

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**DANO GENÔMICO E O STATUS DE CONSERVAÇÃO DE *Mugil curema*
(ACTINOPTERYGII: MUGILIDAE) EM CINCO SISTEMAS ESTUARINOS DO
ESTADO DE PERNAMBUCO**

Aluno: Anderson Rodrigues Balbino de Lima

Orientador: Dr. Uedson Pereira Jacobina

Coorientadora: Dra. Mônica Lúcia Adam

Recife, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**DANO GENÔMICO E O STATUS DE CONSERVAÇÃO DE *Mugil curema*
(ACTINOPTERYGII: MUGILIDAE) EM CINCO SISTEMAS ESTUARINOS DO
ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Aluno: Anderson Rodrigues Balbino de Lima

Orientador: Dr. Uedson Pereira Jacobina

Coorientadora: Dra. Mônica Lúcia Adam

Recife, 2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lima, Anderson Rodrigues Balbino de

Dano genômico e o status de conservação de *Mugil curema* (Actinopterygii: Mugilidae) em cinco sistemas estuarinos do Estado de Pernambuco/ Anderson Rodrigues Balbino de Lima– Recife: O Autor, 2016.

66 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Uedson Pereira Jacobina

Coorientadora: Monica Lúcia Adam

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia Animal, 2016.

Inclui referência e anexos

- 1. Tainha (peixe) 2. Estuários 3. Pernambuco I. Jacobina, Uedson Pereira (orientador) II. Adam, Monica Lúcia (coorientadora) III. Título**

597.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-160

ANDERSON RODRIGUES BALBINO DE LIMA

**DANO GENÔMICO E O STATUS DE CONSERVAÇÃO DE *Mugil curema*
(ACTINOPTERYGII: MUGILIDAE) EM CINCO SISTEMAS ESTUARINOS DO
ESTADO DE PERNAMBUCO**

Aprovado em 17 / 02 / 2016

Banca Examinadora:

Dr. Uedson Pereira Jacobina
Universidade Federal de Pernambuco
(Departamento de Zoologia)

Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho
Universidade Federal de Pernambuco
(Departamento de Zoologia)

Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza
Universidade Federal de Pernambuco
(Departamento de Botânica)

Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal
Universidade Federal de Pernambuco
(Departamento de Genética)

Recife, 2016

Dedico o presente trabalho ao meu pai **José Rodrigues** e minha mãe **Maria Betânia** pela luta diária para me proporcionar as melhores condições possíveis de vida. O amor que sinto por vocês é incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pois sem ele nada seria possível.

À minha família que considero um presente de valor inestimável dado por **Deus** para me fortalecer diante das dificuldades diárias. Em especial aos meus pais **José Rodrigues** e **Maria Betânia**, meus tios **Luis Rodrigues** e **Zuleide Rodrigues**, minhas irmãs **Anatielly Rodrigues** e **Girlayne Sandrelly** e aos meus amados sobrinhos **Pedro Rodrigues** e **Caroline Rodrigues**.

À minha namorada **Isabela Leão** pela presença marcante em todos os momentos da minha vida, me ajudando nas atividades de campo e aconselhando nos momentos de dificuldade. Assim como toda sua família, na qual sempre encontrei palavras de incentivo. Em especial ao meu cunhado **Neto Ferreira** carinhosamente intitulado “Cunhado Rochedo”, a minha cunhada preferida **Carla Leão** e aos meus futuros sogros **Rose Neide** e **Robson Ferreira**, em vocês deposito meus melhores sentimentos.

À **Dannúbia Pires** por todas as dicas e sugestões prestadas, fundamentais na construção da dissertação.

Aos amigos e compadres **Lucas Seixas** e **Liliana Nascimento** pelo apoio e consideração.

Ao meu orientador **Uedson Jacobina**, pelo suporte, conselhos e orientações que foram fundamentais para meu enriquecimento profissional e pessoal.

À professora **Mônica Adam** pela confiança e por ter acreditado no meu trabalho.

Ao Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental da Universidade Federal de Pernambuco, representado pelo professor **Rodrigo Torres**. Em especial a **Danielle Gama** pelo suporte prestado.

À **Kaline**, **Kelma** e **Marly** fundamentais nos momentos de dificuldade. A amizade que construímos em tão pouco tempo nos une para o resto de nossas vidas.

Aos pescadores que nos auxiliaram em nossas coletas: **Seu Zezinho e Filho**, **Seu Levy e Filho**.

Ao Centro Acadêmico de Vitória pela estrutura fornecida para algumas das etapas analíticas, em especial ao técnico **Rafael Albuquerque** pelas sugestões e presteza.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por todo apoio prestado.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco – **FACEPE** pela bolsa concedida durante todo o período do mestrado.

Ao **CNPq** e **INCT** pelo suporte financeiro fundamental para viabilidade e execução do nosso trabalho.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível”

(Charles Chaplin)

RESUMO

A perda da diversidade biológica pode ser um reflexo da degradação ambiental, principalmente em locais com grandes contingentes demográficos. No Nordeste do Brasil, a maioria das regiões metropolitanas estão concentradas em zonas costeiras, ocasionando a liberação de uma grande quantidade de poluentes e ameaçando a sobrevivência de inúmeras espécies, como os peixes. Neste estudo, tentamos avaliar possíveis danos no DNA em um dos recursos pesqueiros mais consumidos pelas comunidades ribeirinhas nesta região, a tainha (*Mugil curema*). Metodologias de Ensaio Cometa (EC) e Teste do Micronúcleo (MN) foram utilizadas em populações desta espécie, provenientes de cinco estuários Pernambucanos (rios Goiana e Jaguaribe no litoral Norte), (rios Sirinhaém e Formoso no litoral Sul) e (rio Capibaribe na região metropolitana). Para fins de comparação, uma amostra controle foi coletada no estuário do Rio Una (local de preservação ambiental), litoral sul do estado de São Paulo. Nossos resultados mostram que o estuário mais afastado da região metropolitana, o Rio Formoso, quando comparado ao grupo controle, foi quem apresentou os menores níveis de danificação genômica ($P > 0,05$). Já os demais estuários apresentaram níveis elevados de danificação quando comparados ao controle ($P < 0,05$). Em especial, o estuário do rio Capibaribe, localizado na capital Pernambucana, foi aquele que apresentou um dos maiores níveis de dano genômico ($P = 0,0001$). Tais dados caracterizam-no como o mais impactado entre os cinco avaliados. Estes dados também apontam para uma forte associação entre níveis elevados de danificação genômica (macro e microlesões no DNA) em locais próximos a grandes contingentes demográficos e industriais. Conseqüentemente, este cenário de impactação pode também estar afetando a comunidade biótica como um todo, incluindo as comunidades humanas ribeirinhas que tem este recurso como forma de subsistência. Estes resultados demonstram a efetividade do uso de metodologias de EC e MN como protocolos rápidos e precisos na avaliação de ecossistemas marinhos, principalmente em regiões fortemente impactadas pelas atividades antrópicas.

Palavras-chave: ensaio cometa; estuários; impacto ambiental; micronúcleo; poluentes; recurso pesqueiro.

ABSTRACT

The loss of biological diversity may be a reflection of environmental degradation, especially in places with large demographic contingents. In northeastern Brazil, most metropolitan regions are concentrated in coastal areas, causing the release of large amounts of pollutants and threatening the survival of many species, such as fish. In this study, we attempt to assess possible damage to the DNA in one of the most consumed fish resources by coastal communities in this region, mullet (*Mugil curema*). Methodologies comet assay (EC) and micronucleus test (MN) were used in populations of this species, from five Pernambucanos estuaries (Goiana and Jaguaribe rivers in the northern coast), (Sirinhaém and Formoso rivers in the south coast) and (Capibaribe river in Metropolitan region). For comparison purposes, a control sample was collected in the estuary of the Una River (local environmental preservation), southern coast of São Paulo. Our results show that the far estuary in the metropolitan area, the Formoso River, when compared to the control group, was the one who had the lowest levels of genomic damage ($P > 0.05$). None of the other estuaries showed elevated levels of damage compared to the control ($P < 0.05$). In particular, the estuary of the river Capibaribe, located in Pernambuco capital, was the one who presented one of the highest levels of genomic damage ($P = 0.0001$). These data characterize it as the most affected among the five evaluated. These data also point to a strong association between high levels of genomic damage (macro and micro-lesions in DNA) in locations near major demographic and industrial contingent. Consequently, this scenario impaction may also be affecting the biotic community as a whole, including the riparian human communities that have this feature as a means of subsistence. These results demonstrate the effectiveness of using EC and MN methodologies as fast and accurate protocols in evaluating marine ecosystems, particularly in regions heavily impacted by human activities.

