por nós escolhido com diminuição do período de exposição.

Com relação ao efeito do hormônio feminino nas gônadas de peixes, este pode ser relacionado diretamente ao quadro geral de equilíbrio endócrino, tanto com relação à morfologia tecidual como na relação entre o peso da gônada e o peso corpóreo (IGS) (Carballo *et al.* 2005; Hirai *et al.* 2006; Panter *et al.* 2006). No presente trabalho, assim como aconteceu com o peso corpóreo, também não houve diferença significativa no IGS dos peixes injetados com E2 ou controle nem com relação aos tempos de exposição. Há que se ressaltar, entretanto, que apesar de não significativa houve uma tendência de aumento do IGS nos grupos tratados com E2 durante 29 dias.

Pait e Nelson (2003) também avaliaram o IGS, entre outros parâmetros, em *Fundulus heteroclitus* injetados com doses de 0,5; 1; 5 e 10 mg E2 Kg⁻¹ e também não constataram efeito significativo no índice, assim como Panter *et al.* (2006). Outros autores puderam observar uma redução do IGS com relação ao controle nos grupos expostos ao E2 por via hídrica utilizando outras espécies de peixes. Foram eles: Halm *et al.* (2002) com *Pimephales promelas* (32, 100 e 320 ng/L); Hirai *et al.* (2006) com *Oryzias latipes* (150 ng/L); Toft e Baatrup (2001) com *Poecilia reticulata* (2,8mL por dia/30L); e (Bjerselius *et al.* 2000).

Ainda com relação ao IGS, é importante salientar que houve grande variação dos dados (apêndice 2). Em seus estudos com *Sphoeroides annulatus*, no México, Sánchez-Cárdenas *et al.* (2007) também não encontraram uniformidade nos valores de IGS pois os mesmos apresentaram variação temporal significativa. Esta falta de uniformidade deve dificultar a análise de dados e mascarar possíveis efeitos em casos de mudanças sutis. É sabido que existe uma relação estreita entre maturação e aumento do peso dos ovários com relação ao peso do corpo em peixes teleósteos devido a mudanças sofridas durante o ciclo reprodutivo (Vazzoler, 1996). Possivelmente, este é o fato que explica a grande variabilidade e falta de correlação entre peso corpóreo e peso das gônadas em muitos trabalhos. Esta observação traz à luz a necessidade de se comparar o IGS de organismos com idade semelhante e coletados num mesmo período do ano bem como em animais submetidos a condições de manutenção e exposição em laboratório mais adequadas para que este biomarcador responda da melhor forma.

Dependendo do tipo de contaminante, os efeitos histopatológicos manifestados no tecido reprodutivo podem ir desde feminização parcial de testículos, com redução da capacidade espermatogênica, até danos mais severos como casos de intersex ou completa reversão sexual (Cheek *et al.* 2001). A prevalência elevada de peixes em condição de intersex

no ambiente pode ser considerada, por si só, um marcador facilmente reconhecível e definitivo de exposição dos peixes a estrogênios (Leatherland, 2010).

Neste trabalho não foram encontradas alterações histológicas nas gônadas de nenhum peixe do controle nem nos tratamentos. Foi o que aconteceu no trabalho de Rasmussen e Korsgaard (2004), no qual injeções de 1mg E2/kg em *Oryzias latipes* também não exerceram efeito nos testículos. De certo modo, este resultado foi inesperado pois as doses de estradiol utilizadas no experimento foram escolhidas tendo como base estudos de outros autores que obtiveram sucesso caracterizando efeitos feminizantes, inclusive encontrando anomalias de gônadas com doses até inferiores. Foi o caso de Moncaut e colaboradores (2003) que também usaram 10 mg E2 Kg⁻¹ no peixe *Cichlasoma dimerus* durante 11 dias e observaram danos severos nos testículos dos machos como desorganização tecidual e quebra prematura dos espermátócitos. Apesar de não serem características femininas, denotam preocupante grau de desregulação gonadal. Utilizando estradiol em fase aquosa Gimeno *et al.* (1998) obtiveram feminização com oogênese em todos os machos expostos, enquanto Zlábek *et al.* (2008) mostraram microfotografias de gônadas em situação de intersex em juvenis com a presença de ovócitos dispersos entre espermatogônias.

Os efeitos do estradiol não costumam ser evidentes em gônadas femininas, sendo estas pouco ou nada afetadas por ele. Assim sendo, no momento de avaliarmos criticamente esta ausência de efeito, há que se notar o reduzido número de machos aleatoriamente dispersos entre os grupos experimentais. Devemos refletir sobre o fato de na maior concentração de E2 utilizada (10 mg E2 Kg⁻¹), por exemplo, só termos podido contar com a análise dos testículos de 3 machos e, por isso, este resultado precisa ser visto com parcimônia. Será que se pudéssemos contar com um N maior de machos tratados veríamos estes efeitos? O baiacu estudado seria realmente muito resistente a mudanças morfológicas causadas por E2? Ou o fato de aparentemente estarem em contato com desreguladores endócrinos em seu

habitat pode ter conferido alguma resistência a tais substâncias? Experimentos similares contando com maiores concentrações de E2 e também com maior número de machos expostos serão necessários para que estas questões sejam elucidadas.

Alguns pesquisadores vêm utilizando o estudo de efeitos no fígado como forma de melhor integrar e compreender o quadro de desregulação endócrina em suas caracterizações (Christiansen *et al.* 1998; Diniz *et al.* 2005; Diniz *et al.* 2010; Moncaut *et al.* 2003; Moura Costa *et al.* 2010; Rasmussen & Korsgaard. 2004). O fígado é o órgão onde são produzidas proteínas importantes para a oogênese, inclusive as vitelogeninas, o que estabelece uma relação ainda mais próxima com o processo (Boleas *et al.* 2000).

Iniciando pelo índice hepato-somático (IHS), mais uma vez, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Resultados similares foram obtidos no estudo conduzido por Pait e Nelson (2003) onde, após exposições do peixe *Fundulus heteroclitus* ao estradiol em doses similares às deste estudo, também não puderam observar diferenças significativas na relação entre o peso do fígado e o corpóreo em nenhum tratamento. Moura Costa *et al.* (2010) também utilizaram 10mg E2 Kg⁻¹ injetados intraperitonealmente em espécimes de jundiá (*Rhamndia quelen*) e encontraram diferenças significativas entre machos expostos e organismos do controle com aumento do IHS. No trabalho de Rasmussen e Korsgaard (2004) também foi detectado aumento do índice em animais tratados com E2 sendo este aumento, também, diretamente correlacionado ao aumento de VTG.

O fígado dos vertebrados consiste em um tecido-alvo importante por concentrar tarefas essenciais para a manutenção da saúde do organismo como, por exemplo, mecanismos de resposta celular ao estresse químico. Assim, análises histopatológicas realizadas nele podem prover respostas bastante elucidativas fazendo da histopatologia um bom biomarcador de poluição ambiental (Ribeiro *et al.* 2012). Em nossas análises do tecido hepático de *S.*

testudineus, pode-se dizer que algumas diferenças, ainda que sutis, foram encontradas entre os tratamentos. É o caso da vacuolização celular dos hepatócitos. Ribeiro e colaboradores (2012) consideram a vacuolização celular um dano ou resposta celular geralmente associada a uma alteração no funcionamento metabólico com acúmulo de substâncias causado por estresse químico. Estes acúmulos podem perturbar os mecanismos normais da célula podendo levar à necrose ou apoptose da mesma. Entretanto, os autores afirmam que pode tratar-se de acúmulo de lipídios na presença de compostos químicos lipofílicos, como uma forma de defesa celular com a imobilização de tais componentes para evitar seus efeitos tóxicos. Esta afirmação está de acordo com os resultados de Moura Costa *et al.* (2010) que detectaram níveis severos de vacuolização no fígado de machos tratados com estradiol (10mg E2 Kg^{-1}). Ainda que em nosso trabalho tenham sido encontrados três casos de vacuolização em peixes do controle, é notória a tendência do aumento de casos com incremento da dose de estradiol (tabela 3), corroborando, assim, os trabalhos supracitados.

Ausentes nos peixes do controle, as áreas de necrose puderam ser observadas no tecido hepático de seis peixes distribuídos nos dois tratamentos. O processo necrótico não faz parte do metabolismo natural de células saudáveis e está associado à exposição a poluentes (Ribeiro *et al.* 2012). Gimeno *et al.* (1998) encontraram necrose nos testículos de machos tratados com E2 em seus tratamentos. Debruçando-se mais uma vez nos achados de Moura Costa *et al.* (2010) pode-se encontrar semelhanças com o presente trabalho no que diz respeito ao aparecimento de necrose em fígado de todos os grupos de animais expostos ao 17β -Estradiol sem ocorrência no controle. Os autores associam a necrose com estresse oxidativo.

Como explicado no levantamento bibliográfico que inicia o capítulo, a análise da presença de VTG no plasma de juvenis e machos tem sido indicada em todo o mundo como um biomarcador eficiente ao se investigar a estrogenicidade de contaminantes em peixes (Cheek *et al.* 2001; Matozzo & Marin 2008; Roubal *et al.* 2003; Roy *et al.* 2004; USEPA,

2003). A VTG é uma molécula instável e é facilmente afetada por enzimas proteolíticas (Roy *et al.* 2004). Além disso, quando isolada de diferentes espécies, a molécula pode apresentar variações consideráveis na conformação lipídica, nas glicosilações ou no grau de fosforilação, apesar de as propriedades gerais serem mantidas (Roubal *et al.* 2003). Por isso, a sensibilidade das análises de VTG em resposta à poluição por estrogênios deve ser específica para cada espécie assim como com relação aos compostos. Neste contexto, apesar de o ensaio quantitativo ELISA ser considerado o método mais sensível para quantificação de VTG (e o mais amplamente utilizado), a técnica de *western blotting* apresenta as vantagens de detectar diferentes tipos de VTG e poder ser realizada com diferentes matrizes biológicas (Cheek *et al.* 2001).

Na ausência de anticorpos específicos para as espécies nativas do Brasil, os anticorpos comerciais disponíveis são boas alternativas para uso (Moura Costa *et al.* 2010). O tamanho da proteína detectada em nosso trabalho pelo anticorpo policlonal anti-VTG comercial, cerca de 270 kDa, foi compatível com o de vitelogeninas descritas para outras espécies de peixes (Leonardi *et al.* 2009; Moura Costa *et al.* 2010; Okoumassoun *et al.* 2002; Roubal *et al.* 1997; Roy *et al.* 2004; Schwindt *et al.* 2007). Tais autores também se valeram da técnica de *western blotting* com o intuito de identificar vitelogenina em diferentes espécies de peixes. O reconhecimento das regiões que mantiveram-se conservadas entre diferentes espécies pelo anticorpo policlonal não específico para o baiacu fornece evidências de que a molécula por nós detectada deve realmente ser vitelogenina. Pode-se então dizer que o método utilizado tendo marcado adequadamente a vitelogenina plasmática de *S. testudineus* foi validado de forma eficaz, sendo o seu uso recomendado.

Nesta caracterização notou-se a formação de bandas duplas correspondentes à vitelogenina. Este padrão de marcação também foi encontrado por outros pesquisadores e pode ser explicado pelo fato de, como já afirmado, a VTG ser muito susceptível à ação

proteolítica que ocorre no plasma. Com isso, existe a possibilidade real de haver marcação não específica em diferentes epitopos polissacarídicos de VTG, uma vez que se trata de uma molécula instável (Costa, 2006; Moncaut *et al.* 2003; Solé *et al.* 2003; Vazquez *et al.* 2009).

Para além da validação do método de reconhecimento da proteína, neste trabalho tentou-se verificar a indução da vitelogenese sofrida por machos e juvenis em cativeiro quando expostos ao hormônio feminino estradiol. Dentre os animais avaliados, dez foram classificados como machos de acordo com a histologia das gônadas, entretanto, dentre estes, seis apresentaram expressão de vitelogenina, e quatro deles estavam no grupo controle. Em relação aos animais classificados como indiferenciados, 16 dentre os 23 presentes nessa categoria foram positivos para vitelogenina, sendo sete no grupo controle. Esse resultado sugere fortemente que os animais coletados no estuário do Rio Pacoti já estavam sob influência de desreguladores endócrinos no próprio ambiente antes de serem submetidos às doses de estradiol em laboratório, uma vez que 11 dos 16 animais do grupo controle mostraram-se positivos para vitelogenina, quando deveriam não expressar a proteína por tratarem-se de machos ou juvenis. De fato, de acordo com Pait e Nelson (2003), a vitelogenina é o biomarcador mais sensível à presença de desreguladores endócrinos no ambiente. Portanto, essa observação de que os peixes foram coletados em ambiente já contaminado nos remete a um ponto muito importante na análise dos resultados do presente trabalho, pois há presença de contaminantes desta natureza no ambiente de coleta dos animais que como já demonstrado por vários autores torna os peixes mais resistentes que aqueles provenientes de ambientes não impactados (Pait & Nelson, 2003). As evidências apontam para a presença de substâncias feminizantes no rio Pacoti, tendo em vista os resultados observados nos peixes coletados no local.

O estuário do Rio Pacoti tem sido utilizado como ambiente referência em alguns estudos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa (Davanso, 2010; Nillin, 2008), o que

motivou a opção por ele na hora de coletarmos os animais para este estudo. Entretanto, é sabido que, com o adensamento populacional na região metropolitana de Fortaleza, este corpo d'água vem sendo utilizado nos últimos anos como destino final para esgotos domésticos e industriais não tratados (Queiroz, 2005). A busca por locais preservados que sirvam como referência segue sendo um dos principais desafios, até mesmo um entrave nas pesquisas em Ecotoxicologia.

De forma geral, o que deve ser destacado sobre a problemática associada aos compostos emergentes desreguladores endócrinos e estrogênicos é que a inclusão de planos de monitoramento deles tanto no ambiente quanto em estações de tratamento é necessária e urgente. Além da quantificação dos compostos estrogênicos no ambiente, é preciso que se investiguem mais profundamente os efeitos deletérios acarretados na biota aquática através de testes de toxicidade agudos e crônicos além do uso de biomarcadores de contaminação endócrina eficientes para que danos no ambiente possam ser mitigados. Por isso, há necessidade em se gerar dados com espécies nativas que possam auxiliar nas discussões para tomada de decisões e conhecer as diferentes formas de poluição de nossos estuários.

6. CONCLUSÕES

A avaliação das respostas da espécie *S. testudineus* frente a exposição ao 17 β -estradiol em laboratório não mostrou boa correlação entre as alterações observadas e a dose e o tempo de exposição avaliados, com exceção da ocorrência de danos ao tecido hepático. Nesse caso foi observada ocorrência de vacuolização celular dos hepatócitos e áreas de necrose com leve tendência dose-resposta. Há que se ressaltar que foi detectada a vitelogenina no plasma da maioria dos peixes expostos, incluindo machos e juvenis do grupo controle. Esse resultado sugere fortemente a ocorrência de desreguladores endócrinos no Rio Pacoti e compromete a interpretação dos resultados aqui obtidos, uma vez que a exposição em ambiente natural aumenta a resistência dos animais a compostos dessa natureza. De toda sorte, pode-se concluir que a utilização desta espécie na avaliação de contaminação por desreguladores endócrinos é viável, uma vez que responde a análises com agentes feminizantes, mas o método de laboratório precisa ser otimizado para minimizar o estresse aos animais. Há que se ressaltar que deste estudo emerge a necessidade de avaliação ambiental do estuário do Rio Pacoti e que seu uso como ambiente referência seja abandonado.

CAPÍTULO II

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO
AQUÁTICA EM TECIDOS DE *SPHOEROIDES TESTUDINEUS* COLETADOS
NO ESTUÁRIO DO RIO PACOTI - CE**

RESUMO

O Rio Pacoti abastece diversos aquíferos e possui papel importante na subsistência de populações ribeirinhas e em outras atividades antrópicas no Ceará. Não obstante, este recurso hídrico vem sendo utilizado nos últimos anos como destino final para esgotos domésticos e industriais não tratados. Os biomarcadores de contaminação são definidos como alterações biológicas em nível molecular, celular ou fisiológico que expressam efeitos provocados por poluentes. Funcionam como ferramentas de alerta para que efeitos em níveis baixos de organização celular possam antecipar mudanças em níveis maiores de organização, com efeito preditivo. Somando-se a necessidade de avaliação ambiental do estuário do Rio Pacoti à carência de modelos padronizados para monitoramentos com biomarcadores, os objetivos foram: contribuir para o conhecimento da biologia de *S. testudineus* do Rio Pacoti (biometria, IHS, frequência sexual, estágios de maturação gonadal, IGS); avaliar a qualidade ambiental na região da foz do estuário pela análise dos biomarcadores associados aos mais diversos tipos de contaminação (detecção de VTG, histopatologia de fígado e gônadas, GST, EROD, GR, LPO, correlações); e avaliação/validação da espécie para monitoramentos com estes biomarcadores. Houve acentuada diferença na proporção sexual encontrada, sendo esta de um macho para cada 4,6 fêmeas. O peso total corpóreo apresentou grande variabilidade, com média de $45,07 \pm 32,48$ g, enquanto que o comprimento padrão foi mais homogêneo (média de $11,34 \pm 2,57$ centímetros). Os coeficientes de variação dos índices IGS e IHS foram de 82,50% e 54,37%, respectivamente. As correlações positivas entre o peso corporal total e peso gônadas ($R^2 = 0,6396$), ou peso do fígado ($R^2 = 0,6789$) podem ser consideradas fracas. O índice de condição foi o parâmetro que menos variou, apresentando média de 3,77 e coeficiente de variação de 14,12%. Todas as fêmeas coletadas apresentaram ovários contendo ovócitos pre-vitelogênicos na grande maioria pertencentes à fase II de maturação gonadal. Apenas dois machos foram coletados e identificados por histologia, além de 22 animais cujas gônadas não se encontravam suficientemente diferenciadas para que pudessem ser classificados e foram denominados indiferenciados. Na avaliação histopatológica das gônadas não foram detectadas lesões ou anormalidades em nenhum espécime coletado. As principais alterações encontradas nas lâminas de fígado foram vascularização intensa, núcleos picnóticos e áreas de necrose. Além de todas as fêmeas, foi detectada VTG no único macho maduro, bem como em 14 indivíduos juvenis. A análise dos biomarcadores enzimáticos revelou que, com exceção da GST, a atividade no fígado foi sempre superior à brânquia. Com relação aos biomarcadores enzimáticos e LPO, houve grande diferença entre a atividade das enzimas nos dois tecidos analisados. Há necessidade de estudos posteriores para análise das respostas enzimáticas em *S. testudineus* de diferentes pontos do Rio Pacoti ou mesmo outros corpos d'água para que essas respostas possam ser mais bem conhecidas e caracterizadas para monitoramentos ambientais futuros. Os dados aqui obtidos também sugerem que Rio Pacoti, muitas vezes usado como um local de referência, pode estar sofrendo com a contaminação, uma vez que foi observada grande quantidade de danos no fígado de peixes coletados e, também, por ter sido verificada a evidência de feminização.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os ecossistemas estuarinos, considerados regiões de transição, são extremamente complexos e importantes para o equilíbrio ecológico do planeta. São várias as características que conferem a eles tanta importância: funcionam como elos entre os ecossistemas terrestres e marinhos, como rota de entrada de nutrientes para o oceano, além das trocas genéticas (Eschirique *et al.* 2008). Sendo assim, a qualidade destes ambientes reflete-se, conseqüentemente, na qualidade de vida de todas as comunidades que dependem direta ou indiretamente deles.

1.2 Zona costeira cearense e o Rio Pacoti

O litoral cearense estende-se por 573Km e apresenta composição geológica basicamente sedimentar. A limitação das potencialidades hídricas superficiais é ditada principalmente pelo regime irregular na distribuição de chuvas e pelas temperaturas elevadas, sobretudo durante o período de estiagem (segundo semestre). Esta limitação deve ser sempre considerada no que diz respeito ao uso destas águas para atividades industriais, consumo humano e no que diz respeito ao lançamento de efluentes (Brasil, 2005).

No estado do Ceará, a zona costeira vem sofrendo uma série de perturbações e o crescimento populacional, marcado por intensa migração do eixo rural para o litoral, gera forte pressão sobre os recursos naturais (ZEE 2005a). De acordo com o estudo feito pelo programa ZEE (2005b), os principais vetores de impactos que afetam a região costeira do Estado do Ceará tanto no curso dos rios quanto na zona estuarina são: agricultura (com uso de fertilizantes e praguicidas), pecuária (incluindo o cultivo de camarão), a urbanização seguida ou não de industrialização e as alterações do uso do solo, alterações estas geralmente

ocorridas após o desaparecimento da vegetação nativa. Dentre estes vetores, a prática da agricultura em zonas costeiras pode exercer fortes pressões, entre elas a emissão de poluentes que pode trazer contaminação aos recursos pesqueiros. Além destes impactos citados pelo ZEE, a Superintendência Estadual do Meio Ambiente – CE complementa o cenário descrito trazendo o problema com a erosão da linha de costa, assoreamento de áreas de lagoas, enchentes, poluição de recursos hídricos superficiais e subterrâneos, ocupação irregular, carcinicultura, má disposição de resíduos sólidos e áreas de mineração (SEMACE, 2005).

Ao se verificar o histórico de ocupação do litoral cearense, pode-se notar que, como se repete em outros lugares do mundo, houve uma tendência de ocupação de áreas estuarinas e adjacências. Ao longo do litoral cearense localizam-se 17 grandes unidades de planície fluvio-marinhas geograficamente referenciadas de acordo com a região metropolitana de Fortaleza e agrupadas em: **Litoral Leste** (Barra Grande, Rio Jaguaribe, Rio Pirangi, Rio Choró, Rio Mal-Cozinhado), **Litoral da Região Metropolitana de Fortaleza** (Rio Pacoti, Rio Cocó, Rio Ceará, Rio São Gonçalo), **Litoral Oeste** (Rio Curu, Lagamar do Sal, Rio Mundaú, Rio Aracatiaçu, Complexo Estuarino dos rios Acaraú/Zumbi, Rio Coreaú, Barra dos Remédios, Rio Ubatuba/Timonha) (Brasil, 2005).

A nascente do Rio Pacoti está localizada na Serra de Baturité, percorrendo cerca de 150 km até desembocar na faixa costeira do município de Aquiraz. Abastece grande parte da Região metropolitana de Fortaleza com água barrada no Açude Pacoti-Riachão (localizado no médio e baixo curso do rio) e banha os municípios de Pacoti, Redenção, Acarape, Pacajús, Guaiúba, Horizonte, Itaitinga, Fortaleza, Eusébio e Aquiraz (Goayreb *et al.* 2004; Queiroz, 2005; ZEE, 2005b). Sobre a importância do rio, Goayreb *et al.* (2004) afirmam que o mesmo abastece diversos aquíferos e possui papel importante na subsistência de populações ribeirinhas e em outras atividades antrópicas.

Segundo Queiroz (2005), este recurso hídrico vem sendo utilizado nos últimos anos como destino final para esgotos domésticos e industriais não tratados. Em seu estudo sobre o estado de conservação do estuário do Rio Pacoti, a autora constatou que há grandes impactos ambientais de origem antrópica nos pontos adjacentes de maior adensamento populacional. O estuário do Rio Pacoti foi utilizado como ambiente referência em alguns estudos (Davanso, 2010; Nillin, 2008), porém ambos os estudos detectaram indícios de degradação na região estuarina.

Irving *et al.* (1988) puderam vislumbrar ao escrever seu trabalho sobre a zona estuarina do Rio Pacoti há 15 anos que, sendo parte da zona de crescimento da região metropolitana de Fortaleza, a área estaria fadada a estar seriamente ameaçada por uma onda de especulação imobiliária. À época, os autores afirmaram que, apesar da adjacência com a capital, a zona estuarina do Rio Pacoti ainda encontrava-se sem "alterações marcantes devidas à atividade humana". Notadamente, não é o que se observa nos dias atuais, pois o entorno estuarino do Rio Pacoti apresenta elevado estado de ocupação, que vem crescendo bastante nos últimos anos (Brasil, 2005).

Queiroz (2005) aponta a construção de condomínios residenciais e equipamentos de lazer na faixa litorânea do Município de Aquiraz como problemas de ocupação indevida, salientando a modificação da paisagem e a privatização ilegal de praias. Principalmente no Rio Pacoti, principal recurso hídrico da região metropolitana de Fortaleza. A autora conclui em seu trabalho que setores industriais e imobiliários instalados no município de Aquiraz estão trazendo danos ao Rio Pacoti e contribuindo para a iminente restrição do seu uso enquanto recurso.

Segundo Lehueur (2002), a conservação da zona costeira baseia-se na criação e implantação das principais categorias de unidades de conservação previstas pela legislação, que são: Parques, Reservas Biológicas, Estações Ecológicas, Áreas de Proteção Ambiental e

Áreas de Relevante Interesse Ecológico. Em 15 de fevereiro de 2000, através de um decreto estadual (Anexo 1), foi criada a Área de Proteção Ambiental (APA) do Rio Pacoti. A APA foi delimitada dentro dos municípios de Fortaleza, Aquiraz e Eusébio perfazendo um total de 2.914,93 ha. A sua criação teve objetivos claros de preservação da biodiversidade, manguezais, dunas, matas nativas de tabuleiro, preservar a integridade da paisagem, ordenar o turismo ecológico além do intuito de garantir a qualidade da água e a conscientização ecológica da população regional (Goayreb *et al.* 2004; SEMACE, 2013).

O Artigo. 3º do decreto proíbe "a implantação ou ampliação de atividades potencialmente poluidoras ou degradadoras, capazes de afetar os mananciais de água, formas do relevo, cobertura vegetal, o solo e o ar", bem como traz no parágrafo VI que também é vetada "qualquer forma de utilização que possa poluir ou degradar os recursos hídricos abrangidos pela APA do Rio Pacoti, como também, o lançamento de efluentes, resíduos ou detritos capazes de provocar dano ao meio ambiente" (SEMACE, 2013). Não obstante, os planos de manejo para colocar em prática o que foi determinado ainda não foram implementados (Davanso *et al.* 2013).

Alguns trabalhos com abordagem ecotoxicológica já foram conduzidos no Rio Pacoti. Nillin *et al.* (2013) obtiveram resultados que deram indicativos de toxicidade aguda e crônica nos sedimentos do rio. Davanso *et al.* (2013) avaliaram toxicidade aguda, crônica e biomarcadores (aChE, GST, dano de DNA) em tecidos de caranguejo e com a junção de todos os resultados puderam concluir que o estuário do Rio Pacoti ainda está em boas condições ambientais.

1.3. Biomarcadores: uma estratégia de avaliação

Como já previamente discorrido na introdução geral desta tese, os biomarcadores de contaminação ambiental são ferramentas ecotoxicológicas importantes em avaliações ambientais e servirão, neste capítulo, para fornecer dados adicionais sobre o estado de degradação do estuário escolhido. Os biomarcadores de contaminação são definidos como alterações biológicas em nível molecular, celular ou fisiológico que expressam efeitos provocados por poluentes. Funcionam como ferramentas de alerta, chamadas *early warning*, para que efeitos em níveis baixos de organização celular possam antecipar mudanças que podem ocorrer em níveis maiores de organização, com efeito preditivo (Martín-Díaz *et al.* 2004).

O processo de biotransformação dos xenobióticos assimilados pelos organismos envolve duas fases de reações que consistem basicamente na catalisação realizada por enzimas com transformação de moléculas apolares em metabólitos solúveis em água (fase I), levando à detoxificação e eliminação destes compostos (fase II). A transformação de moléculas durante a fase I leva à formação de intermediários muitas vezes mais reativos e perigosos que os compostos iniciais devido à transformação de moléculas apolares em polares. A fase I costuma envolver reações de oxidação, redução e hidrólise (Schlenk *et al.* 2008a).

De acordo com a revisão conduzida por Newman e Unger (2003), a presença de compostos orgânicos no ambiente costuma ser investigada por meio do complexo citocromo P450 monooxigenase (assembléia de isoenzimas) cuja indução pode se dar por exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), hidrocarbonetos clorados, bifenilas policloradas (PCB), dioxinas, dibenzofuranos, entre outros. As monooxigenases também estão envolvidas no metabolismo de ácidos graxos, colesterol e hormônios esteróides. Inserida

neste complexo, a enzima 7-etoxioresorufina-O-deetilase, doravante citada apenas como EROD, tem sua atividade reconhecida como um biomarcador útil em várias espécies expostas a compostos orgânicos, por ser bastante sensível a ensaio fluorimétrico e por apresentar baixa atividade em organismos não expostos à contaminação. A atividade da EROD é geralmente medida em homogenato de fígado com a produção de um produto fluorescente, a resorufina, gerada na reação catalisada pela enzima a partir do substrato etoxioresorufina (Melacon, 2003 e Schlenk *et al.* 2008b).

Como mencionado anteriormente, a fase I opera na biotransformação de compostos tornando-os hidro-solúveis a fim de serem eliminados mais rapidamente, ao passo que as enzimas da fase II atuam na conjugação. A super-família das enzimas solúveis chamadas glutathione-*s*-transferases (GST) têm papel importante na proteção das células contra efeitos tóxicos advindos de compostos endógenos ou ambientais. De particular interesse neste trabalho, a função mais importante de todas as isoformas desta enzima consiste na catalisação da reação de junção entre um tripeptídeo (glutathione, GSH) com o sítio eletrofílico de xenobióticos ou metabólitos para posterior eliminação destes conjugados para o meio extracelular. Outro papel importante desempenhado é proteção contra danos causados por estresse oxidativo por meio da detoxificação de produtos oriundos da quebra por oxidação de lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas (Newman & Unger 2003; Martín-Díaz *et al.* 2007; Schlenk *et al.* 2008a e 2008b). A medição da atividade desta enzima é rápida, de baixo custo e vem sendo utilizada amplamente como biomarcador de estresse ambiental mostrando-se boa ferramenta em monitoramentos de efeitos de poluentes em organismos sentinela (Maranho, 2010).

A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) é uma consequência natural da respiração aeróbica e só passa a ser de fato problemática quando a produção excede a capacidade de defesa antioxidante inerente às células. São muitas as enzimas que atuam na

prevenção de estresse oxidativo celular como a glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), ambas degradando o peróxido de hidrogênio. A enzima glutathiona redutase (GR) atua de forma complementar neste tipo de proteção antioxidante produzindo glutathiona e NADPH necessários para ação da GPx (Di Giulio & Meyer 2008; Gagné *et al.* 2007; Martín-Díaz *et al.* 2007). Fortemente regulada pelo potencial redox das células, a atividade da GR (além das outras enzimas acima citadas) tem sido proposta como potencial biomarcador de defesa contra dano oxidativo (Schlenk *et al.* 2008b).

Dentre os alvos mais estudados dos ataques das espécies reativas de oxigênio estão os ácidos graxos insaturados, moléculas presentes na membrana celular e nas membranas de organelas como mitocôndrias, lisossomos e retículo endoplasmático. Este processo é conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) e vem sendo utilizado como biomarcador de estresse oxidativo. A LPO ocorre em cadeia, tendo início no ataque de uma espécie reativa de oxigênio a uma dupla ligação de carbonos, bastando apenas que a primeira seja quebrada para que quebras sucessivas aconteçam podendo resultar na peroxidação de várias moléculas. Algumas conseqüências incluem a perda de fluidez da membrana, aumento de permeabilidade e até mesmo na morte celular (Di Giulio & Meyer 2008; Gagné *et al.* 2007).

Dentre os biomarcadores de desregulação endócrina, destaca-se a detecção e quantificação de vitelogeninas em peixes machos e juvenis. Para mais informações sobre os princípios envolvidos nesta avaliação, rever a revisão bibliográfica do Capítulo I, na página 40.

O uso de biomarcadores bioquímicos constitui uma das abordagens mais promissoras para a detecção preventiva de efeitos adversos no ambiente (Walker *et al.* 1996). Contudo, tem sido cada vez mais recomendado que os danos da contaminação causados nos organismos vivos sejam avaliados nos mais diversos níveis de organização. Sendo assim,

aliados às análises em nível bioquímico, estudos histopatológicos também são extremamente úteis quando se pretende avaliar a condição de saúde de um organismo, pois variações em níveis histológicos geralmente são resultado de um conjunto de alterações fisiológicas (van der Oost *et al.* 2003).

Considerando a problemática que envolve a contaminação dos ecossistemas, assim como dos recursos pesqueiros tão importantes para o estado, deve-se agregar mais esforços no sentido de diagnosticar e monitorar a saúde dos nossos estuários. Com o constante aumento da população e das atividades no entorno destes ambientes, dos quais tantas pessoas dependem direta ou indiretamente, é importante que seja conhecida a sua condição atual. Estas avaliações devem ser conduzidas sob os mais diversos aspectos (físicos, químicos e biológicos) para que seja feito o acompanhamento devido das respostas ambientais às mudanças introduzidas tanto de forma antrópica como natural. Com a aplicação dos biomarcadores propostos neste trabalho, será possível obter indicativos a respeito da saúde dos organismos presentes no estuário do Rio Pacoti, bem como a padronização de um novo organismo teste para tais avaliações.