Key words: comet assay; environmental impact; estuaries; fishery resources; micronucleus; pollutants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial teórico

- Figura 1** –Imagem de eritrócito do sangue periférico de *Mugil curema* portador de micronúcleo (MN).....23
- Figura 2** –Imagem dos diferentes níveis de dano genômico evidenciado pelo Ensaio Cometa (EC) em células sanguíneas de *Mugil curema*. (a) nível 0, (b) nível 1, (c) nível 2, (d) nível 3, (e) nível 4.....25

Artigo

- Figura 1** –Mapa do Brasil, evidenciando o litoral Pernambucano e os cinco sítios amostrais. Os campos hachurados indicam os estuários localizados em Áreas de Proteção Ambiental-APAs.....54
- Figura 2** –Gráfico comparando as frequências de micronúcleos encontrados em *M. curema* nos estuários avaliados, de acordo com a análise de variância (ANOVA).....55
- Figura 3** –Gráfico comparando os índices de dano encontrados em *M. curema* nos estuários avaliados, de acordo com a análise de variância (Kruskall-Wallis).....56
- Figura 4** –Gráfico comparando as frequências de dano encontradas em *M. curema* nos estuários avaliados, de acordo com a análise de variância (Kruskall-Wallis).....57

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1 –Estuários do litoral de Pernambuco e nº de espécimes coletados em cada sítio amostral.....49

Tabela 2 – Teste de Tukey (*a posteriori*) entre as frequências de células micronucleadas encontradas em *Mugil curema* nos estuários avaliados.....50

Tabela 3 –Teste de Tukey (*a posteriori*) entre os índices de dano genômico encontrados em *Mugil curema* nos estuários avaliados.....51

Tabela 4 –Teste de Tukey (*a posteriori*) entre as frequências de danogenômico encontrados em *Mugil curema* nos estuários avaliados.....52

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
APA	Área de Proteção Ambiental
ANA	Agência Nacional de Águas
ANOVA	Análise de Variância
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPRH	Agência Estadual de Meio Ambiente
Cd	Cádmio
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Ensaio Cometa
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco
FD	Frequência de Dano
FEPAM	Fundação Estadual de Proteção Ambiental
Fe	Ferro
HAPs	Hidrocarbonetos policíclicos Aromáticos
Hg	Mercúrio
ID	Índice de Dano
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
mA	Miliampére
MN	Micronúcleo
NaCl	Cloreto de Sódio

NaAsO ₂	Arsenito de Sódio
PCBs	Bifenilpoliclorado
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
Pb	Chumbo
TBE	Tris/Borato/EDTA
V	Volt
Zn	Zinco

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	15
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
1.1 BIODIVERSIDADE MARINHA E OS IMPACTOS ANTRÓPICOS.....	16
1.2 OS RECURSOS HIDRICOS NO BRASIL.....	17
1.3 ORGANISMOS AQUÁTICOS COMO BIOINDICADORES DE POLUIÇÃO: A IMPORTÂNCIA DOS PEIXES NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL ...	19
1.4 OS EFEITOS DA INTRODUÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS NO AMBIENTE ESTUARINO: A RESPOSTA DAS ESPÉCIES NATIVAS	21
1.5 TESTE DO MICRONÚCLEO	23
1.6 ENSAIO COMETA.....	24
1.7 ENSAIO COMETA E TESTE DO MICRONÚCLEO: UMA COMPARAÇÃO.....	25
REFERÊNCIAS	27
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
MANUSCRITO.....	37
<i>Introdução</i>	38
<i>Material e Métodos</i>	39
<i>Resultados</i>	41
<i>Discussão</i>	41
<i>Considerações Finais</i>	44
<i>Agradecimentos</i>	44
<i>Referências Bibliográficas</i>	45
3 CONCLUSÕES.....	58
ANEXOS.....	59

APRESENTAÇÃO

O ambiente físico e biológico tem sofrido de forma rápida, crescente e sistemática uma dramática alteração, como resultado de atividades antropogênicas, que tem levado a um enorme impacto na saúde humana e na sustentabilidade dos ecossistemas. Nesse sentido, os estuários representam um dos ecossistemas mais afetados pela descarga de contaminantes provenientes das atividades humanas, como as agrícolas, domésticas e industriais.

A poluição dos estuários não se restringe à contaminação da água, mas também afeta a comunidade biótica como um todo, incluindo espécies de peixes como a Tainha (*Mugil curema*). Esta espécie representa um dos maiores recursos pesqueiros da região Nordeste do Brasil e no estado de Pernambuco é extremamente apreciada pelas comunidades ribeirinhas, que têm na pesca da tainha sua principal forma de subsistência. Nesse sentido, nosso estudo objetivou avaliar possíveis danos genômicos na espécie *M. curema* oriunda dos principais sistemas estuarinos de Pernambuco e assim obter um diagnóstico de forma indireta da qualidade ambiental desses ecossistemas.

O presente estudo fornece um incremento no diagnóstico e gestão de ambientes ameaçados e de espécies exploradas pela avaliação de danos genômicos. Genomas danificados podem comprometer a adaptabilidade das espécies. Além disso, esta espécie recebe apelo adicional de investigação, uma vez que é explorada economicamente.

A dissertação está apresentada na forma de seções que seguem as normas da ABNT para realização de trabalho científico. A última seção apresenta os resultados do diagnóstico ambiental dos principais sistemas estuarinos de Pernambuco e se encontra na forma de artigo científico, seguindo-se as regras do periódico ao qual será submetido (Environmental Monitoring and Assessment).

As normas de submissão de artigos científicos à revista Environmental Monitoring and Assessment estão em anexo.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 BIODIVERSIDADE MARINHA E OS IMPACTOS ANTRÓPICOS

Na atual era das mudanças globais, sistemas marinhos vêm sendo fortemente impactados pelas atividades humanas, incluindo a exploração excessiva, eutrofização, poluição e introdução de espécies (HALPERN *et al.*, 2008; HOEGH-GULDBERG & BRUNO, 2010; BURROWS *et al.*, 2011). Uma consequência desses fatores de estresse é uma mudança documentada na composição e riqueza das espécies (SAX & GAINES, 2003; BEAUGRAND *et al.*, 2010). Evidências na costa do Atlântico (STACHOWICZ *et al.*, 2002) e do Pacífico (SORTE *et al.*, 2010) da América do Norte, indicam que as espécies não nativas em comunidades de invertebrados incrustantes, são favorecidas em detrimento de espécies nativas em águas mais quentes. Desta maneira, o aquecimento pode conduzir a uma tendência de homogeneização da composição de comunidades marinhas (BURROWS *et al.*, 2011).

Desde a publicação dos primeiros experimentos que estudam os efeitos das mudanças na biodiversidade dos ecossistemas, há o consenso de que o declínio da biodiversidade tem consequências negativas para as funções do ecossistema, tais como produção, eficiência no uso dos recursos e ciclagem de nutrientes (NAEEM *et al.*, 1994; TILMAN *et al.*, 1994).

Outro fator que contribui para a redução da biodiversidade de ambientes aquáticos é a introdução de compostos químicos produzidos pela atividade humana (EGANHOUSE & SHERBLUM, 2001; DACHS & MÉJANELLE, 2010; MACIEL *et al.*, 2015). Entre aqueles classificados como poluentes orgânicos, os que mais preocupam são os poluentes orgânicos persistentes (POPs), como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAPs), e inúmeros compostos utilizados como pesticidas (DACHS & MÉJANELLE, 2010; SPONCHIADO *et al.*, 2011; SMALLING *et al.*, 2013; MACIEL *et al.*, 2015). Vale destacar, que poluentes inorgânicos, tais como os metais pesados, também possuem grande relevância nos estudos dos efeitos antrópicos sobre as comunidades de organismos marinhos (PINHEIRO & TOLEDO, 2010; AMOOZADEH *et al.*, 2014; SHARIF *et al.*, 2014).

Muitos destes poluentes, como os metais pesados e HAPs, persistem por longos períodos nos sistemas marinhos, onde as suas concentrações e os efeitos continuam aumentando (SOUZA *et al.*, 2013; AMOOZADEH *et al.*, 2014; SHARIF *et al.*, 2014). Boa parte destes compostos acumula-se ao longo do tempo e biomagnificam-se através das teias

alimentares, tornando-se mais concentrados e prejudiciais em níveis tróficos superiores (SUN *et al.*, 2015).

A gama completa de efeitos destes compostos é pouco conhecida, mas incluem os cânceres, deformações e falhas reprodutivas (ADAM *et al.*, 2010; PINHEIRO & TOLEDO, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2013). Estes efeitos foram observados em vários tipos de organismos marinhos (SHAHIDUL ISLAM & TANAKA, 2004; AMOOZADEH *et al.*, 2014).

ShahidulIslam& Tanaka (2004) estimam que milhões de toneladas de óleo entram no ambiente marinho a partir de várias fontes, como a manutenção de refinarias e derrame da água de lastro,causando efeitos adversos em inúmeras espécies de peixes, invertebrados, aves e mamíferos marinhos. No entanto, os efeitos destes compostos vão além dos eventos de mortalidade imediata, e continuam a afetar de maneira indireta todo funcionamento do ecossistema (BEAUGRAND *et al.*, 2010; PINHEIRO & TOLEDO, 2010).

1.2 OS RECURSOS HIDRICOS NO BRASIL

A utilização da água pela sociedade humana visa a atender suas necessidades pessoais, atividades econômicas (agrícolas e industriais) e sociais (TUCCI & MENDES, 2006). No entanto, essa diversificação no uso da água, quando realizada de forma inadequada, provoca alterações na qualidade da mesma, comprometendo os recursos hídricos e por consequência seus usos para os diversos fins (TUCCI, 2008; TOMASONI *et al.*, 2009). Segundo Tucci (2008), o Brasil passa por um processo de urbanização que gera problemas relacionados com a infraestrutura dos recursos hídricos no ambiente urbano, destacando a falta de tratamento de esgoto e o aumento da carga de resíduos sólidos lançados nos mananciais.

No Estado do Rio Grande do Sul, o Rio dos Sinos é um exemplo de importante manancial fortemente impactado pelas atividades humanas, o respectivo recurso hídrico e responsável pelo fornecimento de água potável para aproximadamente 2 milhões de habitantes (PETRY & SCHULZ, 2006). Segundo Petry & Schulz (2006), a introdução de compostos químicos neste manancialocorre principalmente na parte média e inferior da bacia. Nessas regiões, os riachos que compõem a rede hidrológica passam por centros urbanos com elevada densidade populacional e alta atividade industrial (PETRY & SCHULZ, 2006). Os principais distúrbios que degradam os afluentes do Rio dos Sinos são a poluição originária de

esgoto doméstico e industrial das áreas urbanas e a erosão provocada em grande parte pela eliminação da mata ciliar em áreas urbanas e agrícolas (FEPAM, 2009).

Segundo a Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM), cerca de 35 toneladas de metais pesados que incluem o Cobre (Cu), Zinco (Zn), Cromo (Cr), Cádmio (Cd) e o Chumbo (Pb) são liberados pelas atividades humanas no rio dos Sinos a cada ano. As descargas de resíduos tóxicos provenientes das atividades industriais ocorrem rotineiramente, causando mortalidade de peixes na haste principal do rio. Em Outubro de 2006 mais de 100 toneladas de peixes morreram devido a tais descargas, causando um prejuízo ecológico e econômico de valor inestimável (FEPAM, 2009).

Segundo a Agência Nacional de Águas (ANA), situação semelhante é evidenciada na maioria dos mananciais do Estado de Santa Catarina, tais recursos apresentam diferentes níveis de poluição, principalmente de efluentes domésticos, industriais e pesticidas (ANA, 2012). A bacia hidrográfica do Rio Cubatão do Sul é a mais alarmante devido à sua importância no abastecimento de água (ANA, 2012). De acordo com a concessionária local de tratamento de águas e saneamento (Companhia Catarinense de Águas e Abastecimento) (CASAN, 2013), nos últimos anos, o Rio Cubatão do Sul sofreu significativa erosão devido à remoção da mata ciliar, como consequência, essa perda tem contribuído para uma diminuição do volume de água ao longo dos anos. Além disso, na bacia do Rio Cubatão do Sul há intensa atividade agropecuária, que juntamente com a remoção da mata ciliar, o escoamento de esgotos domésticos e industriais e a mineração de areia, estão prejudicando a qualidade e a quantidade de suas águas (EXTERCKOTER, 2006). A maior parte dos resíduos tóxicos encontrados nas águas do rio deriva do escoamento de atividades urbanas, indicando que a urbanização tem impacto negativo sobre a qualidade das águas superficiais (EXTERCKOTER, 2006).

No estado de São Paulo, a qualidade do solo e as características do clima fazem da região das bacias hidrográficas do Rio Pardo, uma das principais áreas agrícolas do Brasil (RIBEIRO, 2008). A região é caracterizada pela alta produtividade agrícola, especialmente de cana de açúcar, o que a torna na maior produtora de açúcar e álcool do mundo (CARNESECA *et al.*, 2012). Tais atividades resultam na descarga de pesticidas e herbicidas nesse manancial, que associados aos resíduos domésticos e industriais produzidos pelas atividades humanas, promovem uma degradação ambiental muito grave nessa região (RIBEIRO, 2008; CARNESECA *et al.*, 2012).

As bacias hidrográficas localizadas na região nordeste do Brasil incluem áreas altamente sensíveis aos impactos ambientais relacionados com as atividades humanas

(LACERDA *et al.*, 2008). Um exemplo é a bacia do Pina no estado de Pernambuco, onde estudos indicam que a qualidade ambiental dos recursos hídricos e biológicos encontra-se fortemente impactada pela intensa atividade antrópica (VITÓRIO, 2006; VALENÇA, 2009; MACIEL *et al.*, 2015).

A forte influência de esgotos domésticos na Bacia do Pina vem sendo demonstrada através do alto nível de coliformes fecais na água e em tecidos de invertebrados aquáticos (BARROS *et al.*, 2009; FARRAPEIRA *et al.*, 2010). O Parque dos Manguezais, localizado na parte Sudoeste da Bacia do Pina, também apresenta evidências da contaminação antrópica. Nesta localidade espécies de moluscos estão contaminados por metais pesados, podendo o consumo desses organismos contaminados ser altamente prejudicial à saúde humana (SILVA *et al.*, 2010).

1.3 ORGANISMOS AQUÁTICOS COMO BIOINDICADORES DE POLUIÇÃO: A IMPORTÂNCIA DOS PEIXES NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL

O biomonitoramento de ambientes aquáticos é de extrema importância, uma vez que estes ambientes são o destino final para a maior parte dos resíduos urbanos, industriais e agrícolas (ADAM *et al.*, 2010; GINEBREDA *et al.*, 2014; MACIEL *et al.*, 2015). O desenvolvimento industrial, a intensa urbanização e as práticas agrícolas não planejadas, introduzem constantemente grandes quantidades de substâncias biologicamente ativas, incluindo produtos químicos orgânicos (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HAPs) e inorgânicos (Metais pesados) nos ambientes aquáticos (PINHEIRO *et al.*, 2013; MACIEL *et al.*, 2015; MANZANO *et al.*, 2015).

Muitos destes poluentes estão presentes no meio ambiente em níveis muito baixos, porém, podem acumular-se nos tecidos dos organismos aquáticos e induzirem danos no DNA destas espécies (ADAM *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010). No trabalho realizado por Ahmed *et al.*, (2011) foram utilizados exemplares de tilápia (*Oreochromis mossambicus*) expostos a diferentes concentrações de Arsenito de Sódio (NaAsO₂) para evidenciar o potencial genotóxico desse composto, utilizando como metodologias o ensaio cometa (EC) e o teste do micronúcleo (MN). Os resultados indicaram que estas metodologias possuem diferentes sensibilidades na detecção de danos genômicos, fornecendo um importante panorama dos efeitos causados pelo composto.

Pinheiro *et al.* (2013) observaram que as altas concentrações de metais pesados como o cobre (Cu), cádmio (Cd), cromo (Cr), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg), quantificadas em amostras de água e sedimento coletados em região de manguezal fortemente impactado, estão diretamente relacionadas ao mecanismo de indução de danos genômicos em caranguejos da espécie *Ucides cordatus*, revelando o potencial mutagênico destes compostos em crustáceos. Adam *et al.* (2010) em trabalho realizado com exemplares da espécie de peixe *Poecilia vivipara* em lago urbano de Curitiba-Sul do Brasil, observaram que as concentrações de metais pesados e coliformes fecais dessa região, são capazes de produzir efeitos adversos ao genoma, detectados pela formação de micronúcleos nos eritrócitos avaliados. Estudos recentes tem indicado o potencial genotóxico destes contaminantes em diversos grupos taxonômicos de animais aquáticos, como observado em mexilhões (ROCHA *et al.*, 2014), peixes (RAGUGNETTI *et al.*, 2011; SPONCHIADO *et al.*, 2011; BARSIENE *et al.*, 2013) e gastrópodes (SARKAR *et al.*, 2015).

As espécies aquáticas são normalmente expostas a uma mistura complexa de substâncias químicas, que acabam induzindo danos genéticos que podem ser expressos em diferentes níveis de organização ecológica (individual, populacional ou ecossistêmica) (VOROSMARTY *et al.*, 2010; GINEBREDA *et al.*, 2014). Uma enorme variedade de contaminantes ambientais pode causar alterações de forma direta ou indireta ao DNA, possuindo assim significativa relevância toxicológica, uma vez que estão relacionados a vários processos patológicos que incluem efeitos reprodutivos e carcinogênicos, que além de afetarem o indivíduo, se tornam ativos em gerações subsequentes (LEWIS & GALLOWAY, 2009; PINHEIRO & TOLEDO, 2010). A constante exposição a esses produtos químicos pode levar a respostas fisiológicas anormais e causar efeitos adversos sobre o desenvolvimento, o crescimento, comportamento e a taxa reprodutiva (EGANHOUSE & SHERBLOM, 2001; BISTODEAU *et al.*, 2006; PINHEIRO & TOLEDO, 2010; GINEBREDA *et al.*, 2014).