2. OBJETIVOS

Somando-se a necessidade de avaliação ambiental do Estuário do Rio Pacoti, recurso de valor inestimável para o estado, à carência de modelos padronizados para monitoramentos com biomarcadores, obteve-se como resultado as principais motivações para a realização desta outra fase do trabalho, cujos objetivos foram:

***Objetivo 1:** Contribuir para o conhecimento da biologia de *S. testudineus* do Rio Pacoti (biometria, IHS, frequência sexual, estágios de maturação gonadal, IGS);

***Objetivo 2:** Avaliar a qualidade da foz do estuário a partir da análise dos biomarcadores associados a diversos tipos de contaminação (detecção de VTG, histopatologia de fígado e gônadas, GST, EROD, GR, LPO, correlações);

***Objetivo 3:** Avaliação/validação da espécie para monitoramentos com estes biomarcadores;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos peixes

Para a segunda etapa deste trabalho, o baiacu *Sphoeroides testudineus* também foi o organismo-teste escolhido, tendo sido suas características plenamente tratadas na introdução geral desta tese. Este trabalho foi realizado com autorização prévia do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), por meio do SISBIO (Número: 24449-1).

Em um período de dezoito meses compreendido entre o mês de julho de 2010 e janeiro de 2012 foram coletados todos os exemplares de *S. testudineus* utilizados para avaliação ambiental do Rio Pacoti, perfazendo um total de 59 peixes.

Grande parte dos procedimentos executados nesta fase do trabalho são os mesmos já descritos detalhadamente no Capítulo I e, por isso, serão aqui evocados com a localização no dito capítulo.

3.1.1. Ponto de coleta

Ver a seção 3.1.1. *Ponto de coleta* do Capítulo I (página 49)

3.1.2. Captura e transporte

Ver a seção 3.1.2. *Captura e transporte* do Capítulo I (página 50)

3.1.3. Aclimação

Após a chegada ao laboratório os animais foram deixados aclimatar à 25 ± 1 °C com fotoperíodo controlado de 12h/12h por dois dias antes do processamento.

3.2. Processamento dos peixes

Os peixes foram amostrados e processados seguindo os princípios de ética e respeito com máximo esforço para aliviar a dor dos animais sacrificados.

3.2.1. Anestesia

Ver a seção *3.3.1. Anestesia* do Capítulo I (página 53)

3.2.2. Biometria

Ver a seção *3.3.2. Biometria* do Capítulo I (página 53)

3.2.3. Índices Biométricos

Ver a seção *3.3.3. Índices Biométricos* do Capítulo I (página 54)

3.2.4. Coleta de sangue

Ver a seção *3.3.4. Coleta de sangue* do Capítulo I (página 54)

3.2.5. Dissecção de órgãos e tecidos

Pela mesma secção ventral o fígado e as gônadas foram retirados e pesados em balança analítica. Após a pesagem os órgãos foram imediatamente transferidos para solução de Bouin salino onde permaneceram durante 24h em temperatura ambiente (25°C) até serem transferidos para álcool 70 onde foram conservados até o início do procedimento histológico. Fígado e brânquias foram congelados a -70°C para avaliação dos biomarcadores.

3.3. Processo e análise histológica

Todo o procedimento histológico foi realizado baseando-se nos métodos descritos por Junqueira e Junqueira (1983) com pequenos ajustes de protocolo dos próprios laboratórios onde foi conduzida a etapa histológica do trabalho.

3.3.1. *Processamento histológico*

Ver a seção 3.4.1. *Processamento histológico* do Capítulo I (página 55)

3.3.2. *Visualização e documentação*

Ver a seção 3.4.2. *Visualização e documentação* do Capítulo I (página 56)

3.3.3. *Análise qualitativa das lâminas*

A análise histológica das gônadas foi feita tanto para fins de sexagem dos animais quanto para, em fêmeas maduras, determinar o possível estágio de maturação de acordo com Vazzoler (1996). Além disso, foram realizadas avaliações comparativas para identificação de possíveis aberrações gonadais que podem estar relacionadas à desregulação endócrina. Estas avaliações foram guiadas por Carballo *et al.* (2005); Cheek *et al.* (2001); Diniz *et al.* (2005); Gimeno *et al.* (1998); Hashimoto *et al.* (2003); Jobling *et al.* (1998); Leino *et al.* (2005); Rasmussen & Korsgaard, (2004); Vázquez *et al.* (2009); além de outros.

O exame histológico também foi realizado no fígado e, para este fim, seguimos as classificações de danos hepáticos de Morrison *et al.* (2006); Newman e Unger (2003) e Oliveira *et al.* (2012).

3.4. **Detecção de VTG por *Western blotting***

Ver a seção 3.5. *Detecção de VTG por Western blotting* do Capítulo I (página 57)

3.5. Biomarcadores bioquímicos

3.5.1 Homogeneização dos tecidos

Após descongelamento gradual em gelo, as amostras de brânquias e fígado foram homogeneizadas individualmente em tampão considerando-se uma relação peso/volume de aproximadamente 1 pra 7. As porções de tecido pesaram aproximadamente 0,20g, sendo adicionados, neste caso, 1400 μ L do tampão. A homogeneização foi feita com uso de um homogeneizador (Tissue Tearor) de ponta trituradora enfiada até o fundo do tubo. Logo após a trituração, o extrato foi dividido em dois tubos, sendo um imediatamente estocado (- 80° C) para análises posteriores (contendo a fração microssomal) e outro levado à centrífuga para separação da fração citosólica (sobrenadante). Após a centrifugação (15000 g por 20 min a 4°C), o sobrenadante foi retirado e congelado também a - 80° C para as análises subseqüentes.

3.5.2 Quantificação de proteínas

Tanto as alíquotas contendo homogenato total de fígado e brânquias quanto as de sobrenadante tiveram seu conteúdo protéico determinado pelo método de Bradford (1976) utilizando-se microplacas de 96 cavidades. Foi utilizada uma quantidade de 20 μ L de amostra por poço. Para a calibração foi preparada uma curva padrão com concentrações crescentes de *bovine serum albumine* (BSA - Sigma) que abrangeu de 0,2 a 2,0mg/mL. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm e expressas em mg/mL

3.5.3 Etoxiresorufina O-dietilase (EROD)

A atividade da EROD (7-etoxiresorufina-O-dietilase) foi determinada seguindo-se o método descrito inicialmente por Quinn *et al.* (2004) e proposto por Martín-Díaz *et al.*

(2009). Foi utilizada para esta medição uma amostra de 50 μ L da fração citosólica do homogenato do fígado de cada peixe. Esta atividade foi mensurada com a captação do aumento na fluorescência emitida da reação de formação da resorufina a partir do substrato 7-etoxiresorufina (10 μ M) com adição de NADPH (100 μ M) em tampão KH_2PO_4 (100 mM). A reação foi monitorada em fluorímetro (excitação = 530nm, emissão = 590nm) durante 60 minutos com registro de leitura a cada 15 minutos. O resultado da atividade enzimática da EROD foi adquirido plotando-se a fluorescência das amostras com a curva de calibração da 7-hidroxiresorufina e foi expressa em $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}^{-1}$.

3.5.4 *Glutathione S-transferase (GST)*

As matrizes biológicas utilizadas para medir da atividade catalítica da GST foram as frações citosólicas dos homogenatos do fígado e das brânquias dos peixes. Para tanto, foi seguido o método descrito por McFarland *et al.* (1999) com adaptações, sendo a reação de conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB - 42mM, Sigma-Aldrich) com glutathione reduzida (GSH - 1mM, Sigma-Aldrich) realizada em tampão HEPES (pH 6,5). A formação do conjugado produto da reação foi monitorada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 340 nm. A leitura deu-se em intervalos de 5 min, durante 30 min, a 25°C registrando-se o aumento da absorbância ao longo do tempo. Os resultados foram expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$.

3.5.5 *Glutathione reductase (GR)*

Para a avaliação da atividade da GR foi utilizado o protocolo proposto por McFarland *et al.* (1999), sendo empregada, para tanto, a fração citosólica do homogenato do fígado e brânquias dos peixes. A atividade da enzima foi mensurada registrando-se a queda na absorbância de NADP durante a oxidação do NADPH a NADP^+ . O substrato utilizado para

este fim foi a glutathiona oxidada (GSSG) a uma concentração final de 30mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 340 nm durante 10 min com registro a cada 2 min a 30°C. O resultado final foi expresso como $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$.

3.5.6 Lipoperoxidação (LPO)

Para avaliar os níveis de peroxidação lipídica nas amostras lançamos mão do método dos ácidos tiobarbituricos (TBARS) desenvolvido dos por Wills (1987). Para tanto, utilizou-se o homogenato total não centrifugado do fígado e das brânquias. Inicialmente as amostras foram acrescidas de ácido tricloroacético (10%) contendo FeSO_4 (1mM) e ácido tiobarbiturico (0.67%). Os tubos foram aquecidos em banho-maria a uma temperatura de 70 a 80°C durante 10 minutos e imediatamente centrifugados (10.000g, 10s) com retirada do precipitado. As amostras foram lidas por fluorimetria (excitação = 530nm, emissão = 590nm) e a concentração pôde ser calculada de acordo com a curva padrão de tetrametoxipropano. Enfim, os valores de lipoperoxidação foram expressos em $\text{nmol de TBARS mg}^{-1} \text{prot}$.

3.6. Análise dos dados

Os dados serão apresentados como média e desvio padrão, e foram trabalhados utilizando-se Excel 2008 and GraphPad Prism 4.0, tanto para análises como para criação de gráficos.

4. RESULTADOS

O primeiro objetivo deste capítulo foi contribuir para o conhecimento da biologia de *S. testudineus* do Rio Pacoti por meio da investigação de parâmetros biológicos (biometria, IHS, IGS e estágios de maturação gonadal). Tais parâmetros puderam ser investigados após a realização de oito coletas de *S. testudineus* no estuário do Rio Pacoti (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição do gênero dos espécimes de *S. testudineus* coletados no estuário do Rio Pacoti de acordo com as datas. nd - representam animais cujos sexos não puderam ser determinados.

DATA	N	FÊMEAS	MACHOS	INDIFE.
12.07.10	8	nd	nd	nd
05.08.10	20	9	0	11
31.04.11	11	2	0	9
26.05.11	2	1	0	1
13.06.11	4	4	0	0
11.07.11	5	3	0	2
24.08.11	3	1	2	0
23.01.12	6	3	3	0
TOTAL	59	23	5	23

Houve acentuada diferença na proporção sexual encontrada, sendo o número de machos bastante reduzido. Dos 59 espécimes coletados, 23 eram fêmeas, 23 indiferenciados (cujos gêneros não puderam ser determinados devido à falta de diferenciação) e apenas 5 indivíduos machos. A proporção sexual entre machos e fêmeas encontrada foi, portanto, de 1 macho para cada 4,6 fêmeas.

4.1. Biometria

A análise morfométrica foi baseada na medição do comprimento padrão (da cabeça até à última vértebra cervical) e do peso corporal total. Na tabela 6 estão apresentados

os dados para os 59 espécimes coletados entre julho de 2010 e janeiro de 2012 no estuário do Rio Pacoti.

Tabela 6. Parâmetros biológicos. Médias seguidas pelo erro e desvio padrão do peso corporal total, comprimento padrão, peso das gônadas e do fígado, índice gonadossomático (IGS), índice hepatossomático (IHS) e índice de condição (IC) de *Spherooides testudineus* coletados no estuário do Rio Pacoti, entre julho de 2010 e janeiro de 2012.

	PESO TOTAL (g)	C. PADRÃO (cm)	GÔNADA (g)	FÍGADO (g)	IGS (%)	IHS (%)	IC (%)
N	59	31	59	31	59	31	31
Média	45.07	11.34	0.20	2.44	0.37	3.30	3,77
Máximo	144.8	15.4	1.19	10.07	1.51	8.18	4,70
Mínimo	14.0	7.6	0.02	0.26	0.10	1.13	2,45
D. padrão	32.48	2.57	0.27	2.44	0.30	1.79	0,53
E. padrão	4.22	0.46	0.04	0.44	0.04	0.32	0,09
C. variação	72.07%	22.74%	139.38%	99.91%	82.50%	54.37%	14,12%

O peso total corpóreo apresentou grande variabilidade, com média de $45,07 \pm 32,48$ g (n = 59, coeficiente de variação = 72,07%), enquanto que o comprimento padrão foi mais homogêneo (média de $11,34 \pm 2,57$ centímetros, n = 31, o coeficiente de variação = 22,74%). Os dois parâmetros se correlacionaram positivamente ($R^2 = 0,7872$, Figura 22A). O índice de condição, que dá indicativos sobre a saúde dos animais, foi o parâmetro que menos variou, apresentando média de 3,77 e coeficiente de variação de 14,12%. Na tabela 7 (adiante), será possível visualizar as médias de peso de acordo com o gênero.

4.2. Índices corpóreos

Os pesos dos órgãos assim como os índices IGS e IHS também apresentaram grande variabilidade como mostrado na tabela 6. Os coeficientes de variação do peso gonadal e do fígado foi 139,38% e 99,91%, respectivamente, enquanto que para os índices IGS e IHS, as

variações corresponderam a 82,50% e 54,37%, respectivamente. A correlação positiva entre o peso corporal total e peso gônadas ($R^2 = 0,6396$; Figura 22B), ou peso do fígado ($R^2 = 0,6789$; Figura 22C) pode ser considerada fraca.

Tabela 7. Parâmetros biológicos. Médias seguidas pelo erro e desvio padrão do peso corporal total de *Sphoeroides testudineus* coletados no estuário do Rio Pacoti acordo com o gênero.

	Peso Fêmeas (g)	Peso Machos (g)	Peso Indife. (g)
N	23	5	23
Média	58,1	97,4	30,2
Máximo	144,8	123	45,9
Mínimo	15,5	68,5	17,7
D. padrão	36,1	20,8	9,4
E. padrão	7,5	9,3	1,9
C. variação	62,2%	21,4%	30,5%

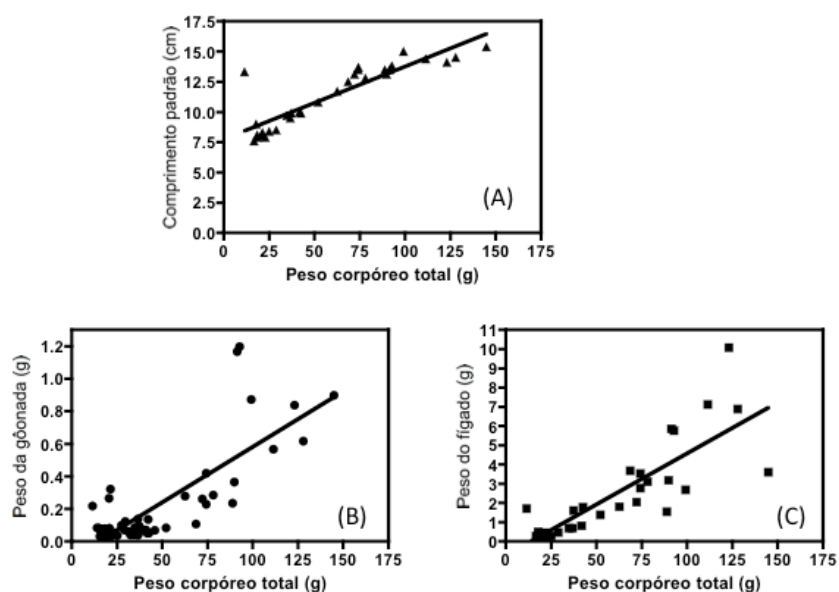


Figura 22. Relações entre: comprimento-peso total (A), gônadas-peso total (B) e fígado-peso total (C) de 31, 59 e 31(respectivamente) baiacus coletados no Rio Pacoti.

4.3. Estágios de maturação gonadal

Devido ao fato de *S. testudineus* não apresentar dimorfismo sexual, o gênero só pôde ser confirmado pela análise histológica das gônadas. Após avaliação das lâminas confeccionadas a partir das gônadas retiradas de 44 animais, foi possível identificar 20 fêmeas, 5 machos e 22 juvenis cujo sexo não pôde ser determinado devido à ausência de diferenciação. Este grupo foi aqui classificado como "indiferenciados".

Sob análise macroscópica, as gônadas de ambos os sexos apresentaram um par de apêndices tendo aspecto cilíndrico, cada um.