A utilização de peixes como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos vem crescendo substancialmente nos últimos anos. Esse crescimento está associado à sua relação íntima com o ambiente (BELFIORE & ANDERSON, 2001; ADAM *et al.*, 2010; SPONCHIADO *et al.*, 2011; CARROLA *et al.*, 2014), constituindo-se em excelentes bioindicadores de ambientes aquáticos que sofreram ou estão sofrendo algum tipo de estresse ou mudança nas suas condições naturais (AUBRECHT & CABA, 2005; PATIRE, 2010; CARMO *et al.*, 2011).

Carmo *et al.* (2011) analisaram as concentrações de metais pesados em diferentes tecidos da espécie *Mugil curema* de dois rios (Branco e Mariana) do estuário de Santos/São

Vicente-SP e encontraram altas concentrações de cromo (Cr) e ferro (Fe) nas brânquias e de cobre (Cu) e zinco (Zn) no fígado, observando diferentes padrões de bioacumulação que podem refletir potenciais genotóxicos distintos. Patire (2010), avaliou a biodisponibilidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, através da análise de metabólitos biliares de *M. curema* dos estuários de Santos e Cananéia, São Paulo, constatando uma maior concentração nos indivíduos coletados no estuário de Santos, indicando um maior nível de contaminação deste estuário.

É importante ressaltar que os peixes respondem aos agentes genotóxicos de maneira semelhante aos vertebrados terrestres, permitindo a avaliação de substâncias que são potencialmente mutagênicas e carcinogênicas aos seres humanos (DE FLORA *et al.*, 1991).

1.4 OS EFEITOS DA INTRODUÇÃO DE CONTAMINANTES NO AMBIENTE ESTUARINO: A RESPOSTA DAS ESPECIES NATIVAS

É inquestionável que o crescimento populacional nas regiões costeiras está diretamente relacionado ao aumento na descarga de contaminantes nos habitats aquáticos (HALPERN *et al.*, 2008; BARLETTA & COSTA, 2009; MACIEL *et al.*, 2015). Um dos ecossistemas mais afetados com o aumento do contingente populacional nas regiões costeiras são os estuários (DACHS & MÉJANELLE, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013). Este ambiente possui algumas características que estimulam o estabelecimento de grandes centros urbanos em seu entorno, como: a capacidade natural de renovação periódica e sistemática de suas águas sob a influência das marés, a comunicação natural com regiões de manguezais, a abundante comunidade biológica e a facilidade de captação de água doce (BARLETTA & COSTA, 2009). Desta forma, o conhecimento sobre os efeitos que os efluentes produzidos pelas atividades humanas podem causar na biodiversidade do ambiente estuarino é de suma importância, tendo em vista o valor inestimável que ele possui para as comunidades ribeirinhas que dependem da pesca, além da enorme importância ecológica por constituírem berçários para inúmeras espécies (BARLETTA & COSTA, 2009; AZEVEDO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013; MACIEL *et al.*, 2015).

Alguns compostos prejudiciais à saúde deste ambiente e das espécies nativas são relatados na literatura (PINHEIRO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013; SHARIF *et al.*, 2014; MACIEL *et al.*, 2015), e dependendo do tempo de exposição e níveis de concentração podem conduzir às mais variadas alterações patofisiológicas, que incluem: perda de gametas devido à morte celular, esterilidade, mortalidade embrionária, inibição de crescimento, anormalidades

do desenvolvimento, disfunções enzimáticas, desregulação metabólica, envelhecimento precoce e neoplasias (DEPLEDGE, 1996; BELFIORE & ANDERSON, 2001; PINHEIRO & TOLEDO, 2010; PAIXAO *et al.*, 2011). As espécies que são bioindicadoras da qualidade ambiental tendem a ser mais sensíveis aos efeitos destes compostos (MAI *et al.*, 2012; AMOOZADEH *et al.*, 2014).

Amoozadeh *et al.* (2014) constataram que as cracas bioacumulam uma maior quantidade de metais quando comparadas a outros organismos estuarinos, sendo os efeitos dessa característica expressos na redução da taxa reprodutiva desses animais. Paixão *et al.* (2011) observaram que a contaminação das regiões de manguezais está relacionada à anormalidades no desenvolvimento embrionário de espécies de ostras, associando a poluição com a redução dos padrões reprodutivos da espécie. Mai *et al.* (2012) constataram os efeitos de metais pesados e pesticidas na espécie de ostra *Crassostrea gigas* e observaram uma correlação entre os efeitos genotóxicos e anormalidades no desenvolvimento larval.

Estudos realizados por Nudi *et al.* (2007) revelaram uma capacidade peculiar que os caranguejos possuem para metabolizar algumas categorias de poluentes orgânicos, apresentando um baixo fator de bioacumulação de HAPs, refletido na sua facilidade de transformá-los em compostos polares, facilitando a excreção. Em contrapartida, estudos realizados por Pinheiro & Toledo (2010) revelaram mutações provocadas pela exposição a diferentes categorias de metais pesados na espécie de caranguejo *Ucides cordatus*, demonstrando a sua capacidade de acumular compostos inorgânicos. Smalling *et al.* (2013) em trabalho realizado no estuário do rio Santa Maria (Califórnia – USA), constataram que a forte contaminação por pesticidas, está afetando direta e indiretamente as comunidades de peixes estuarinos e migratórios. Os autores observaram que a exposição aos pesticidas está reduzindo drasticamente as comunidades de invertebrados (*Ceriodaphnia dubia* e *Hyaella azteca*), que servem como recurso alimentar para espécies de salmonídeos e peixes estuarinos, alterando o comportamento de forrageamento desses animais. De forma direta, este estudo verificou que a exposição das espécies de peixes a pesticidas pode provocar o rompimento de neurônios sensoriais, podendo comprometer seu comportamento reprodutivo, alimentar e de defesa.

Inúmeros trabalhos demonstram que a exposição das espécies estuarinas aos compostos químicos orgânicos e inorgânicos, conduz esses animais aos mais variados tipos de alterações que podem comprometer o sucesso reprodutivo e conseqüentemente ameaçar a rica biodiversidade encontrada neste ambiente (NUDI *et al.*, 2007; PINHEIRO & TOLEDO, 2010; PAIXAO *et al.*, 2011; MAI *et al.*, 2012; SMALLING *et al.*, 2013).

1.5 TESTE DO MICRONÚCLEO

O teste do micronúcleo (MN) tornou-se um dos métodos mais utilizados para avaliação de alterações cromossômicas estruturais e numéricas (FENECH, 2000). De modo geral, os micronúcleos podem se originar de regiões cromossômicas (cromossomos acêntricos, fragmentos cromatídicos produzidos por quebras cromossômicas ou cromossomos inteiros), que se atrasam ou migram irregularmente durante a anáfase, devido a distúrbios do fuso mitótico (NORPPA & FALCK, 2003; PALANIKUMAR & PANNEERSELVAM, 2011). Os micronúcleos são formados no processo de divisão celular e a sua expressão pode ocorrer em diferentes momentos após o evento de danos no DNA, dependendo da cinética do ciclo celular e do mecanismo de indução (BOLOGNESI & HAYASHI, 2011).

Segundo Bolognesi & Hayashi (2011), em peixes, os micronúcleos podem ser visualizados em vários tipos celulares, embora o uso de eritrócitos do sangue periférico (Figura 1), seja mais amplamente utilizado, pois evita a complexidade dos procedimentos de preparação do material biológico e o sacrifício desses animais, além da alta taxa de divisão celular que esta linhagem possui, o que possibilita o rápido acesso aos efeitos dos agentes genotóxicos.

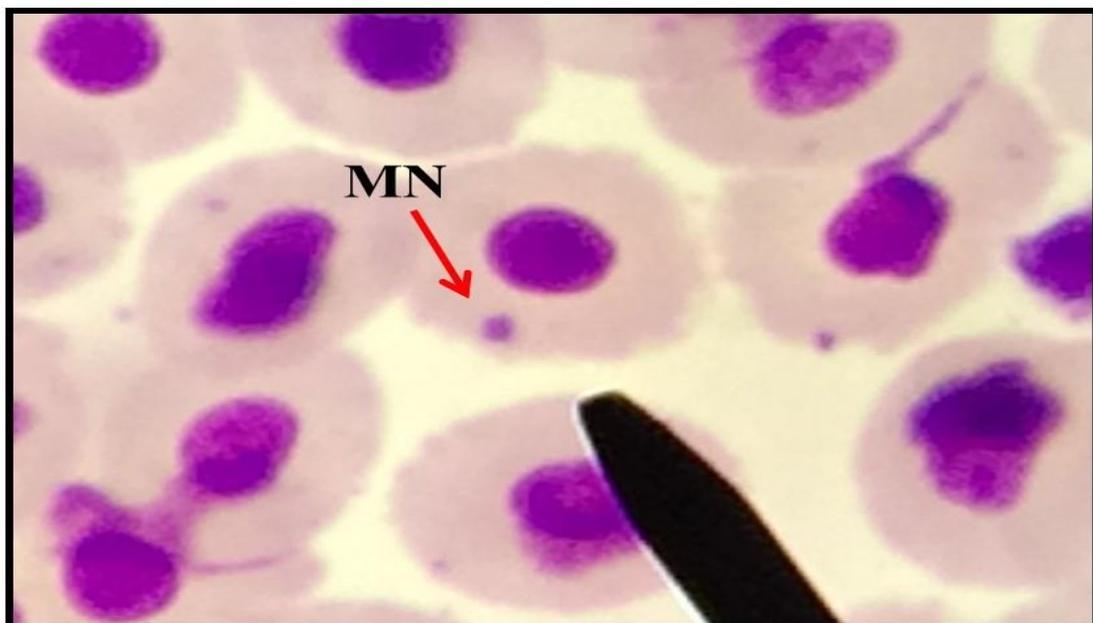


Figura 1: Imagem de eritrócito do sangue periférico de *Mugil curema* portador de micronúcleo (MN).

1.6 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa (eletroforese em gel de células individuais) é uma técnica que permite a detecção de danos no DNA de células individualizadas (SPEIT & ROTHFUSS, 2012), consistindo em uma metodologia amplamente utilizada no biomonitoramento estratégico de agentes genotóxicos (HARTMANN *et al.*, 2003; AZQUETA & COLLINS, 2013). A crescente utilização dessa metodologia está atrelada às inúmeras vantagens que possui, como pode-se citar: a simplicidade, o rápido desempenho e alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA (SPEIT & ROTHFUSS, 2012).

Através dos diferentes padrões de migração em gel de eletroforese, é possível determinar os níveis de danificação do DNA (FAIRBAIRN *et al.*, 1995). Em condições normais, a molécula de DNA encontra-se fortemente compactada no interior do núcleo das células dos organismos eucariontes. No entanto, possíveis danos causados ao DNA acabam promovendo uma descompactação e ocasionalmente podem ocorrer quebras na estrutura da molécula (ROJAS *et al.*, 1999). Os fragmentos que resultam de tais quebras migram de maneira diferenciada no gel em lâmina durante o procedimento de eletroforese. A célula com DNA não danificado terá seu núcleo preservado durante a migração e, portanto, manterá uma forma circular (Figura 2a) (OLIVE *et al.*, 1990; COLLINS, 2004).

Quando ocorre um dano muito intenso em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos são formados e migram em velocidades diferentes, formando-se, então, a figura típica de um cometa (Figura 2e) (OLIVE *et al.*, 1990).

A avaliação de tais danos é feita levando em consideração o raio do núcleo e a extensão das caudas formadas pelo DNA que migrou durante o procedimento da eletroforese, classificando-os em nível 0 (zero) e sequencialmente até nível 4 (Figura 2), que representa a maior classe de dano (COLLINS, 2004).

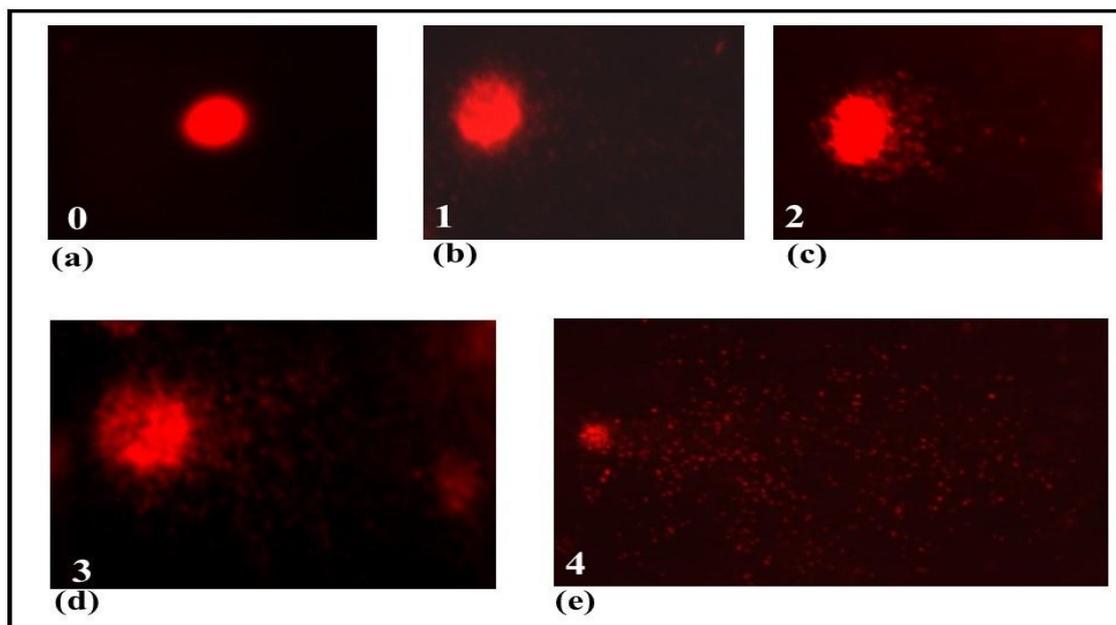


Figura 2: Imagem dos diferentes níveis de dano genômico evidenciado pelo Ensaio Cometa (EC) em células sanguíneas de *Mugil curema*. (a) nível 0, (b) nível 1, (c) nível 2, (d) nível 3, (e) nível 4.

1.7 ENSAIO COMETA E TESTE DO MICRONÚCLEO: UMA COMPARAÇÃO

A aplicação de biomarcadores é uma abordagem de extrema importância quando investigamos a relação causal entre a exposição aos poluentes ambientais e a observação dos efeitos a longo prazo em indivíduos e populações (COTELLE & FERARD, 1999).

Nas últimas décadas tem ocorrido um aumento considerável na utilização de métodos genéticos que permitem a obtenção de diagnósticos e realização de monitoramento da qualidade ambiental (DE FLORA *et al.*, 1991; ADAM *et al.*, 2010; AHMED *et al.*, 2011). O ensaio cometa e o teste do micronúcleo são os métodos mais amplamente empregados para detectar lesões no DNA (SINGH *et al.*, 1988; FENECH, 2000). O impacto genotóxico de produtos químicos sobre a integridade do DNA celular é um dos primeiros eventos nos organismos expostos aos contaminantes (WHITE & RASMUSSEN, 1998; ADAM *et al.*, 2010; BENINCÁ *et al.*, 2011; SPONCHIADO *et al.*, 2011). O dano cromossômico manifestado após a replicação celular representa um efeito acumulado, associado com a exposição em longo prazo (SIU *et al.*, 2004).

Na verdade, enquanto o teste do micronúcleo detecta danos irreparáveis, através da formação de núcleos secundários (micronúcleos), o ensaio cometa detecta lesões recentes que podem ser reparadas (COLLINS, 2004; PALANIKUMAR & PANNEERSELVAM, 2011). De maneira geral, podemos dizer que o teste do micronúcleo detecta as macrolesões no genoma, enquanto o ensaio cometa detecta as microlesões (SIU *et al.*, 2004).

Vários estudos têm sido realizados usando tanto o ensaio cometa quanto o teste do micronúcleo para avaliar o impacto genotóxico dos poluentes ambientais (ADAM *et al.*, 2010; MAI *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2013; MANZANO *et al.*, 2015). Uma elevada concordância entre os efeitos genotóxicos detectados pelo ensaio cometa e teste do micronúcleo, foi relatada por diferentes autores para vários organismos (MOUCHET *et al.*, 2006; SPONCHIADO *et al.*, 2011; BARSIENE *et al.*, 2013). Entretanto, em alguns casos a maior sensibilidade do ensaio cometa torna possível a essa técnica detectar danos não observados pelo teste do micronúcleo (ARALDI *et al.*, 2015). Masuda et al (2004), encontraram resultados positivos para o ensaio cometa em eritrócitos de peixes injetados com dois corantes mutagênicos, mas não encontraram resultados positivos para micronúcleos no mesmo tipo de célula. Tais achados indicam que diferentes biomarcadores de genotoxicidade possuem níveis de sensibilidade distintos e fornecem resultados que nem sempre são semelhantes.

Em geral, quando se leva em conta informações complementares decorrentes da utilização dessas metodologias, sugere-se que ambas devem ser empregadas simultaneamente, devido as suas capacidades distintas para detectar os diferentes níveis de impacto genotóxico (MASUDA *et al.*, 2004; MOUCHET *et al.*, 2006; AHMED *et al.*, 2011; ARALDI *et al.*, 2015).

REFERÊNCIAS

ADAM, M. L. et al. Environmental Degradation at a Public Park in Southern Brazil as Revealed Through a Genotoxicity Test (MN) on Peripheral Blood Cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). **Water Air Soil Pollut**, v. 211, p. 61-68, 2010.