Todas as fêmeas coletadas apresentaram ovários contendo ovócitos previtelogênicos na grande maioria pertencentes à fase II de maturação gonadal de acordo com a classificação de Vazzoler (1996). Neste estágio, o ovário é cercado por uma parede delgada e estendem-se a partir deste as chamadas dobras ou lamelas ovígeras, que contém os ovócitos, estes formando o epitélio germinativo (Figura 23c). As células germinativas durante a primeira fase de desenvolvimento são chamadas oogônias e encontram-se na superfície das lamelas (Figura 23c). As oogônias são arredondadas com núcleo proeminente contendo um nucléolo e pequena quantidade de citoplasma delgado eosinofílico circundando o núcleo basofílico. As oogônias ampliam-se e tornam-se oócitos primários, ou ovócito previtelogenico (Figura 23d).

Como já citado, apenas 5 machos foram coletados e identificados por meio da histologia. Os testículos destes animais são formados por túbulos seminíferos preenchidos com células germinativas: espermatogônias (esg), espermatócitos (esc) e espermátides (espd) (Figura 23b). Estas células são esféricas e formam grupos.

Além de machos e fêmeas, 23 animais cujas gônadas não se encontravam suficientemente diferenciadas para que pudessem ser classificados foram denominados indiferenciados. (Figura 23a).

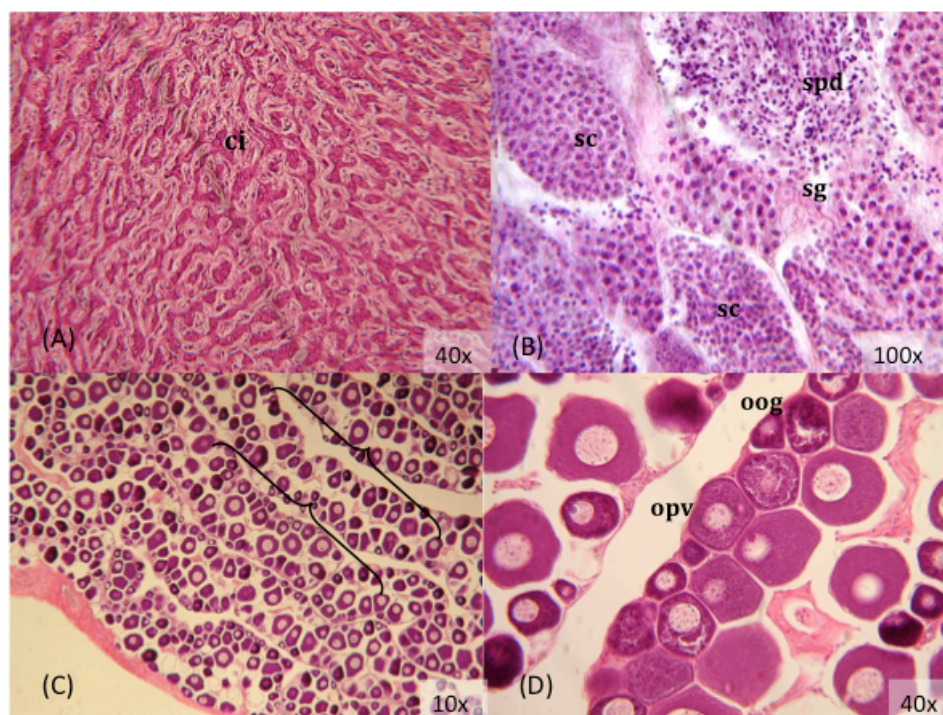


Figura 23. Secções transversais de gônadas de *Sphoeroides testudineus*. (A) uma gônada juvenil com células indiferenciadas (ci) (40x); (B) uma gônada de macho com espermatídes (spd), espermatócitos (sc) e espermatogônias (sg) (100x), (C) corte de ovário com destaque para as lamelas ovíferas (10x), e (D) uma porção magnificada da gônada feminina destacando-se as oogonias (oog) e os ovócitos pre-vitelogênicos (opv) (40x).

O segundo objetivo que se tentou alcançar neste capítulo foi avaliar a qualidade da foz do estuário pela análise dos biomarcadores associados aos mais diversos tipos de contaminação (histopatologia de fígado e gônadas, VTG, GST, EROD, GR, LPO) e estabelecer correlações entre eles.

4.4. Avaliação histopatológica das gônadas

Após cuidadosa avaliação histopatológica das gônadas, não foram detectadas lesões ou anormalidades em nenhum espécime coletado no estuário do Rio Pacoti. Todas as estruturas encontraram-se dentro dos padrões normais descritos para peixes teleósteos.

4.5. Avaliação histopatológica do fígado

A análise histopatológica das amostras de fígado de *S. testudineus* revelou, sob o ponto de vista geral, parênquima hepático de aparência normal com a presença do tecido pancreático e vasos sanguíneos dispersos entre os hepatócitos. Vacuolizações citoplasmáticas foram observadas com considerável acúmulo de lípidos em sete lâminas (Figura 24c). Associa-se o processo de vacuolização às reservas lipídicas no tecido hepático, caracterizadas principalmente pela falta de coloração com hematoxilina/eosina. As principais alterações encontradas nas lâminas de fígado foram vacuolização intensa (Figura 24c), núcleos picnóticos e áreas de necrose (Figura 24d). As relações entre os danos de fígado, a quantidade de lâminas em que foram detectados e o gênero dos animais encontram-se sumarizadas na tabela 8.

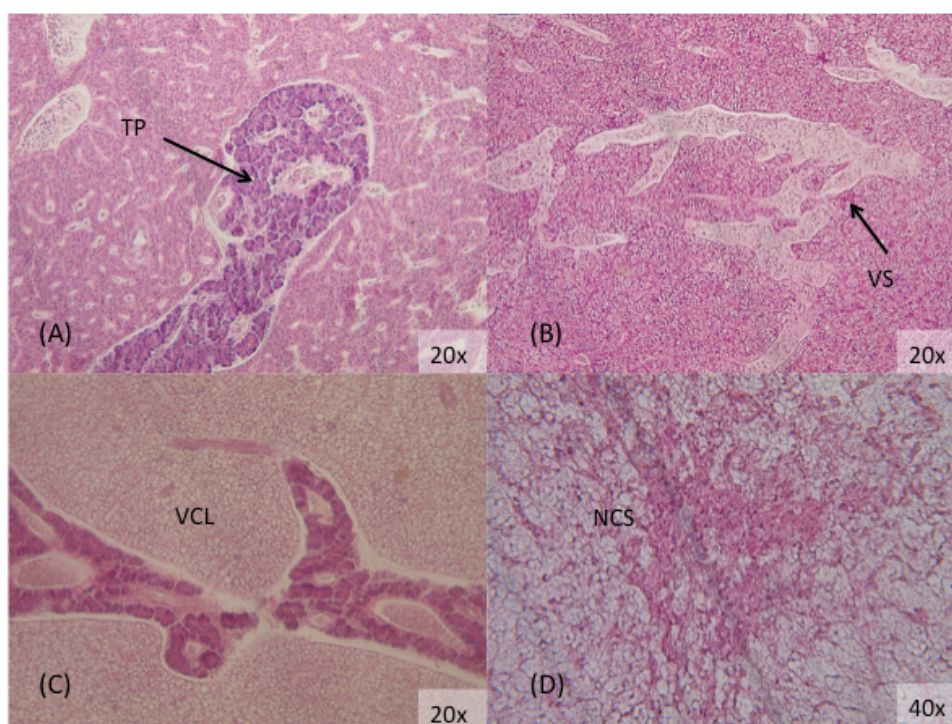


Figura 24. Secções transversais de fígado do baiacu *Spherooides testudineus*. (A) tecido pancreático (tp) (20x); (B) vasos sanguíneos (vs) (20x); (C) vacuolização citoplasmáticas (vcl) (20x); (D) área de necrose (ncs) (40x).

Tabela 8. Ocorrência de alterações no fígado de 21 baiacus *Sphoeroides testudineus* coletados no Rio Pacoti de acordo com o gênero.

	N	Vacuolização intensa	Núcleos picnóticos	Áreas de necrose
Indiferenciados	10	4	1	1
Fêmeas	10	2	1	2
Machos	1	1	0	0

4.6. Detecção de VTG

O ensaio de *western blotting* para detecção de VTG como biomarcador de desregulação endócrina foi realizado em 35 amostras de plasma de *S. testudineus*. O anticorpo comercial anti-vitelogenina empregado no ensaio reagiu bem culminando na formação de bandas fortes em uma região onde se localizam proteínas de peso molecular de aproximadamente 270 kDa (Figura 25).

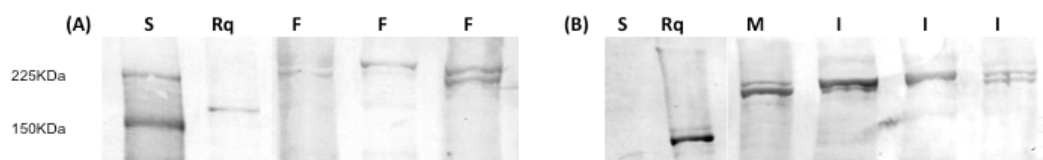


Figura 25. Exemplos de detecção por western blotting de vitelogenina (presumida) dos baiacus *Sphoeroides testudineus* coletados no Rio Pacoti. (S) padrão de peso molecular; (Rq) plasma de fêmea vitelogênica de *Rhamdia quelen* como controle positivo; (F) amostras de plasma de fêmeas de *S. testudineus*; (M) plasma de espécime macho e (I) indiferenciados. Os números orientados verticalmente representam o peso molecular em KDa (kilodaltons).

Além de todas as fêmeas, como era esperado, foi detectada VTG no único macho maduro bem como em 14 juvenis. O resultado total da detecção de vitelogenina de acordo com o gênero dos peixes pode ser visualizado na tabela 9.

Tabela 9. Detecção de vitelogenina em amostras de plasma de 35 baiacus *Sphoeroides testudineus* coletados no estuário Rio Pacoti de acordo com o gênero.

GÊNERO DO PEIXE	N	DETECÇÃO DE VTG	STATUS
Fêmea	17	Sim	Esperado
Indiferenciado	4	Não	Esperado
Indiferenciado	14	Sim	Inesperado
Macho	1	Sim	Inesperado

4.7. Biomarcadores bioquímicos

4.7.1 Etoxiresorufina O-diethylase (EROD)

A atividade da EROD quantificada no fígado de 50 espécimes de *S. testudineus* teve média de $19,56 \pm 10,65$ pmol/min/mg, sendo os valores máximo e mínimo 43,28 e 3,022 pmol/min/mg, respectivamente. Houve grande variabilidade entre os dados, sendo 54,45% o coeficiente de variação.

4.7.2 Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi mensurada no fígado e brânquias com grande diferença entre a ação da enzima nos dois órgãos do baiacu estudado. Os 36 peixes analisados apresentaram atividade média no fígado de $0,00004333 \pm 0,00004093$ nmol/mg prot. Já na brânquia foi revelada uma atividade bastante superior de $0,0008542 \pm 0,000887$ nmol/mg prot. Também houve grande variabilidade nos dados das medições de GST, tanto em brânquias (CV=103.84%) quanto em fígado (CV=94.46%). A atividade foi cerca de duas vezes mais alta na brânquia (Figura 26).

4.7.3 Glutathione redutase (GR)

A enzima GR também apresentou grande variabilidade de dados. A média de atividade foi de $88,86 \pm 53,27$ nmol/mg prot no fígado e $1,937 \pm 1,17$ nmol/mg prot na brânquia. Houve grande diferença entre a ação da enzima nos dois órgãos, sendo a atividade mensurada no fígado cerca de 45 vezes mais alta que nas brânquias dos animais (Figura 26).

4.7.4 Lipoperoxidação (LPO)

Os níveis de peroxidação lipídica também foram avaliados tanto no fígado quanto na brânquia dos animais, tendo sido encontradas médias de $6,347 \pm 3,800$ nmol TBARS/mg prot e $1,117 \pm 0,6724$, respectivamente. No fígado, a atividade foi cerca de nove vezes mais alta que na brânquia (Figura 26). O coeficiente de variação foi de 59,87% no fígado e 60,21% nas brânquias.

Como ilustrado na figura 26, houve grande diferença entre a atividade das enzimas nos dois tecidos analisados.

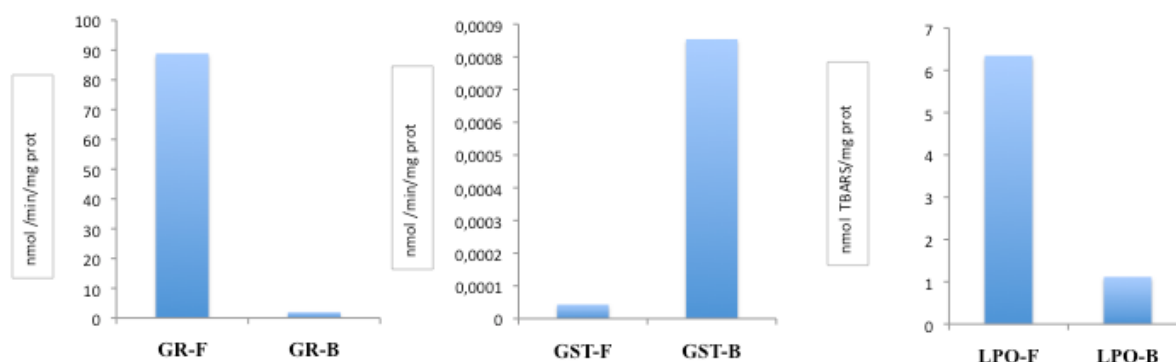


Figura 26. Resultado do ensaio de atividade enzimática da glutathione s-transferase (GST), glutathione redutase (GR) e peroxidação lipídica (LPO) em fígado (F) e brânquias (B) de *S. testudineus* coletados no Rio Pacoti.

Na tabela 10 estão resumidos os resultados dos biomarcadores bioquímicos analisados neste capítulo.

Tabela 10. Biomarcadores bioquímicos. Médias seguidas pelo erro e desvio padrão da atividade da EROD, GST, GR e LPO medidas em *Sphoeroides testudineus* coletados no estuário do Rio Pacoti acordo com o órgão investigado (fígado (F) e brânquias (B)).

	EROD	GR-F	GR-B	GST-F	GST-B	LPO-F	LPO-B
	pmol/min/mg	nmol/min/mg	nmol/min/mg	nmol/min/mg	nmol/min/mg	nmol/mg	nmol/mg
N	50	50	52	36	52	53	40
Média	19,56	88,86	1,937	0,00004333	0,0008542	6,347	1,117
D. padrão	10,65	53,27	1,17	0,00004093	0,000887	3,8	0,6724
E. padrão	1,506	7,533	0,1623	0,000006821	0,000123	0,522	0,1063
Mínimo	3,022	0,3156	0,3953	0,000002786	0,00002212	1,453	0,01391
Máximo	43,28	188,4	5,055	0,0001759	0,00297	16,38	2,764
C. variação	54.45%	59.94%	60.42%	94.46%	103.84%	59.87%	60.21%

5. DISCUSSÃO

Devido à carência de modelos padronizados para monitoramento ambiental no nordeste brasileiro, buscou-se neste capítulo a implementação do uso do baiacu *Sphoeroides testudineus* em estudos com biomarcadores de contaminação aquática. Somado a isso, objetivou-se avaliar a qualidade da foz do estuário do Rio Pacoti por meio da análise destes parâmetros, além de contribuir para o conhecimento da biologia de *S. testudineus*.

Iniciando pela proporção sexual, houve predominância de machos com relação às fêmeas numa proporção de 1:4,6. Estudando a dinâmica de crescimento e peso de *S. testudineus* na gamboa do Perequê (Paraná), Possato (2006) encontrou 6,5% de machos, 18,9% de fêmeas e 74,5% indeterminados, numa proporção macho/fêmea de 1:2,9. Também no estado do Paraná, Rocha *et al.* (2002) encontraram uma proporção sexual de 1:2 na gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá. A proporção sexual em um ambiente pode flutuar de acordo com o ciclo de vida dos indivíduos de cada gênero naquele momento. Adicionam-se a isso os fatores mortalidade e momentos de desova que também exercem influência sobre esta proporção (Vazzoler, 1996).