AHMED, M. K. et al. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. **Chemosphere**, v. 84, p. 143-149, 2011.

AMOOZADEH, E. et al. Marine organisms as heavy metal bioindicators in the Persian Gulf and the Gulf of Oman. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 21, p. 2386-95, 2014.

ANA. **Gestão de Recursos Hídricos no Brasil**. ÁGUAS, A. N. D. 2012.

ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomed Pharmacother**, v. 72, p. 74-82, 2015.

AUBRECHT, J.; CABA, E. Gene expression profile analysis: an emerging approach to investigate mechanisms of genotoxicity. **Pharmacogenomics**, v. 6, p. 419-28, 2005.

AZEVEDO, J. S. et al. Biochemical changes in the liver and gill of *Cathorops spixii* collected seasonally in two Brazilian estuaries under varying influences of anthropogenic activities. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 5, p. 152-59, 2013.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Arch Toxicol**, v. 87, p. 949-68, 2013.

BARLETTA, M.; COSTA, M. F. Living and non-living resources exploitation in a Tropical Semi-arid Estuary. **J Coastal Res**, v. 52, p. 76-87, 2009.

BARROS, C. N. et al. **Coliformes na água e no molusco bivalve *Anomalocardia brasiliensis* (GMELIN, 1791) da Bacia do Pina, Recife, PE.** Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

BARSIENE, J. et al. Environmental genotoxicity and cytotoxicity levels in fish from the North Sea offshore region and Atlantic coastal waters. **Mar Pollut Bull**, v. 68, p. 106-16, 2013.

BEAUGRAND, G.; EDWARDS, M.; LEGENDRE, L. Marine biodiversity, ecosystem functioning, and carbon cycles. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, p. 10120-4, 2010.

BELFIORE, N. M.; ANDERSON, S. L. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. **Mutat Res**, v. 489, p. 97-122, 2001.

BELPAEME, K. et al. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 11, p. 485-492, 1996.

BENINCÁ, C. et al. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil. **Environ Monit Assess**, v. 19, p. 45-58, 2011.

BISTODEAU, T. J. et al. Larval exposure to environmentally relevant mixtures of alkylphenolethoxylates reduces reproductive competence in male fathead minnows. **Aquat Toxicol**, v. 79, p. 268-77, 2006.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, p. 205-13, 2011.

BURROWS, M. T. et al. The pace of shifting climate in marine and terrestrial ecosystems. **Science**, v. 334, p. 652-5, 2011.

CARMO, C. A.; ABESSA, D. M. S.; NETO, J. G. M. Metais em águas, sedimentos e peixes coletados no estuário de São Vicente-SP, Brasil. **O Mundo da Saúde**, v. 35, p. 64-70, 2011.

CARNESECA, E. C.; ACHCAR, J. A.; MARTINEZ, E. Z. Association between particulate matter air pollution and monthly inhalation and nebulization procedures in Ribeirao Preto, Sao Paulo State, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 28, p. 1591-1598, 2012.

CARROLA, J. et al. Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries--Portugal. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 21, p. 6057-6068, 2014.

CASAN. **Relatório da Situação Hídrica do Rio Cubatão do Sul**. ABASTECIMENTO, C. C. D. Á. E. 2013.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Mol Biotechnol**, v. 26, p. 249-61, 2004.

COTELLE, S.; FERARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environ Mol Mutagen**, v. 34, p. 246-255, 1999.

DACHS, J.; MÉJANELLE, L. Organic Pollutants in Coastal Waters, Sediments, and Biota: A Relevant Driver for Ecosystems During the Anthropocene? **Estuaries and Coasts**, v. 33, p. 1-14, 2010.

DE FLORA, S.; BAGNASCO, M.; ZANACCHI, P. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. **Mutat Res**, v. 258, p. 285-320, 1991.

DEPLEDGE, M. H. Genetic ecotoxicology: an overview. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 200, p. 57-66, 1996.

EGANHOUSE, R. P.; SHERBLOM, P. M. Anthropogenic organic contaminants in the effluent of a combined sewer overflow: impact on Boston Harbor. **Mar Environ Res**, v. 51, p. 51-74, 2001.

EXTERCKOTER, R. K. **Diagnóstico da qualidade das relações ambientais estabelecidas no uso da água na bacia hidrográfica do rio cubatão do sul (SC)**. 2006. 158 (Mestre). Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FARRAPEIRA, C. M. R. et al. Coliform accumulation in *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854) (Cirripedia) and its use as an organic pollution bioindicator in the estuarine area of Recife, Pernambuco, Brazil. **Braz. J. Biol**, v. 70, p. 301-309, 2010.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FEPAM. **Os Recursos Hídricos do Estado do Rio Grande do Sul**. AMBIENTAL, F. E. D. P. 2009.

GINEBRED, A. et al. Assessment of multi-chemical pollution in aquatic ecosystems using toxic units: compound prioritization, mixture characterization and relationships with biological descriptors. **Sci Total Environ**, v. 468, p. 715-723, 2014.

HALPERN, B. S. et al. A global map of human impact on marine ecosystems. **Science**, v. 319, p. 948-52, 2008.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.

HOEGH-GULDBERG, O.; BRUNO, J. F. The impact of climate change on the world's marine ecosystems. **Science**, v. 328, p. 1523-1528, 2010.

LACERDA, L. D. et al. Estimating the importance of natural and anthropogenic sources on N and P emission to estuaries along the Ceara State Coast NE Brazil. **Environ Monit Assess**, v. 141, p. 149-64, 2008.

LEWIS, C.; GALLOWAY, T. Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates. **Environ Sci Technol**, v. 43, p. 928-933, 2009.

MACIEL, D. C. et al. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in a an urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 101, p. 429-433, 2015.

MAI, H. et al. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Mar Pollut Bull**, v. 64, p. 2663-70, 2012.

MANZANO, B. C. et al. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of Sao Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 22, p. 1399-407, 2015.

MASUDA, S. et al. Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo- 4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitro-biphenyl (ADDDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay. **Mutat Res**, v. 560, p. 33-40, 2004.

MOUCHET, F. et al. Comparative evaluation of genotoxicity of captan in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the comet assay and the micronucleus test. **Environ Toxicol**, v. 21, p. 264-277, 2006.

NAEEM, S. et al. Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. **Nature**, v. 368, p. 734-737, 1994.

NORPPA, H.; FALCK, G. C. What do human micronuclei contain? . **Mutagenesis**, v. 18, p. 221-233, 2003.

NUDI, A. H. et al. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. **Environ Int**, v. 33, p. 315-327, 2007.

OLIVE, P. L.; BANATH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiat Res**, v. 122, p. 86-94, 1990.

PAIXAO, J. F. et al. Integrated assessment of mangrove sediments in the Camamu Bay (Bahia, Brazil). **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 74, p. 403-15, 2011.

PALANIKUMAR, L.; PANNEERSELVAM, N. Micronuclei assay: A potential biomonitoring protocol in occupational exposure studies. **Genetika**, v. 47, p. 1169-1174, 2011.

PATIRE, V. F. **Avaliação da biodisponibilidade dos HAPs em *Mugil curema* do estuário de Santos e de Cananéia através da análise de metabólitos de HAPs em bile de peixes.** Universidade de São Paulo, 2010.

PETRY, A. C.; SCHULZ, U. H. Longitudinal changes and indicator species of the fish fauna in the subtropical Sinos River, Brazil. **J. Fish Biol**, v. 69, p. 272-290, 2006.

PINHEIRO, M. A. et al. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. **Environ Monit Assess**, v. 185, p. 8273-8285, 2013.

PINHEIRO, M. A.; TOLEDO, T. R. Malformation in the crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)(Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), in São Vicente (SP), Brazil. **Revista CEPSUL - Biodiversidade e Conservação Marinha**, v. 1, p. 61-65, 2010.

RAGUGNETTI, M. et al. Ibuprofen Genotoxicity in Aquatic Environment: An Experimental Model Using *Oreochromis niloticus*. **Water Air Soil Pollut**, v. 218, p. 361-364, 2011.

RIBEIRO, C. A. O. et al. Biomarkers Responses in Fish (*Atherinella brasiliensis*) of Paranaguá Bay, Southern Brazil, for Assessment of Pollutant Effects. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 61, p. 1-11, 2013.

RIBEIRO, H. Sugar cane burning in Brazil: respiratory health effects. **Rev Saude Publica**, v. 42, p. 370-376, 2008.

ROCHA, T. L. et al. Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Mar Environ Res**, v. 101, p. 29-37, 2014.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 722, p. 225-254, 1999.

SANTOS, P. E. et al. Mutagenicity of blue rayon extracts of fish bile as a biomarker in a field study. **Environ Mol Mutagen**, v. 51, p. 173-179, 2010.

SARKAR, A. et al. Genotoxicity of cadmium chloride in the marine gastropod *Nerita chamaeleon* using comet assay and alkaline unwinding assay. **Environ Toxicol**, v. 30, p. 177-187, 2015.