Os parâmetros biométricos e índices corpóreos são bastante utilizados por serem facilmente mensurados e gerarem dados importantes com relação à saúde geral e reprodutiva dos organismos. Ainda assim, há quem os considere indicadores fracos no sentido da falta de correlação com o tipo de contaminação e pela interferência de outros fatores como disponibilidade de alimento, doenças e parasitismo (Sanchez *et al.* 2007, 2008a e 2008b). No tocante aos registros biométricos, foram encontrados valores bastante variáveis de peso corpóreo. Este resultado se deve, primordialmente, à aleatoriedade empregada na coleta, onde os animais não foram escolhidos de acordo com tamanho, tendo sido todos os capturados transportados ao laboratório. Já o comprimento variou um pouco menos, tendo os dois parâmetros se correlacionado positivamente. Esta correlação era esperada e também pôde ser

observada para outras espécies. Aliás, esta relação é vastamente empregada com o intento de se estipular o índice de condição, fator utilizado como indicador integrativo do *status* de saúde do animal (Leatherland, 2010; Sanchez *et al.* 2008a e 2008b). Houve pequena variação do IC entre os animais coletados no estuário do Rio Pacoti, com valores variando entre 2,4 a 4,7 (Coeficiente de variação: 14,12%). Sanchez *et al.* (2008b) destacam que o IC é um parâmetro sensível, apesar de não permitir estabelecer relações entre o tipo de contaminação e as suas variações. No mesmo estudo, os autores obtiveram pequena variação do índice (0,85 a 1,00) com *Gasterosteus aculeatus* coletados em diferentes lugares com níveis distintos de contaminação. Em outra avaliação conduzida por eles (Sanchez *et al.* 2008a) utilizando o mesmo organismo, não foi encontrada variação entre as diferentes estações do ano, quando foram realizadas as coletas (IC: 0,8 a 1,0).

Os índices gonado-somático (IGS) e hepato-somático (IHS) também fornecem informações importantes sobre o *status* fisiológico dos organismos e são geralmente citados como ferramentas importantes na comparação entre diferentes corpos de água (Sanchez *et al.* 2008b; Stansley & Washuta, 2007), ou mesmo diferentes pontos de amostragem ou estações num mesmo corpo d'água (Hashimoto *et al.* 2003; Prado *et al.* 2011); entre substâncias (Pait & Nelson, 2003), ou diferentes tratamentos experimentais e concentrações (Diniz *et al.* 2005; Diniz *et al.* 2010; Moura Costa *et al.* 2010; Vázquez *et al.* 2009).

Os resultados de IGS calculados de 59 espécimes apresentaram enorme variação (coeficiente de variação = 82,5%). Estudos realizados desde 1996 têm demonstrado uma relação estreita entre o estágio de maturação e aumento de peso de ovário em relação ao peso corporal em peixes teleósteos devido a mudanças durante o ciclo reprodutivo (Vazzoler, 1996). Embora difícil de provar, o elevado coeficiente de variação dos pesos médios das gônadas em nosso estudo poderia ser associado a tais efeitos. Rocha e colaboradores (2002) coletaram exemplares de *S. testudineus* durante um ano na Baía de Paranaguá (Paraná) e

encontraram grande variação no IGS em fêmeas, com médias variando entre 0,31 e 9,11%. Com base nesses dados, podemos observar como essa relação é alterada ao longo de um ano explicando a baixa correlação encontrada em nosso conjunto de dados. Em outro estudo com o baiacu *S. annulatus*, no México, Sanchez-Cárdenas *et al.* (2007) também não encontraram nenhuma uniformidade nos valores de IGS visto que apresentaram variação temporal significativa, com valores médios de 0,38 a 10,11% nas fêmeas.

O fígado, principal local de desintoxicação de xenobióticos, é muitas vezes um dos órgãos mais estudado nos vertebrados (Vázquez, 2009), e as flutuações no IHS podem ser consideradas como indicadores de contaminantes no ecossistema (Diniz *et al.* 2005; Sanchez *et al.* 2007). O IHS neste trabalho variou bem menos que o IGS com valores entre 1,13 e 8,18. Outros autores avaliando flutuações de IHS em diferentes espécies encontraram valores similares aos do nosso trabalho. Foi o caso de Sanchez *et al.* e (2007) e (2008b) com *Gasterosteus aculeatus* coletados em lagos franceses onde os autores encontraram, nos dois estudos, valores médios de IHS de machos e fêmeas variando de 2,0 a 8,2% com forte aumento em locais mais poluídos (Sanchez *et al.* 2008b). Já Prado *et al.* (2011) com lambaris coletados no reservatório de Furnas obtiveram valores inferiores (IHS: 0,46 – 1,0). Sanchez *et al.* (2007) encontraram os mais altos valores de IHS em locais fortemente impactados e atribuem o aumento do fígado aos efeito dos contaminantes.

O estudo histológico dos ovários e testículos não revelou sinais de alteração de acordo com a estruturação normal esperada destes tecidos. A histopatologia de gônadas tem sido utilizada mundialmente como biomarcador para perturbação endócrina em peixes (Diniz *et al.* 2010; Hashimoto *et al.* 2003; Moncaut *et al.* 2003; Prado *et al.* 2011; Vázquez *et al.* 2009). Embora as abordagens morfológicas não sejam tão apropriadas como alerta precoce em estudos de avaliação de risco ambiental, como biomarcadores bioquímicos, elas agem eficientemente de forma integrativa (van der Oost *et al.* 2003).

Ribeiro *et al.* (2012) tratam a histopatologia como "um dos métodos mais rápidos e eficientes para detectar o nível de efeitos tóxicos em órgãos e tecidos". E o fígado, nesse cenário, atua como órgão importante por concentrar tarefas essenciais para a manutenção da saúde do organismo e é um dos órgãos mais freqüentemente sujeitos às lesões (Morrison, 2007). Como exemplo, podem-se citar os mecanismos de resposta celular ao estresse químico. É por isso que a histopatologia hepática provê respostas bastante elucidativas funcionando como biomarcador eficiente de poluição ambiental.

Após análise cuidadosa nas lâminas de fígado dos baiacus, foram encontradas lesões degenerativas relevantes como: vacuolização intensa, núcleos picnóticos e áreas de necrose. O acúmulo de substâncias, causado por estresse químico, pode levar as células a um quadro de vacuolização intensa, um dano ou resposta celular geralmente associada a uma alteração no funcionamento metabólico. Quando exagerados, estes acúmulos são capazes de alterar os mecanismos normais da célula podendo levar à necrose ou apoptose da mesma (Ribeiro *et al.* 2012).

Os núcleos picnóticos são condensamentos anormais dos núcleos, caracterizados por uma coloração forte e escura nas lâminas (Morrison, 2007). São tratados como a mais forte evidência de necrose tornando a cromatina densa com formato irregular (Newman & Unger, 2003). O processo necrótico não faz parte do metabolismo natural de células saudáveis e está associado à exposição a poluentes. Existem diferentes tipos de necroses relacionadas a diferentes tipos de doenças ou injúrias, mas todas, fatalmente, são degenerativas e refletem a morte celular não programada (Newman & Unger, 2003; Ribeiro *et al.* 2012).

Ainda que tenham apresentado baixa ocorrência, tais alterações no tecido hepático sugerem a presença de contaminantes no estuário do Rio Pacoti.

Partindo para o biomarcador de efeito de desreguladores endócrinos, que vem a ser a detecção de vitelogenina, nossos resultados apontam para um quadro de alerta neste

tocante. Dos 18 animais juvenis submetidos ao imuno-ensaio, 14 foram VTG positivos, além do único macho. Moura Costa (2012) alerta para o fato de que a maioria dos poluentes com potencial para desregular o sistema endócrino é lipofílica e encontra-se acumulada na biota ou em partículas em suspensão, estando mais biodisponível para os animais que se alimentam de microcrustáceos associados ao sedimento, o que vem a ser o caso do baiacu estudado. Estes resultados de VTG representam um alerta de que o Rio Pacoti sofre com contaminação por compostos xenoestrogênicos.

Apesar da criação da Área de Proteção Ambiental (APA) do Rio Pacoti em 2000, sabe-se hoje que o rio sofre fortes pressões antrópicas com um intenso crescimento na ocupação de seu entorno nos últimos anos. São inúmeros os condomínios residenciais agregados a equipamentos de lazer que ocupam a área de forma indevida. Não pode-se deixar de destacar aqui que este adensamento faz com que o Rio Pacoti fatalmente seja utilizado como destino final para esgotos domésticos e industriais não tratados (Brasil, 2005; Queiroz, 2005).

Seguindo-se com a caracterização descritiva, foram examinadas as atividades enzimáticas de EROD, GST, GR e LPO. A medição da atividade da EROD tem sido utilizada para a investigação da ação de enzimas pertencentes à família da Citocromo P450 e do sistema de oxidases de função mista (MFO) que atuam na detoxificação (Pereira, 2008). Em nosso trabalho, obtivemos atividade média de 19,56 pmol de resorufina produzida por minuto por cada miligrama de proteína (pmol/min/mg) com grande variabilidade dos dados. Também utilizando *S. testudineus* em seus experimentos com HPA, Ribeiro (2007) obteve no controle (composto de exemplares oriundos da Barra do Saí, litoral norte de Santa Catarina) média de 243,28 pmol/min/mg, valor este bastante superior. Vehniäinen *et al.* (2012) confirmam que pode existir grande diferença nos resultados de EROD tanto entre espécies quanto entre indivíduos. Na tabela 11 pode-se visualizar os resultados da caracterização de atividades de

EROD em diferentes espécies realizada pelos autores supracitados em comparação com o presente trabalho.

Tabela 11. Valores de atividade da EROD em fração citosólica (S9) de diferentes espécies de peixes. Os dados mostram média \pm 1 de desvio padrão.

Espécie	Atividade da EROD (pmol/min/ mg prot)	Fonte
Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	18 \pm 6	Vehniäinen et al. 2012
Landlocked salmon <i>Salmo salar</i>	11 \pm 5	"
Brown trout <i>Salmo trutta</i>	20 \pm 6	"
Brown trout <i>Salmo trutta</i> m. lacustris	27 \pm 9	"
Whitefish <i>Coregonus lavaretus</i>	10 \pm 8	"
Roach <i>Rutilus rutilus</i>	2 \pm 1	"
European perch <i>Perca fluviatilis</i>	20 \pm 7	"
Baiacu <i>Sphoeroides testudineus</i>	19 \pm 10	Este trabalho

Observando-se a tabela com os dados de Vehniäinen *et al.* (2012), pode-se notar que os valores por eles obtidos aproximam-se da média encontrada neste trabalho (19,56 \pm 10,65 pmol/min/mg).

A glutathione S-transferase (GST) apresentou pouca ou nenhuma atividade nos dois tecidos analisados neste estudo, além de exibir grande variabilidade nos dados. No trabalho de Ribeiro (2007) com *S. testudineus* coletados em área controle, a atividade da GST no fígado teve média de 287,38 \pm 20,07 nmol/mg prot, muitíssimo mais elevado que o valor por nós encontrado.

Alguns elementos curiosos podem ser notados em nossos achados com GST. Primeiro, os valores da atividade da enzima em outros trabalhos são sempre superiores aos valores por nós encontrados (Solé *et al.* 2003a e 2003b) às vezes até dramaticamente. Esta observação levanta algumas possibilidades sobre este trabalho: 1. perda de atividade da enzima por tempo de armazenamento; 2. problemas metodológicos com artefato matemático em consequência do intervalo de variações muito pequenas (provavelmente mostrando a variação basal próxima a zero), causado por níveis muito baixos. Nota-se, ainda, que a

maioria dos autores considera o fígado como órgão mais eficiente para determinação da atividade desta enzima, pois trata-se do principal órgão de detoxificação onde agem as enzimas de fase II de biotransformação, caso da GST (van der Oost *et al.* 2003). Neste trabalho, a atividade encontrada nas brânquias dos peixes, apesar de ainda diminuta, foi cerca de duas vezes maior que no fígado.

A enzima glutathione redutase (GR) tem considerável importância na manutenção do equilíbrio que deve existir entre GSH/GSSG em condições de estresse oxidativo para que as outras enzimas possam atuar. Apesar disso, a GR tem recebido pouca atenção por parte dos pesquisadores que utilizam enzimas antioxidantes. Um aumento da atividade da enzima é esperado em animais expostos à contaminação (van der Oost *et al.* 2003). No presente trabalho, obtivemos atividade da GR com média de 88,86 nmol/mg prot no fígado e 1,937 na brânquia. Quando comparados com valores obtidos em outros estudos de campo, pode-se observar grande diferença. McFarland *et al.* (1999), em fígado de *Ameiurus nebulosus*, obteve 0.735 nmol/mg prot em seu local de referência e 0.494 no ponto supostamente contaminado. Larose *et al.* (2008), por sua vez, encontrou valores variando de 5,81 a 8,10 em lagos com diferentes status de contaminação por mercúrio. Seguimos ainda com exemplo de Oliveira *et al.* (2009) em cinco pontos críticos da Ria de Aveiro e um local de referência, de onde das brânquias de seus exemplares de *Liza aurata* obteve-se atividade média da GR de 5 nmol/mg prot.

É possível notar que todos os valores encontrados pelos autores supracitados são bastante inferiores aos do presente trabalho. Tanto os valores advindos de peixes coletados em fazendas de cultivo, quanto em locais referência ou ambientes impactados. Para van der Oost *et al.* (2003) a viabilidade da GR como biomarcador segue questionável pois há muitos casos em que a enzima parece não ser sensível.

A análise de lipoperoxidação é apontada por van der Oost *et al.* (2003) como um

dos melhores biomarcadores para monitoramentos ambientais uma vez que é capaz de revelar os danos causados pelo estresse oxidativo em si, e não simplesmente com a indicação de que o organismo está sendo exposto a ele. Com relação aos achados referentes à lipoperoxidação, também encontramos valores distintos entre os dois órgãos estudados (6,34 nmol TBARS/mg prot no fígado e 1,117 na brânquia). Ballesteros *et al.* (2009) em estudo com *Jenynsia multidentata* coletados em local referência (Rio San Antonio, Argentina), obtiveram média de 0,56 nmol TBARS/mg prot no fígado e 0,11 nas brânquias. Já Oliveira *et al.* (2009) encontraram nível médio de LPO de aprox 1 nmol TBARS/mg prot em brânquias de *Liza aurata* coletados em um ponto referência da Ria de Aveiro.

No tocante aos biomarcadores bioquímicos por nós analisados, emerge uma óbvia necessidade de estudos posteriores com *S. testudineus*. Estudos nos quais poderão ser feitas comparações entre diferentes pontos do Rio Pacoti, diferentes épocas do ano e também outros corpos d'água para que essas respostas possam ser mais bem conhecidas e caracterizadas para futuros monitoramentos ambientais. A análise descritiva dos valores sem comparações entre pontos ou tratamentos mostra-se relativamente limitada e traz consigo esta necessidade por novas investigações. Contudo, o conhecimento dos valores por nós encontrados é fundamental para as comparações futuras, pois trata-se de um panorama inicial que servirá como *background* às próximas investigações com esta espécie utilizando-se os mesmos métodos já empregados. Sanchez *et al.* (2007) destacam a necessidade de se caracterizar valores e variações naturais de biomarcadores que sirvam como base para estudos posteriores para que, também, seja possível reconhecer os fatores interferentes.

É importante salientar que, apesar de se tratar de um estudo preliminar, encontramos indicativos (VTG e alterações no fígado) de que o estuário do Rio Pacoti encontra-se ameaçado por contaminação, inclusive com potencial para desregulação endócrina.

Como bem afirmado por Costa (2006), ainda existe certa escassez de estudos que visem padronizar métodos com biomarcadores em peixes de águas tropicais. Infelizmente, é notório que essa escassez é ainda mais severa no nordeste brasileiro, onde poucos grupos de pesquisa se debruçam sobre esta problemática. Portanto, faz-se necessário e urgente que estes biomarcadores e organismos-modelo sejam padronizados, que sejam gerados dados que sirvam como subsídios para que os envolvidos com o gerenciamento ambiental possam tomar boas decisões. Este trabalho pretende prestar uma contribuição sob este ponto de vista, agregando mais informações, também, acerca do estado de degradação do estuário do Rio Pacoti, corpo d'água da maior importância para o estado.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a utilização de *S. testudineus* na avaliação de contaminação mostrou-se viável e, portanto, a espécie tem seu uso validado para trabalhos futuros utilizando-se os mesmos parâmetros analisados neste estudo.

Os resultados sugerem também que estuário do Rio Pacoti, muitas vezes usado como um local de referência, pode estar sofrendo com a contaminação, uma vez que foram observados danos no fígado de peixes coletados e, também, por ter sido verificada a evidência de feminização. Houve grande variação nos resultados com biomarcadores e, por isso, há necessidade de estudos posteriores para análise destas respostas enzimáticas em *S. testudineus* de diferentes pontos do Rio Pacoti, em diferentes épocas e também em outros corpos d'água para que essas respostas possam ser bem caracterizadas para uso em futuros monitoramentos ambientais.