SAX, D. F.; GAINES, S. D. Species diversity: from global decreases to local increases. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 2 ,p. 18-24, 2003.

SHAHIDUL ISLAM, M.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Mar Pollut Bull**, v. 48, p. 624-49, 2004.

SHARIF, A. et al. Fate of mercury species in the coastal plume of the Adour River estuary (Bay of Biscay, SW France). **Sci Total Environ**, v. 496, p. 701-13, 2014.

SILVA, H. K. P. et al. Avaliação das concentrações de metais-traço e suas interações nos sedimentos e biota do parque dos manguezais, região metropolitana do recife (RMR) Pernambuco, Brasil. **Tropical Oceanography**, v. 38, p. 174-180, 2010.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SIU, W. H. et al. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). **Aquat Toxicol**, v. 66, p. 381-92, 2004.

SMALLING, K. L. et al. Environmental fate of fungicides and other current-use pesticides in a central California estuary. **Mar Pollut Bull**, v. 73, p. 144-53, 2013.

SORTE, C. J. B.; WILLIAMS, S. L.; CARLTON, J. T. Marine range shifts and species introductions: comparative spread rates and community impacts. **Global Ecology and Biogeography**, v. 19, p. 303-316, 2010.

SOUZA, I. C. et al. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environ Pollut**, v. 180, p. 136-44, 2013.

SPEIT, G.; ROTHFUSS, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods Mol Biol**, v. 920, p. 79-90, 2012.

SPONCHIADO, G. et al. Genotoxic Effects in Erythrocytes of *Oreochromis niloticus* Exposed to Nanograms-per-Liter Concentration of 17 β -Estradiol (E2): An Assessment Using Micronucleus Test and Comet Assay. **Water Air Soil Pollut**, v. 218, p. 353-360, 2011.

STACHOWICZ, J. J. et al. Linking climate change and biological invasions: Ocean warming facilitates nonindigenous species invasions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, p. 15497-500, 2002.

SUN, R. X. et al. Legacy and emerging halogenated organic pollutants in marine organisms from the Pearl River Estuary, South China. **Chemosphere**, v. 139, p. 565-71, 2015.

TILMAN, D. et al. Habitat destruction and the extinction debt. **Nature**, v. 371, p. 65-66, 1994.

TOMASONI, M. A.; PINTO, J. E. S.; SILVA, H. P. A questão dos recursos hídricos e as perspectivas para o Brasil. **GeoTextos**, v. 5, p. 107-127, 2009.

TUCCI, C. E. M. Águas urbanas. **Estudos Avançados**, v. 22, p. 97-112, 2008.

TUCCI, C. E. M.; MENDES, C. A. Avaliação ambiental integrada de bacia hidrográfica. **In M. d. M. Ambiente (Ed.)**, v. 71, p. 113-119, 2006.

VALENÇA, A. P. M. C. As comunidades macrobentônicas na avaliação da qualidade ambiental de áreas estuarinas de Pernambuco. **Tropical Oceanography**, v. 37, p. 80-99, 2009.

VITÓRIO, U. S. R. **Rotíferos (Rotatória) como indicadores da qualidade ambiental da Bacia do Pina, Recife (PE)**. Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

VOROSMARTY, C. J. et al. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, v. 467, p. 555-61, 2010.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutat Res**, v. 410, p. 223-236, 1998.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o dano genômico na espécie *Mugil curema* em cinco sistemas estuarinos do estado de Pernambuco por meio de parâmetros genotóxicos do tipo teste micronúcleo e ensaio cometa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o dano genômico por macrolesões em células sanguíneas de *Mugil curema* pelo Ensaio Micronúcleo em cinco sistemas estuarinos do estado de Pernambuco.
2. Avaliar o dano genômico por microlesões em células sanguíneas de *Mugil curema* pelo Ensaio Cometa em cinco sistemas estuarinos do estado de Pernambuco.
3. Sugerir o status de conservação de *Mugil curema* e dos cinco sistemas estuarinos do estado de Pernambuco perante ambos os índices de dano genômico.

Os dados referentes ao diagnóstico ambiental dos principais sistemas estuarinos de Pernambuco, utilizando como organismo bioindicador a espécie *M. curema*, estão apresentados no manuscrito a seguir com previsão de submissão à revista *Environmental Monitoring and Assessment* após as revisões sugeridas pela banca. A apresentação segue os padrões de formatação e organização solicitadas pela revista.

Dano genômico em Mugil curema (Actinopterygii: Mugilidae), revela os efeitos da intensa urbanização em estuários do Nordeste do Brasil.

Anderson Rodrigues Balbino de Lima*¹, Rodrigo Augusto Torres¹, Uedson Pereira Jacobina¹ & Mônica Lúcia Adam²

1. Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental, Dep. Zoologia, Centro de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife – Pernambuco, Brasil. CEP 50670-420 – fone (FAX): +55-(81)21268359.

2. Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco. Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão – Pernambuco, Brasil. CEP 55608-680 - fone (FAX): +55-(81)21267945.

*autor correspondente: Email: anderson_rodrigues.184@hotmail.com

Resumo: Os atuais padrões de ocupação das regiões costeiras no Brasil demonstram uma série de irregularidades quanto à utilização dos recursos hídricos e biológicos dessas áreas. Na região nordeste do Brasil, as grandes metrópoles localizam-se próximas ao litoral, sendo as atividades industriais, turísticas e agropecuárias as principais causadoras da contaminação dos corpos d'água através do lançamento de efluentes sem tratamento. Alguns métodos podem indicar condições ambientais adversas através da análise do material genético dos organismos expostos, resultando em um diagnóstico que fornece um panorama da qualidade ambiental. O presente estudo avaliou possíveis danos no DNA em um dos recursos pesqueiros mais consumidos pelas comunidades ribeirinhas na região Nordeste do Brasil, a tainha (*Mugil curema*), com fins em obter de forma indireta um diagnóstico da qualidade ambiental dos principais sistemas estuarinos da região. As células do sangue de *M. curema* foram analisadas para verificar a presença de micronúcleos (macrolesões) e rastros de DNA - ensaio cometa (microlesões). A comparação estatística revelou níveis de danos genômicos consideravelmente maiores do que os encontrados no grupo controle ($p < 0,05$) sugerindo um forte efeito genotóxico nas amostras dos estuários avaliados, principalmente aqueles próximos a locais com grande contingente demográfico e industrial. Essa evidência indica o alto grau de degradação ambiental dos estuários avaliados e sugere a necessidade de ações de gerenciamento nestas áreas.

Palavras-chave: ensaio cometa; micronúcleo; risco ambiental; sistemas estuarinos; tainha.

Introdução

O desenvolvimento industrial e a intensa urbanização em regiões próximas de recursos hídricos têm contribuído de maneira alarmante para a introdução de compostos químicos prejudiciais à saúde ambiental, afetando a biodiversidade aquática, comprometendo o equilíbrio ecológico e prejudicando as comunidades ribeirinhas que dependem da pesca como seu principal meio de subsistência (Amorim 2003; Azevedo et al. 2013; Ghisi et al. 2014).

No Brasil, boa parte dos grandes contingentes demográficos se concentra em regiões costeiras, próximos a ambientes estuarinos, como é o caso das principais capitais que se localizam na região do Nordeste (IBGE 2010). A intensa atividade humana nestas regiões tem ocasionado uma grande descarga de efluentes produzidos pelas populações, levando, conseqüentemente, à intervenção ambiental dos recursos hídricos próximos a estas áreas (Barletta & Costa 2009; Souza et al. 2013). Estuários são verdadeiros centros de diversidade biológica, uma vez que muitos organismos passam boa parte ou até mesmo todo ciclo de vida nestes ecossistemas. Dessa forma, os efeitos danosos desses poluentes acabam por afetar o equilíbrio ecológico, ameaçando a exploração econômica destes recursos e comprometendo a saúde pública pelo risco do consumo de organismos contaminados (Abessa et al. 2008; Pereira et al. 2012). Tais problemas evidenciam a necessidade de criação de programas de monitoramento e diagnóstico da qualidade destes ambientes (Azevedo et al. 2013; Benincá et al. 2011; Pereira et al. 2012).

Vários tipos de contaminantes ambientais, tais como os Metais Pesados, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs), Bifenilos Policlorados (PCBs) e os Pesticidas têm sido os dejetos mais liberados nestas regiões (Bianchi et al. 2011; Maciel et al. 2015; Manzano et al. 2015; Pinheiro et al. 2013). Estes compostos são conhecidos por apresentar propriedades genotóxicas em vários organismos, ocasionando danos ao material genético nas espécies expostas, podendo afetar futuras gerações (De Flora et al. 1991; Pinheiro et al. 2013; Tsangaris et al. 2011). Para isso, avaliar a saúde desses ecossistemas é de suma importância, objetivando a conservação da biodiversidade que estas localidades abrigam. Neste aspecto, biomarcadores que indiquem danos genéticos na avaliação da qualidade ambiental, têm sido amplamente utilizados para avaliar o efeito genotóxico de tais contaminantes sobre a exposição de organismos aquáticos (Bolognesi & Hayashi 2011; Ohe et al. 2004). Metodologias rápidas e precisas têm sido eficientes nestes diagnósticos, como é o caso do Ensaio Cometa (EC) que detecta quebras na molécula de DNA (Singh et al. 1988) e o diagnóstico pela presença de Micronúcleos (MN), um indicador sensível a danos

cromossômicos (Bolognesi & Hayashi 2011). Estas metodologias já provaram sua eficácia em vários grupos de organismos, como peixes (Adam et al. 2010; Barsiene et al. 2013; Ragugnetti et al. 2011; Sponchiado et al. 2011), crustáceos (Pinheiro et al. 2013) e moluscos (Rocha et al. 2014).