REFERÊNCIAS

- ABESSA, D. M. S. *et al.* Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 875-885. 2005.
- ADAMS, W. J.; KIMERLE, R. A.; BARNETT, J. W. Sediment quality and aquatic life assessment. **Environmental Science and Technology**, Iowa City, v. 26, n. 10, p. 1864-1875.1992.
- AIT-AISSA, S. *et al.* Evaluation of an in vitro hsp70 induction test for toxicity assessment of complex mixtures: comparison with chemical analyses and ecotoxicity tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 54, n. 1, p. 92-104, mar. 2001/jan. 2003.
- BALLESTEROS, M. L.; Wunderlin, D. A.; Bistoni, M. A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 199–205. 2009.
- BENSON, J. Tetradon (blowfish) poisoning. A report of two fatalities. **Journal of Forensic Sciences**. Colorado Springs, v.1, p.119-126.1956.
- BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism**: A manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton, 1975. 160 p.
- BIANCHINI, A.; MONTSERRAT, J. M.; RIBEIRO, C. A. O. Biomarcadores de poluição em animais aquáticos. *In*: LANA, P. C. *et al.* (Org.). **Avaliação ambiental de estuários brasileiros**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2006. p. 119-132. 156 p.
- BILA, D. *et al.* Estrogenic activity removal of 17 β -estradiol by ozonation and identification of by-products. **Chemosphere**, v. 69, p. 736-746. 2007.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666. 2007.
- BJERSELIUS, R. *et al.* Estrogen in food or water severely effect the male goldfish (*Carassius auratus*) sexual behaviour. *In*: NORBERG, B. *et al.* (Ed.). **Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. Department of Fisheries and Marine Biology, University of Bergen: Bergen. ISBN 82-7461-048-2. 499 p. 4-9 Jul. 1999.
- BOLEAS, S. *et al.* Endocrine disruptors and reproductive toxicology. A molecular approach. *In*: NORBERG, B. *et al.* (Ed.). **Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. Department of Fisheries and Marine Biology, University of Bergen: Bergen. ISBN 82-7461-048-2. 499 p. 4-9 Jul. 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248-54. 1976.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA. **Resoluções do Conama**: Resoluções vigentes publicadas entre setembro de 1984 e janeiro de

2012. Brasília: 2012. 1126 p.

BRASIL. Ministério do meio Ambiente, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, IBAMA. **Diagnóstico da Carcinicultura no Estado do Ceará - Relatório Final**, vol. 1. 2005. 177 p.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE. **Atlas geográfico das zonas costeiras e oceânicas do Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. 176 p.

CANADÁ. CCAC guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing. *In*: _____. Canadian Council on Animal Care (CCAC). **CCAC Guidelines**. Ottawa, 2005. Disponível em: <http://ccac.ca/en_/standards/guidelines>. Acesso em: 02 jan. 2013.

CANTONNET, D. V. *et al.* Sexual dimorphism in the brain aromatase expression and activity, and in the central expression of other steroidogenic enzymes during the period of sex differentiation in monosex rainbow trout populations. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, p. 346-355. 2011.

CARBALLO, M. *et al.* Plasma vitellogenin levels and gonadal morphology of wild carp (*Cyprinus carpio* L.) in a receiving rivers downstream of Sewage Treatment Plants. **Science of the Total Environment**, n. 341, p. 71-79. 2005.

CHEEK, A. O. *et al.* Experimental Evaluation of Vitellogenin as a Predictive Biomarker for Reproductive Disruption. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n. 7. 2001.

CHIAVERINI, A. P. **Ecologia trófica de *Spherooides testudineus* Linnaeus, 1758 e *Spherooides greeleyi* Gilbert, 1900 da Gamboa do Pereque, Pontal do Sul, Paraná, Brasil**. 2008. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas área de concentração Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, 2008.

CHRISTIANSEN, L. B. *et al.* Estrogenicity of Xenobiotics in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) using *in vivo* Synthesis of Vitellogenin as a Biomarker. **Marine Environmental Research**, v. 46, n. 1-5, p. 137-140. 1998.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 378-83. 1993.

CORONADO, M. *et al.* Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-4- methoxyphenyl-methanone) in fish. **Aquatic Toxicology**, n. 90, p. 182-187. 2008.

COSTA, J. R. M. A. **Padronização de metodologias para o uso de biomarcadores de contaminação ambiental em Traíra (*Hoplias malabaricus*, erythrinidae): δ -Alad, metalotioneína e vitelogenina**. 2006. 132 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, 2006.

DAVANSO, M. B. **Abordagens biológicas como instrumento de avaliação de risco ambiental em estuários da Região Metropolitana de Fortaleza - CE: biomarcadores e toxicidade de sedimentos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza, 2010.

DAVANSO, M. B.; MOREIRA, L.B.; PIMENTEL, M. F.; COSTA-LOTUFO, L.V. Moledo de Souza Abessa, D., Biomarkers in mangrove root crab *Goniopsis cruentata* for evaluating quality of tropical estuaries, **Marine Environmental Research**. 2013. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.02.006>>

DEVLIN, R.H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, p.191-364. 2002.

DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The Toxicology of Fishes**. Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.

DI GIULIO, R. T.; MEYER, J. N. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. *In*: DI GIULIO, R.T.; DAVID, E. H. (Eds.). **The Toxicology of Fishes**. Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.

DIAS, F. J. S. **Hidrodinâmica das descargas fluviais para o estuário do Rio Jaguaribe (CE).** Tese (Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza, 2007.

DINIZ, M. S.; PERES, I.; PIHAN, J. C. Comparative study of the estrogenic responses of mirror carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated municipal sewage effluent (Lisbon) during two periods in different seasons. **Science of The Total Environment**, v. 349, p. 129-139. 2005.

DINIZ, M. S. *et al.* Assessing the estrogenic potency in a Portuguese wastewater treatment plant using an integrated approach. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 10, p.1613-1622. 2010.

DOUXFILS, J. *et al.* Do sewage treatment plant discharges substantially impair fish reproduction in polluted rivers? **Science of The Total Environment**, n. 372, p. 497-514. 2007.

DUARTE, P. A. F. **Novos poluentes. Principais impactes de compostos desreguladores endócrinos na saúde pública.** Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

ELLMAN, G.L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, n. 7, p. 88-95. 1961.

ESCHRIQUE, S.A. *et al.* Hidrogeoquímica do fósforo no estuário do Jaguaribe (CE). **Brazilian Journal of Oceanography**, São Paulo, Volume Especial do III SBO: Oceanografia e Mudanças Globais, p. 629-647. 2008.

ESPLUGAS, S. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine

disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p. 631-642. 2007.

EVANS, T. J. Reproductive toxicity and endocrine disruption. *In*: GUPTA, R.C. (ed). **Veterinary Toxicology**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 206-244, 1381 p.

FÁVARO, L. F. *et al.* Environmental influences on the spatial and temporal distribution of the puffer fish *Sphoeroides greeleyi* and *Sphoeroides testudineus* in a Brazilian subtropical. **Neotropical Ichthyology**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 275-282, abr./jun. 2009.

FÁVARO, L. F.; OLIVEIRA, E. C. Ecologia reprodutiva em peixes. *In*: RIBEIRO, C. A. O.; GRÖTZNER, S. R.; REIS FILHO, H. S. **Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia**. Santos: Santos Editora, 2012. 422 p.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, n. 455, p. 81-95. 2000.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, n. 76, p. 122-159. 2006.

FERNANDEZ, M. A. *et al.* Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 463-76. 2002.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil**. VI. Teleostei (5). São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 2000.

FROEHNER, S. *et al.* Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, Cidade, v. 64, p. 75-79. 2012.

FROESE, R.; PAULY, D. (eds). **FishBase**. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>> Acesso em: 21 jan. 2013.

GAGNÉ, F. *et al.* Toxicological effects of primary-treated urban wastewaters, before and after ozone treatment, on freshwater mussels (*Elliptio complanata*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, n. 4, p. 542-552. 2007

ANKLEY, G. *et al.* Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n. 3, p. 168–178. 2009.

GERAUDIE, P.; GERBRON, M.; MINIER, C. Seasonal variations and alterations of sex steroid levels during the reproductive cycle of male roach (*Rutilus rutilus*). **Marine Environmental Research**, v. 69, p. 53-55. 2010.

GERAUDIE, P. *et al.* Brain cytochrome P450 aromatase activity in roach (*Rutilus rutilus*): Seasonal variations and impact of environmental contaminants). **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 378–384. 2011.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, São

Paulo, v. 30, n. 3, p. 695-706. 2007.

GIMENO, S. *et al.* Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. **Aquatic Toxicology**, v. 43, p.77-92. 1998.

GORAYEB, A.; SILVA, E. V.; MEIRELES, A. J. A. Meio ambiente e condições de sustentabilidade da planície flúvio marinha do rio Pacoti - Ceará - Brasil. **Geoambiente On line** Revista eletrônica do curso de geografia do Campus Jataí, UFG, Jataí, n. 2. 2004. Disponível em: < <http://revistas.jatai.ufg.br/index.php/geoambiente/article/view/17> >. Acesso em: 05 de junho de 2013.

GUERREIRO, P. M. *et al.* Calcium balance in sea bream (*Sparus aurata*): the effect of oestradiol-17 β . **Journal of Endocrinology**, v. 173, p. 377-385. 2002.

GUILLETTE Jr., L.J. *et al.* Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 8, p. 680-688. 1994.

HALM, S. *et al.* Exposure to exogenous 17 β -oestradiol disrupts P450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Aquatic Toxicology**, v. 60, p. 285-299. 2002.

HASHIMOTO, S. *et al.* Gonadal histology and serum vitellogenin levels of bigeye tuna *Thunnus obesus* from the Northern Pacific Ocean--absence of endocrine disruption bio-indicators. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 459-465. 2003.

HINFRAY, N. *et al.* Endocrine disruption in wild populations of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 2146-2154. 2010.

HIRAI, N. *et al.* Feminization of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β -estradiol: Effect of exposure period on spawning performance in sex-transformed females. **Aquatic Toxicology**, v. 79, p. 288-295. 2006.

IRVING, M. A.; OLIVEIRA, A. M. E.; LIMA, H. H. Aspectos bioecológicos do Estuário do Rio Pacoti, Ceará, Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, Cidade, v. 27, p. 91-100. 1988.

JOBLING, S.; TYLER, C. R. Endocrine disruption in wild freshwater fish. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n.11-12, p. 2219-34. 2003.

JOBLING, S. *et al.* Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. **Environmental Science & Technology**, 32, 2498-2506. 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de Citologia e Histologia. São Paulo: Livraria e Editora Santos, 123p. 1983.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the Several Activities of the Glutathione-S-Transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 25, n. 20, p. 6183-68, 1976.

KIRSCHBAUM, A.A.; ASSUNÇÃO, A. Utilização de parâmetros hematológicos e biomarcadores de cito e genotoxicidade em robalo-peva, *Centropomus parallelus*, provenientes do sistema estuarino de São Vicente. 2006. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Santa Cecília, Santos, 2006

KUSTER, M. *et al.* Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, p. 997-1003. 2009.

LACERDA, L. D. *et al.* Estimating the importance of natural and anthropogenic sources on N and P emission to estuaries along the Ceará State Coast NE Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, n. 141, p. 149-164. 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685. 1970.

LANDSBERG, J. H. *et al.* Saxitoxin Puffer Fish Poisoning in the United States, with the First Report of Pyrodinium bahamense as the Putative Toxin Source. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 10, out. 2006.

LAROSE, C. *et al.* Toxicological effects of methylmercury on walleye (*Sander vitreus*) and perch (*Perca flavescens*) from lakes of the boreal forest. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 147, p. 139–149. 2008.

LEATHERLAND, J. F. Introduction: Diagnostic Assessment of Non-infectious Disorders. In _____, J. F.; WOO, P. T. K. (eds.). **Fish Diseases and Disorders**. Preston: Fishing News Books, 2010. 403 p. p. 1-18.

LEHUGEUR, L. G. O. **Zona costeira brasileira e gerenciamento com ênfase à costa cearense**. 2002. 77p. Material didático de apoio à disciplina Ambientes Costeiros de Sedimentação (Pós-Graduação em Geologia e em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, 2002.

LEINO, R.L.; JENSEN, K. M.; ANKLEY, G. T. Gonadal histology and characteristics histopatology associated with endocrine disruption in the adult female minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 85-98. 2005.

LEMOS, R. H. S. **Ecomorfologia de dez espécies de peixes marinhos mais abundantes de Galinhos/RN**. 2006. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

LEONARDI, M. *et al.* Vitellogenin of the Chilean flounder *Paralichthys adspersus* as a biomarker of endocrine disruption along the marine coast of the South Pacific. Part I: induction, purification, and identification. **Fish physiology and biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 757-65. 2009.

LOPES, V. D. Acúmulo de metais traço cobre (Cu) e zinco (Zn) em viveiros e cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*). 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza, 2008.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 193, p. 265–275. 1951.

MANIERO, M.G.; BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Degradation and estrogenic activity removal of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol by ozonation and O₃/H₂O₂. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 105–115. 2008.

MARANHO, L. A. **The use of biomarkers responses for the environmental quality assessment of two Brazilian estuaries - Santos and Paranagua**. Dissertação (European Joint Master in Water and Coastal Management) – Department of Physical-Chemistry, Marine Science Faculty, Universidad de Cádiz (UCA), Cádiz, 2010.

MARKEY, C. M. *et al.* Endocrine disruptors: from wingspread to environmental developmental biology. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 83, p. 235-244. 2003.

MARQUES Jr., A. N.; MORAES, R. B. C.; MAURAT, M. C. Poluição Marinha. *In*: PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. (eds.). **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. 382 p. p. 311-332.

MARTÍN-DÍAZ, M. L. *et al.* Biomarkers as tools to assess sediment quality: Laboratory and field surveys. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 10-11. 2004.

MARTÍN-DÍAZ, M. L. *et al.* Biomarkers study for sediment quality assessment in Spanish Ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 66-76. 2007a.

MARTÍN-DÍAZ, M. L. *et al.* Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. **Environmental pollution**, v. 151, n. 3, p. 631-40. 2007b.

MARTÍN-DÍAZ, M. L.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C. The use of biochemical responses to assess ecotoxicological effects of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) after injection in the mussel *Elliptio complanata*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 237–42. 2009.

MATOZZO, V. *et al.* Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. **Environment International**, v. 34, p. 531-545. 2008.

MATOZZO, V.; MARIN, M. G. Can 17- β estradiol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 38-44. 2008.

McFARLAND, V. A., *et al.* Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 37, p. 236-241. 1999.

MELANCON, M. J. Bioindicators of contaminant exposure and effect in aquatic and terrestrial monitoring. *In*: HOFFMAN, D. J. *et al.* (Eds.). **Handbook of ecotoxicology**. 2. ed. Boca Ratón: Lewis Publishers, 2003.

MEZIN, L. C., HALE, R.C. Effects of contaminated sediment on the epidermis of mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 2779-2787. 2000.

METCALF, C. D.; KIDD, K. A.; SUMPTER, J. P. Chemically induced alterations to gonadal differentiation in fish. *In*: Leatherland, J.F. & Woo, P.T.K. (eds.). **Fish Diseases and Disorders**. Preston: Fishing News Books, 2010. 403 p. p. 144-165.

MONCAUT, N.; NOSTRO, F.; MAGGESE, M. C. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17 β : Effects on liver and gonads. **Aquatic Toxicology**, v. 63, p. 127-137. 2003.

MORRISON, C. M.; FITZSIMMONS, K.; WRIGHT Jr., J. R. **Atlas of Tilapia Histology**. Portland: Book News, World Aquaculture Society, 2006.

MORRISON, J. Normal Histology. *In*: MORRISON, J. *et al.* **Fish Histology and Histopathology Manual**. Shepherdstown: United States Fish and Wildlife Service's National Conservation Training Center, 2007.

MOURA Costa, D. D. **Caracterização da vitelogênese em *Rhamdia quelen* e sua aplicação no monitoramento de desreguladores endócrinos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná. 2012.

MOURA COSTA, D. D. *et al.* Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 151, n. 2, p. 248-257. 2010.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. Introdução de agentes químicos no ambiente. *In*: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. cap. 2. p.15-38.

NAGAHAMA, Y. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish, *In*: NORBERG, B. *et al.* (Ed.). **Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. Department of Fisheries and Marine Biology, University of Bergen: Bergen. ISBN 82-7461-048-2. 499 p. 4-9 Jul. 1999.

NASCIMENTO, F. R., 2003. **Recursos Hídricos e Desenvolvimento Sustentável: Manejo Geoambiental na Sub-Bacia do Baixo Pacoti - Ceará**. Dissertação (Mestrado em Geologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

NEWMAN, M. C.; UNGER, M.A. *Fundamentals of Ecotoxicology*. 2. Ed. New York: Lewis Publishers, 2003. 458 p.

NILLIN, J. G. *Avaliação da qualidade do sedimento do estuário do Rio Ceará*. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007. 107p.

NILLIN, J. *et al.* (2013). Sediment quality assessment in a tropical estuary: The case of Ceará River, Northeastern Brazil. **Marine Environmental Research**, *in press*, 2013.

NOLETO, R. B. Cariótipo e mapeamento cromossômico de sequencias repetitivas em peixes marinhos com ênfase em tetraodontiformes do litoral paranaense. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Setor de Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. **Report of the OECD Expert Consultation on Testing in Fish**. Paris: OECD, 2000.

OKOUMASSOUN, L. E. *et al.* Vitellogenin in tilapia male fishes exposed to organochlorine pesticides in Ouémé River in Republic of Benin. **Science of the Total Environment**, v. 299, p. 163-172. 2002.

OLEA, N. *et al.* Disruptores endócrinos: una historia muy personal y con múltiples personalidades. **Gaceta Sanitária**, Cidade, v. 16, n. 3, p. 209-211. 2002.

OLIVEIRA, M. *et al.* (2008) Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata* – An integrated biomarker approach. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 959–967. 2009.

OLIVEIRA, C. A. R.; REIS, H. S.; GROTZNER, S. R. Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia. Santos: Santos Editora LTDA, 2012. 422 p.

OLIVEIRA, P. R. *et al.* Barceló, D. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. **Chemosphere**, v. 82, n. 6, p. 789-799. 2011.

PAIT, A. S.; NELSON, J. O. Endocrine Disruption in Fish An Assessment of Recent Research and Results. **Memorando Técnico NOAA**. n. 149. Maryland: Silver Spring, NOAA, NOS, Center for Coastal Monitoring and Assessment, 2002. 55 p.

PAIT, A. S.; NELSON, J. O. Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killifish) induced by selected estrogenic compounds. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 331-34, mar. 2003.

PANTER, G. H. *et al.* Development of chronic tests for endocrine active chemicals Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 279-290, mai. 2006.

PEREIRA, C. D. S. *Biomarcadores de exposição, efeito e bioacumulação de xenobióticos em mexilhões Perna perna (Linnaeus, 1758) transplantados ao longo do litoral de São Paulo*. 2008. (Doutorado em Ciências, área de Oceanografia Biológica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. 180p.

PEREIRA, R. O., *et al.* Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. **Chemosphere**, v. 82, p. 789–799. 2011.

PINTO, P. I. S. *et al.* Immunohistochemical detection of estrogen receptors in fish scales. **General and Comparative Endocrinology**, v. 160, p. 19-29, jan. 2009.

PORTE, C. *et al.* Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Parte C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 3, p. 303-315, jul. 2006.

POSSATTO, F. E. **Dinâmica de crescimento e peso de *Sphoeroides testudineus* (Actinopterygii, Tetraodontidae) a gamboa do Peraquê (PR - BRASIL)**. 2006. Monografia (Bacharelado em Oceanografia) - Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2006.

PRADO, P.S. *et al.* Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 74, n. 7, p.1879-87, out. 2011.

PRODOCIMO, V., FREIRE, C. A. Estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) submitted to sea water dilution during ebb tide: a field experiment. **Marine Freshwater Behaviour Physiology**, v. 37, p. 1-5, mar. 2004.

QUEIROZ, A. B. J. **Análise ambiental do estado de conservação do baixo curso do Rio Pacoti – Ceará**. 2005. 117p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Departamento de Geografia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

RAND, G. M. Fish Toxicity Studies. *In*: DI GIULIO, R.T.; DAVID, E. H. (Eds.). **The Toxicology of Fishes**. Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.

RASMUSSEN, T. H.; KORSGAARD, B. Estrogenic octylphenol affects seminal fluid production and its biochemical composition of eelpout (*Zoarces viviparus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 139, n. 1-3, p.1-10. 2004.

RIBEIRO, C. A. O. *et al.* Cito e Histopatologia: Avaliação de Estresse Químico. *In*: _____, C. A. O.; GRÖTZER, S. R.; DOS REIS FILHO, H. S. **Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia**. São Paulo: Santos Editora LTDA, 422p. 2012.

RIBEIRO, E. A. **Efeitos de concentrações subletais dos hidrocarbonetos poliaromáticos específicos BTX (benzeno, tolueno e xileno) no peixe (*Sphoeroides testudineus* Linnaeus, 1758) através de biomarcadores bioquímicos e histológicos**. 2007. Tese (Doutorado em Biología Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal Paraná, Curitiba, 2007.

ROCHA C., FAVARO L. F., SPACH H. L. Biología reprodutiva de *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus) (Pisces, Osteichthyes, Tetraodontidae) da gamboa do Bagaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 19. n. 1. p. 57-63. nov. 2000/jan. 2002.

ROEPKE, T. A.; SNYDER, M. J.; CHERR, G. N. Estradiol and endocrine disrupting compounds adversely affect development of sea urchin embryos at environmentally relevant concentrations **Aquatic Toxicology**, v. 71, n. 2, p.155-173, jan. 2005.

ROUBAL, W. T. *et al.* Purification and Partial Characterization of English Sole (*Pleuronectes vetulus*) Vitellogenin. **Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, p. 613-622, nov. 1997.

ROY, R. L. *et al.* Purification of vitellogenin from smooth flounder (*Pleuronectes putnami*) and measurement in plasma by homologous ELISA. **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 139, p. 235-244. 2004.

SALE, P. F. *et al.* **Stemming Decline of the Coastal Ocean: Rethinking Environmental Management**. United Nations University-INWEH, 2008. 42 p.

SANCHEZ, W. *et al.* Assessment of estrogenic effects in the three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) using vitellogenin measurement by ELISA method. *In*: 15TH Annual Meeting Of Society Of Environmental Toxicology And Chemistry, 2005, Lille, France, 2005.

SANCHEZ, W. *et al.* Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 279–287. 2007.

SANCHEZ, W. *et al.* Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. **Environment International**, v, 34, p.791–798. 2008a.

SANCHEZ, W. *et al.* Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: A multiparametric approach. **Environment International**, v. 34, p. 490–498. 2008b.

SANCHEZ-CÁRDENAS, R. *et al.* Reproductive aspects of *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842) (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) inhabiting the Mazatlan coast, Sinaloa, Mexico. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, Valparaíso, v. 42, n. 3, p. 385-392, dec. 2007.

SCBD - Secretariat of the Convention on Biological Diversity. **Marine Biodiversity—One Ocean, Many Worlds of Life**. Edição. Montreal: SCBD, 2012. 77 p.

SCHLENK, D. *et al.* Biotransformation in Fishes. *In*: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The Toxicology of Fishes**. Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008a.

SCHLENK, D. *et al.* Biomarkers. *In*: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The Toxicology of Fishes**. Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008b.

SCHOLZ, S.; KLÜVER, N. Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish. **Sexual Development**, Basel, n. 3, p.136151, ago. 2009.

SCHULTZ, Y. D.; FÁVARO L. F.; SPACH, H. L. Aspectos reprodutivos de *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert), Pisces, Osteichthyes, Tetraodontidae, da gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 65-76. nov./jan. 2002.

SCHWINDT, A. R., FEIST, G. W., SCHERECK, C. B. Stress does not inhibit induced vitellogenesis in juvenile rainbow trout. **Environmental Biology of Fishes**, v. 80, n.4, p.453-463, dec. 2007.

SEMACE - Superintendência Estadual do Meio Ambiente. Plano de manejo do estuário do Rio Ceará. **Biblioteca Virtual SEMACE**. Disponível em <http://antigo.semace.ce.gov.br/biblioteca/legislacao/conteudo_legislacao.asp?cd=75>. Acesso em: 4 mar. 2013.

SEPÚLVEDA, M. S. *et al.* An evaluation of biomarkers of reproductive function and potential contaminant effects in Florida large-mouth bass (*Micropterus salmoides floridanus*) sampled from the St. Johns River. **Science of The Total Environment**, v. 289, p. 133-144, abr. 2002.

SIMÕES, P. M. S. V. **Contribuição para o estudo da presença e remoção de compostos emergentes de filtros UV em ETAR**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária) - Programa de Pós-graduação em Engenharia do Ambiente, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

SODRÉ, F. F. *et al.* Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 92-98, set. 2010.

SODRÉ, F. F. *et al.* Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 2, p. 187-196, mai. 2007.

SOLÉ, M., BARCELÓ, D., PORTE, C. Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants. **Aquatic Toxicology**, v. 60, p. 233–248. 2002.

SOLÉ, M. *et al.* Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 136, p.145-156, out. 2003a.

SOLÉ, M. *et al.* Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p.373-380, 2003b.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 65, p.143-150, abr./jun.1998.

SOUSA, E. C. P. M. Toxicologia Marinha: Histórico. *In*: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (eds.), **Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil**. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda, 2002. 262 p. p. 9-14.

SPONZA, D. T. Application of toxicity tests into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 1, p. 74-86, jan. 2003.

STOKER, C. *et al.* Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in Caiman latirostris. **General and Comparative Endocrinology**, v. 156, p.603-612, mai. 2008.

SVENSSON, B. M. *et al.* *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachatewater from landfills. **Environmental Monitoring and Assessment**, n. 102, p. 309-321. mar. 2005.

TARGETT, T. E. Food Resource Partitioning by the Pufferfishes *Sphoeroides spengleri* and *S.lesudineus* from Biscayne Bay, Florida. **Marine Biology**, v. 49, p. 83-91. 1978.

TAYLOR, M. R. *et al.* A research strategy for investigating the ecological significance of endocrine disruption: report of a UK workshop. **The Science of the Total Environment**, v. 233, p. 181-191, ago. 1999.

THOMAS, P. The Endocrine System, *In*: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The Toxicology of Fishes**. Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.

TOFT, G.; BAATRUP, E. Altered sexual characteristics in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to 17 β -estradiol and 4-tert-octylphenol during sexual development. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 228–237, out. 2003.

TOFT, G.; BAATRUP, E. Sexual Characteristics Are Altered by 4-tert-Octylphenol and 17 β -Estradiol in the Adult Male Guppy (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p.76-84, jan. 2001.

TOWBIN, H., STAEHELINT, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 76, n.9, p. 4350-54, set. 1979.

TYLER, C. R.; ROUTLEDGE, E. J.; AERLE, R. Estrogenic Effects of Treated Sewage Effluent on Fish: Steroids and Surfactants in English Rivers *In*: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The Toxicology of Fishes**. Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.

UNITED STATES, 2009. Department of the Interior Bureau of Reclamation. Secondary/Emerging Constituents Report, Southern California Regional Brine-Concentrate Management, Study – Phase I, Lower Colorado Region, 2009.

USEPA - United States - Environmental Protection Agency, 2003. Draft final report on comparative evaluation of vitellogenin methods. EPA CONTRACT NUMBER 68-W-01-023 WA 3-5, 2003.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, n. 13, p. 57-149, fev. 2003.

VÁZQUEZ, G. R. *et al.* Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C:**

Toxicology And Pharmacology, v. 150, p. 298-306, ago. 2009.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia Reprodutiva de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática**. Maringá: Ed. Univ. Estadual de Maringá, 1996.

VEHNIAINEN, E. R. *et al.* More accuracy to the EROD measurements - The resorufin fluorescence differs between species and individuals. **Aquatic Toxicology**, v, 116–117, p. 102–108. 2012.

VERBINNEN, R. T.; NUNES, G. S. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando clae-dad. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p.1837-42, ago. 2010.

VIARENGO, A. *et al.* A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, n. 44, p .69-84, jul. 1997.

VILLELA, I. *et al.* DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research**, n. 605, p.78-86, jun. 2006.

WALKER, C. H. *et al.* **Principles of Ecotoxicology**, Londres: Taylor & Francis, 1996. 309 p.

WHO - World Health Organization, 2002. Damstra, T.; Barlow, S.; Bergman, A.; Kavlock, R.; Van Der Kraak, G. (eds.), International Programme on Chemical Safety. Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors. 2002.

WILLS, E. D. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. *In*: SNELL, K., MULLOCK, B. (eds.). **Biochemical Toxicology: A Practical Approach**. Washington: IRL Press, 1987. p. 127-150.

WITORSCH, R. J. Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted? **Regul. Toxicol. Pharmacol**,v.36, p.118–130, AGO.2002.

YAMAZAKI, F. Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, v. 33, p. 329-354, jun. 1983.

ZAMBONI, A. J; ABESSA, D. M. S. Tríade da qualidade de sedimentos. *In*: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (eds.), **Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil**. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda , 2002. 262 p.

ZEE - ZONEAMENTO ECONÔMICO E ECOLÓGICO – SEMACE/LABOMAR. **Diagnóstico sócio-econômico da Zona Costeira do Estado do Ceará**. (Zoneamento Ecológico-Econômico do Litoral e Ecossistemas associados do Estado Ceará – ZEE, 2005). Fortaleza – CE, 2005a.

ZEE - ZONEAMENTO ECONÔMICO E ECOLÓGICO – SEMACE/LABOMAR. **Estimativas de cargas de nitrogênio, fósforo e metais pesados de interesse ambiental para as bacias inferiores do litoral do Estado do Ceará**. (Zoneamento Ecológico-

Econômico do Litoral e Ecossistemas associados do Estado Ceará – ZEE, 2005). Fortaleza – CE, 2005b.

ZLABEK, V. *et al.* Sex differentiation and vitellogenin and 11-ketotestosterone levels in chub, *Leuciscus cephalus* L., exposedj to 17 beta-estradiol and testosterone during early development. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, p. 280-284. mar. 2009.

ANEXO 1. Decreto estadual de criação da Área de Proteção Ambiental (APA) do Rio Pacoti.
Fonte: http://antigo.semace.ce.gov.br/biblioteca/legislacao/conteudo_legislacao.asp?cd=75.

Decreto Nº 25.778, de 15 de Fevereiro de 2000 (DOE - 17.02.2000).

O GOVERNADOR DO ESTADO DO CEARÁ, no uso das atribuições que lhe confere o art. 88, incisos IV e VI, da Constituição Estadual, tendo em vista o disposto nos arts. 8º e 9º, inciso VI das Leis Federais n.º 6.902 de 27 de abril de 1981 e 6.938 de 31 de agosto de 1981, respectivamente.

CONSIDERANDO a riqueza e relevância dos ecossistemas presentes no entorno do Rio Pacoti, manguezal, cordão de dunas, matas de tabuleiro e ciliar, região de equilíbrio ecológico bastante frágil e passível, portanto de uma proteção especial por parte do poder público e da sociedade;

CONSIDERANDO a necessidade de preservar a foz do Rio Pacoti e áreas verdes componentes do seu ecossistema na porção leste da Região Metropolitana de Fortaleza, dada a crescente ocupação que nesta se verifica;

CONSIDERANDO a expansão do setor turístico no Estado do Ceará, que implica na preservação de nossas paisagens naturais, pressupondo para a sustentabilidade desta atividade e a mobilização dos diversos setores da sociedade civil em defesa da preservação do Rio Pacoti e dos seus ecossistemas;

CONSIDERANDO a existência de áreas com baixa ou nenhuma ocupação, com relevante interesse ecológico para a região e sem proteção jurídica adequada, a importância de manter espaços para o desenvolvimento de pesquisas e projetos de educação e zoneamento ambiental, na região do baixo Pacoti, no Estado do Ceará;

CONSIDERANDO a importância da bacia do Rio Pacoti para o Sistema de Abastecimento d'água da capital, DECRETA:

Art. 1º - Sob a denominação de APA DO RIO PACOTI, fica declarada Área de Proteção Ambiental (APA) a área situada entre os municípios de Fortaleza, Eusébio e Aquiraz, todos no Estado do Ceará, compreendendo o Rio Pacoti, suas margens e terrenos contíguos, com 2.914,93 ha (dois mil, novecentos e quatorze hectares e noventa e três centésimos de hectares) e perímetro de 28.128,97m (vinte e oito mil, cento e vinte e oito metros e noventa e sete centímetros), definidos no Anexo I a III, integrantes deste Decreto.

Art. 2º - A declaração de que trata o artigo anterior, além de possibilitar um controle e manejo mais eficaz sobre os ecossistemas do entorno do Rio Pacoti, tem por objetivos específicos:

- I. Proteger a biodiversidade e assegurar o desenvolvimento das comunidades bióticas nativas;
- II. Garantir qualidade satisfatória dos recursos hídricos enfatizando-se o lençol freático, a conservação dos leitos naturais das águas fluviais e sua área de esparimento, evitando o assoreamento e as agressões por poluentes;

- III. Preservar as margens do Rio Pacoti, sua mata ciliar e a mata nativa de tabuleiro;
- IV. Proporcionar à população regional métodos e técnicas apropriadas ao uso dos recursos naturais, de maneira a não interferir no funcionamento dos refúgios ecológicos, assegurando a sustentabilidade, com ênfase na melhoria da qualidade de vida da população local.
- V. Ordenar o turismo ecológico, científico e cultural, e as demais atividades econômicas compatíveis com a conservação ambiental;
- VI. Desenvolver na população regional uma consciência ecológica e conservacionistas;
- VII. Proteger o cordão dunar, a vegetação fixadora das dunas, ecossistemas fundamentais para a recarga dos mananciais e dos recursos hídricos;
- VIII. Preservar o manguezal e a região meândrica do Rio Pacoti, para dar suporte à reprodução de inúmeras espécies da flora e da fauna aquáticas, garantindo a sustentabilidade das atividades pesqueiras;
- IX. Controlar e ordenar o uso do solo na região, disciplinado a crescente expansão ocupacional;
- X. Controlar e fiscalizar as atividades degradadoras da qualidade ambiental;
- XI. Preservar o leito natural do Rio Pacoti e as áreas de amortecimento de cheias, garantindo o escoamento para a vazão máxima do rio, evitando os problemas de inundações;
- XII. Assegurar o desenvolvimento de projetos agrícolas orgânicos nas áreas destinadas à agricultura;
- XIII. Preservar a beleza cênica da área, garantindo a integridade da paisagem.

Art. 3º - Na APA do Rio Pacoti ficam proibidas as seguintes atividades:

- I. Implantação ou ampliação de atividades potencialmente poluidoras ou degradadoras, capazes de afetar os mananciais de água, formas do relevo, cobertura vegetal, o solo e o ar;
- II. Desmatamento total ou parcial de áreas de preservação permanente definidas no Código Florestal, Lei Federal n.º 4.771, de 15 de setembro de 1965, artigos 2º e 3º e conforme disposto no Decreto Estadual n.º 24.221, de 12 de setembro de 1996;
- III. Atividades de terraplanagem, abertura de estradas, drenagem e escavação que venham a causar danos ou degradação do meio ambiente e/ou perigo para pessoas ou para a biota, salvo em casos constantes na Instrução Normativa e devidamente aprovados pelo Comitê Gestor, devidamente constituído, com posterior homologação pela SEMACE;
- IV. Mineração;
- V. Exercício de atividades capazes de provocar erosão das terras e/ou um acentuado assoreamento das coleções hídricas;

VI. Qualquer forma de utilização que possa poluir ou degradar os recursos hídricos abrangidos pela APA do Rio Pacoti, como também, o lançamento de efluentes, resíduos ou detritos capazes de provocar dano ao meio ambiente;

VII. Exercício de atividades que impliquem matança, captura, extermínio ou molestamento de quaisquer animais silvestres;

VIII. Parcelamento do solo nas áreas de preservação permanente, estabelecidas em Instrução Normativa que regulamentará este Decreto, e nas demais áreas quando não apresentar prévia autorização da Superintendência Estadual do Meio Ambiente - SEMACE, antecedida dos respectivos estudos de impacto ambiental e relatório de impacto ambiental, nos termos das prescrições legais e regulamentares de acordo com os artigos 11 e 14 da Lei Estadual n.º 11.411, de 28 de dezembro de 1987;

IX. Uso de equipamentos náuticos motorizados não autorizados pela SEMACE e que não se destinem as seguintes finalidades:

a) Turismo;

b) Pesca;

c) Pesquisa;

d) Fiscalização.

X. O tráfego de dunas de vegetação de veículos automotores não autorizados pela SEMACE;

XI. O desmonte ou atividades que danifique a vegetação fixadora das dunas;

XII. Queimadas;

XIII. Corte de madeira com fins comerciais e/ou de produção de carvão vegetal;

XIV. O uso de agrotóxicos, fertilizantes químicos ou biocidas em desacordo com as normas ou recomendações técnicas estabelecidas;

XV. O despejo de lixo ou qualquer resíduo sólido na interior da APA;

XVI. As demais atividades danosas previstas na legislação ambiental.

Parágrafo Único - As áreas não ocupadas e recobertas com vegetação, somente poderão ser desmatadas, para qualquer tipo de atividade mediante licença prévia apreciada pela entidade gestora prevista neste Decreto.

Art. 4º A construção ou reforma de unidades multifamiliares, conjuntos habitacionais, hotéis, clubes e assemelhados na APA do Rio Pacoti dependerão de prévio licenciamento da Superintendência Estadual do Meio Ambiente - SEMACE, que somente poderá ser concedido:

I. Respeitando o zoneamento ambiental estabelecido na Instrução Normativa que regulamentará este Decreto

II. Após a realização do estudo prévio de impacto ambiental, exame das alternativas e a avaliação de suas conseqüências ambientais;

III. Mediante a indicação das restrições e medidas consideradas necessárias à salvaguarda do ecossistema da APA.

Parágrafo Único - Em nenhuma hipótese será concedido o licenciamento previsto neste Artigo, quando se tratar de área de preservação permanente definida nos artigos 2º e 3º da Lei Federal n.º 4.771, de 15 de setembro de 1965 e Decreto Estadual n.º 24.221, de 12 de setembro de 1996.

Art. 5º - A APA do Rio Pacoti obedecerá ao seguinte macro zoneamento:

I. Zona de Proteção Integral;

II. Zona de Uso Sustentável;

III. Área Especial de Conservação.

§ 1º - A Zona de Proteção Integral obedece os limites estabelecidos neste Decreto, ficando caracterizada como área de preservação permanente, conforme disposto na Lei Federal n.º 4.771, de 15 de setembro de 1965.

§ 2º A Zona de Uso Sustentável obedece a delimitação estabelecida neste Decreto, definida a partir dos limites da Zona de Proteção Integral, sendo nela permitidos os usos descritos na Instrução Normativa que regulamenta este Decreto.

§ 3º - A Área Especial de Conservação integra a região com 94,52 ha (noventa e quatro hectares e cinquenta e dois centésimos de hectares) delimitada por uma poligonal de 4.891,89m (quatro mil, oitocentos e noventa e um metro e oitenta e nove centímetros) de perímetro contida na APA do Rio Pacoti, destinada a proteger especialmente a mata nativa de tabuleiro, conforme Anexos II e III integrantes deste Decreto.

§ 4º - A Área Especial de Conservação, pelas peculiaridades do ecossistema que abriga, será regulamentada por Instrução Normativa específica que disporá sobre o uso do solo e as atividades econômicas permitidas em seu interior, obedecendo as seguintes diretrizes:

a) Proteção da mata nativa de tabuleiro existente;

b) Estabelecimento de uma faixa de transição entre a área de preservação permanente e a área passível de ocupação;

c) Uso voltado preferencialmente para empreendimentos de turismo, lazer, educação, cultura e pesquisa;

d) Definição da taxa de ocupação permitida na área.

Art. 6º - Serão adotadas as seguintes medidas prioritárias para assegurar o pleno funcionamento da APA do Rio Pacoti:

I. Zoneamento a ser efetivado através de Instrução Normativa, indicando as atividades a serem incentivadas em cada zona como as proibidas ou restringidas;

II. Demarcação em campo com marcos físicos ao longo das Zonas de Proteção Integral;

III. Ampla divulgação das medidas previstas neste Decreto, objetivando o esclarecimento da comunidade em geral e suas finalidades;

IV. Identificação e controle das fontes poluidoras e seus responsáveis através de estrutura de fiscalização da SEMACE;

V. Elaboração de planos de recuperação das áreas degradadas;

VI. Adoção de providência para a retirada de detritos acumulados às margens do Rio Pacoti;

VII. Incremento da fiscalização e monitoramento, através de convênios entre entidades governamentais e não governamentais.

Art. 7º - A gestão ambiental da APA do Rio Pacoti será realizada pela SEMACE em parceria com o Comitê Gestor constituído paritariamente com representantes de órgãos e instituições públicas e setores da sociedade civil organizados, a ser regulamentado pela Instrução Normativa.

Art. 8º - O licenciamento ambiental e a fiscalização de que trata este Decreto serão realizados pela Superintendência Estadual do Meio Ambiente - SEMACE.

Art. 9º - As atividades, obras ou empreendimentos potencialmente causadores de degradação ambiental a serem implantados na APA do Rio Pacoti devem apresentar estudo de impacto ambiental, a ser aprovado pela SEMACE, e submetido a apreciação pelo COEMA.

Art. 10 - A não observância das disposições contidas neste Decreto sujeitará os infratores às penalidades previstas nas Leis Federal n.º 9.605 de 12 de fevereiro de 1998, Estadual n.º 11.411 de 28 de dezembro de 1987 e 12.488 de 13 de setembro de 1995, na seguinte forma:

I. Advertência;

II. Multa, simples ou diária, de 50 (cinquenta) a 15.000 (quinze mil) vezes o valor nominal da unidade Fiscal de Referência, divulgado pelo Governo Federal na data da infração;

III. Embargo;

IV. Suspensão total ou parcial da atividade;

V. Interdição, definitiva ou temporária de direitos;

VI. Perda ou suspensão, nos termos da legislação aplicável, de financiamentos concedidos por instituições de créditos federais, estaduais ou municipais;

VII. Perda ou restrição de incentivos e benefícios fiscais concedidos pelos poderes públicos Federal, Estadual e Municipal.

§ 1º - As penalidade previstas nos incisos III e IV poderão ser aplicadas sem prejuízo das mencionadas nos incisos I e II deste mesmo artigo.

§ 2º - O degradador é obrigado, sem prejuízo da aplicação das sanções indicadas neste artigo, a reparar os danos causados ao meio ambiente e a terceiros afetados por seu comportamento ou atividade, seja culposo ou doloso.

§ 3º - Na aplicação de multa de que trata o inciso II deste artigo, serão observados os limites previstos na Lei federal n.º 9.605 de 12 de fevereiro de 1998 e nas Leis Estaduais n.ºs 11.411 de 28 de dezembro de 1987, e 12.488 de 13 de setembro de 1995.

§ 4º - Na hipótese de reincidência, a multa simples ou diária, poderá ser aplicada em valor correspondente ao dobro da anteriormente imposta.

§ 5º - A constatação do dano ambiental, para fins de gradação das sanções previstas no § 3º deste artigo, será feita através de relatório técnico, subscrito pelo profissional que realizar a inspeção, o qual disporá sobre sua natureza e magnitude da degradação ou poluição verificada.

§ 6º - No caso de infração continuada, a autoridade competente poderá aplicar multa diária, observados os limites e valores estabelecidos pela lei, que cessará depois de corrigida a irregularidade e não ultrapassará o período de 30 (trinta) dias corridos, contados da sua imposição.

§ 7º - a multa poderá ter sua exigibilidade suspensa se o infrator, mediante termo de compromisso assinado e aprovado pelo órgão ambiental que a aplicou, se obrigar a executar as medidas estabelecidas com o fim de cessar e corrigir a poluição ou degradação ambiental.

§ 8º - As sanções previstas nos incisos III, IV e V deste artigo serão aplicadas nos casos de perigo iminente à saúde pública ou na hipótese de atividades, obras ou empreendimentos que estejam sendo executados em desobediência às prescrições legais e regulamentares, ou em desacordo com licença concedida, caso em que esta poderá ser suspensa ou cassada.

§ 9º - Competirá à autoridade que conceder os benefícios, incentivos ou financiamentos, nos termos da Lei Federal n.º 6.938 de 31 de agosto de 1981, o ato declaratório da suspensão, interdição ou perda, referidos nos incisos IV e VII deste artigo.

§ 10 - As penalidades pecuniárias serão impostas pela Superintendência Estadual do Meio Ambiente - SEMACE mediante Auto de Infração, de acordo com as normas e procedimentos aplicáveis.

Art. 11 - Visando atingir os objetivos deste Decreto, a SEMACE deverá firmar convênios com a Secretaria de Recursos Hídricos - SRH, podendo ainda firmar parcerias com entidades governamentais e não governamentais.

Art. 12 - Os estudos para zoneamento ambiental da APA do Rio Pacoti serão realizados pela SEMACE no prazo de 90 (noventa) dias; a contar da data de publicação deste Decreto, prazo em que também deverá ser baixada a Instrução Normativa que detalhará suas respectivas normas, em especial as contidas nos arts. 3º e 5º.

Art. 13 - Este Decreto entra em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário.

Fortaleza, 15 de fevereiro de 2000.

Tasso Ribeiro Jereissati

GOVERNADOR DO ESTADO DO CEARÁ

Francisco de Queiroz Maia Júnior

SECRETÁRIO DA INFRA-ESTRUTURA

APÊNDICE 1. Valores de peso total corpóreo (g) do baiacu *Sphoeroides testudineus* após exposição ao hormônio feminino¹⁷ β-Estradiol (E2).

Mensurações realizadas no início e no final do experimento, acompanhados pelo delta de variação.

Concentração	p inicial	p final	diferença	Concentração	p inicial	p final	diferença	Concentração	p inicial	p final	diferença
	95,6	94,8	0,8		61	58,6	2,4		41,4	39,8	1,6
	45,2	38,4	6,8		39,6	43,5	-3,9		33,6	37,6	-4
	69,2	63,3	5,9		64,5	57,8	6,7		46,7	42,5	4,2
	64,4	59,8	4,6		93,8	86,4	7,4		96,7	93,1	3,6
	75,9	73	2,9		68,9	66,5	2,4		67,1	64,4	2,7
	64,1	61,9	2,2		86,9	87,5	-0,6		91,1	85,2	5,9
Controle	88,1	89,4	-1,3	5 mg/Kg	65,5	64	1,5	10 mg/Kg	52,8	50,2	2,6
15 dias	66,1	66,3	-0,2	15 dias	65,7	63,3	2,4	15 dias	77,8	74,8	3
	71,8	69,7	2,1		78,3	77,3	1		72,3	70,2	2,1
	23,7	20,3	3,4		36,6	29	7,6		33,3	26,3	7
	35,4	30,2	5,2		37,6	33,4	4,2		48,5	43,7	4,8
	40,5	32,1	8,4		30,3	21,7	8,6		96,3	91,3	5
	26,9	25,1	1,8		31,4	25,3	6,1		36,6	29,3	7,3
Controle	24,5	22,3	2,2		32	23,1	8,9		37,4	34,3	3,1
29 dias	48,5	43,8	4,7		66	61,3	4,7		41,1	27	14,1
	65,9	61	4,9	5 mg/Kg	67,7	64,5	3,2		61,7	55,2	6,5
				29 dias	84,1	81,5	2,6	10 mg/Kg	74,2	63,8	10,4
					96,8	90	6,8	29 dias	76,5	67,3	9,2
									78,7	73,8	4,9

APÊNDICE 2. Valores do índice gônado-somático (IGS) e índice hepato-somático (IHS) do baiacu *Sphoeroides testudineus* após exposição ao hormônio feminino 17 β -Estradiol (E2).

	IGS	IHS		IGS	IHS		IGS	IHS
	0,14	2,55		0,24	1,93		0,18	3,67
	1,15	2,82		0,92	2,06		1,07	1,87
	0,17	3,97		0,31	2,27		0,15	1,83
	0,19	4,19		0,44	3,10		0,24	5,65
	0,24	2,64		0,31	3,21		0,18	2,64
	0,32	1,83		0,18	4,95		0,15	2,51
Controle	0,41	3,10	5mg/Kg	0,28	1,88	10mg/Kg	0,54	1,47
15 dias	0,20	3,15	15 dias	0,36	1,52	15 dias	0,21	3,24
	0,54	1,63		0,21	3,15		0,37	3,94
	1,48	2,39		1,07	1,38		0,17	2,12
	0,07	1,34		0,31	1,11		0,20	2,66
	0,56	1,22		0,49	1,49		0,97	3,64
	0,28	1,22		0,67	1,38		0,34	1,25
Controle	0,13	1,00		0,52	1,31		0,56	1,36
29 dias	0,15	1,42		0,64	3,23		0,33	1,65
	0,57	2,33	5mg/Kg	0,60	2,03		1,31	1,94
			29 dias	0,77	3,20	10mg/Kg	0,91	1,96
				0,75	5,64	29 dias	0,95	2,76
							0,56	3,81