No Nordeste do Brasil, o estado de Pernambuco apresenta uma faixa litorânea com 187 Km de extensão e 21 municípios que concentram 44% da população (Araujo et al. 2007). A pesca artesanal representa uma das principais atividades desenvolvidas pelas comunidades ribeirinhas dessa região, e um dos recursos pesqueiros mais consumidos por estas comunidades é a espécie *Mugil curema*, conhecida como tainha (Isaac et al. 2006). A tainha, além de ser uma rica fonte de proteína para as comunidades ribeirinhas, tem uma boa aceitação no mercado consumidor da região, com mais de 18 mil toneladas de pescado ao ano (Pesca 2011). Sob este âmbito, utilizamos esta espécie como modelo para obter indiretamente um diagnóstico da qualidade ambiental dos principais sistemas estuarinos do estado de Pernambuco, e entender quais seriam as relações diretas ocasionadas pelos efeitos antrópicos próximos a esses habitats.

Material e Métodos

Área de estudo e local da amostragem

Foram amostrados 54 espécimes de *M. curema* em cinco estuários do Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil (Tabela 1, Figura 1) entre os meses de dezembro de 2014 e fevereiro de 2015. Tais estuários foram selecionados conforme os diferentes níveis de conservação, descritos pela CPRH- Agência Estadual de Meio Ambiente/PE. Para fins comparativos, uma amostra controle foi coletada no estuário do Rio Una (Estação Ecológica da Juréia-Itatins - SP), o qual se encontra em grande estado de preservação ambiental.

Preparações das lâminas e análise

Teste Micronúcleo (MN)

Esfregaços de sangue periférico foram preparados a partir dos espécimes amostrados. As lâminas foram coradas com Giemsa (7,5%) durante cerca de seis minutos à temperatura

ambiente. Os eritrócitos foram analisados em microscopia de imersão (100X). Alguns critérios foram utilizados para o reconhecimento de micronúcleos típicos, tais como morfologia, tamanho do micronúcleo e coloração igual aos núcleos principais. O número total de eritrócitos analisados foi padronizado em 1000 células para cada amostra.

A avaliação estatística do número de micronúcleos encontrados nas amostras provenientes dos seis estuários foi realizada utilizando uma análise de variância (ANOVA) com um nível de significância de 5%, sendo em seguida realizado o teste *a posteriori* de Tukey.

Ensaio Cometa (EC)

Para análises de ensaio cometa, amostras de sangue foram retiradas através da veia caudal, utilizando seringas heparinizadas. Uma amostra de 10 microlitros de cada espécime foi misturada com 120 microlitros de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). A suspensão foi espalhada em lâminas previamente revestidas com agarose padrão (1,5%). Em seguida, as lâminas foram acondicionadas em porta-lâmina onde foi adicionada a solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, 1% Triton x-100, 10% DMSO, pH 10), previamente refrigerada (4°C), e mantidas no escuro por uma hora em refrigerador. Após a lise celular, as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese, adicionando tampão (TBE – Tris Boro EDTA 1X). As lâminas permaneceram 20 minutos nesta solução antes do início da corrida eletroforética, para permitir a desnaturação do DNA. A eletroforese foi realizada nas seguintes condições: 25 V e 300 mA por 25 minutos. Terminado o procedimento, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto e coradas com solução de Gel Red (1:100). Foram analisados 200 núcleos de cada espécime em microscópio de epifluorescência, utilizando um sistema de classificação visual baseado na migração de fragmentos de DNA, definidos em classes que variam de zero a quatro de acordo com o tamanho da cauda formada pelo DNA danificado.

As análises dos dados foram realizadas utilizando dois parâmetros distintos, o índice de dano (ID), calculado como o total de produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o dígito denominador da classe e a frequência do dano (FD), calculada como a porcentagem de todos os cometas em relação ao número total de células avaliadas.

A homogeneidade dos dados foi verificada pelo teste de Bartlett, e, em seguida, os mesmos foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não-paramétrica) quando a variância foi não-homogênea ($p < 5\%$).

Todas as análises estatísticas de teste micronúcleo e ensaio cometa foram realizadas utilizando o software Statistica v. 6.0 (STATSOFT, INC.).

Resultados

As análises dos eritrócitos revelaram diferenças significativas no número de micronúcleos entre o grupo controle (Juréia-Itatins) e os cinco estuários estudados (ANOVA, $p < 0.05$; Fig.2). O estuário do rio Capibaribe apresentou os maiores níveis de células portadoras de micronúcleos quando comparado ao grupo controle (Tukey, $p = 0.0001$; Tab.2) e ao estuário do rio Formoso (Tukey, $p = 0.0162$; Tab.2). Os estuários dos rios Goiana, Jaguaribe e Sirinhaém também apresentaram níveis significativos de micronúcleos, cujos dados estatísticos assemelham-se ao observado no estuário do rio Capibaribe (Tukey, $p > 0.05$; Tab.2) e diferem do observado no estuário da região controle (Tukey, $p < 0.05$; Tab.2). O estuário do rio Formoso foi o único que apresentou resultados semelhantes ao grupo controle na avaliação das macrolesões pelo teste do micronúcleo (Tukey, $p = 0.1156$; Tab.2).

As análises de ensaio cometa com Kruskal-Wallis e Tukey corroboram as encontradas pelo teste do micronúcleo. Seguindo em ordem decrescente, as localidades com os maiores índices de danos genômicos: Capibaribe > Goiana > Sirinhaém > Jaguaribe ($p < 0.05$; Fig.3). O estuário do rio Formoso apresentou resultados semelhantes aos encontrados no grupo controle (Tukey, $p = 0.9611$; Tab.3).

Vale ressaltar que os estuários dos rios Formoso e Jaguaribe não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados entre si e ao grupo controle pelo parâmetro da frequência de dano (FD) (Tukey, $p > 0.05$; Tab.4). Rio Formoso e Jaguaribe mostram em suas frequências de dano similaridades ao grupo controle (Fig. 4 e Tab.4).

Discussão

Nossos dados de MN e EC sugerem uma forte associação entre altos níveis de danos genômicos nos estuários próximos à locais com intensa urbanização ou associados a atividade turística e canavieira. As populações de *M. curema* existentes nos estuários dos rios Capibaribe, Goiana, Jaguaribe e Sirinhaém foram as mais impactadas. Em contrapartida, a população de *M. curema* do rio Formoso, que está inserido em duas áreas de preservação ambiental (APAs de Guadalupe e Costa dos Corais), e o mais afastado da região metropolitana, foi o local no qual apresentou baixa quantidade de micronúcleos e ausência de

rastros de DNA que indiquem dano genômico nessas populações, quando comparado ao grupo controle, Juréia-Itatins -SP.

A grande implantação de indústrias e a elevada atividade turística têm promovido modificações nas características físicas e químicas dos estuários, reduzindo a qualidade da água devido à contínua descarga de efluentes industriais e sanitários (Benincá et al. 2011; Galindo & Moreira 2009; Maciel et al. 2015; Sharif et al. 2014). Nosso estudo destaca que os ecossistemas estuarinos próximos aos centros urbanos, associados à intensa atividade turística ou canavieira, possam estar de fato sendo impactados pela grande quantidade de dejetos liberados nestas áreas, ameaçando a qualidade desses recursos hídricos e consequentemente os organismos que vivem sobre suas influências.

Os resultados observados nos estuários dos rios Capibaribe e Goiana revelam que os pólos industriais presentes nas proximidades destes estuários, tem exercido forte influência para os altos níveis de degradação ambiental detectados nessas áreas, assemelhando-se aos resultados genotóxicos observados por Galindo & Moreira (2009), em espécie de peixe exposta a resíduos domésticos e industriais. Os resultados encontrados para os estuários dos rios Jaguaribe e Sirinhaém sugerem que a intensa atividade turística e canavieira que ocorre nessas regiões, tem contribuído de maneira significativa para presença de dano genômico em *M. curema* dessas áreas. Nossos dados revelam uma maior prevalência de macrolesões nos estuários associados à plantação de cana-de-açúcar, indicando que a presença de pesticidas produz uma maior incidência de células portadoras de micronúcleos nos espécimes expostos. Os estuários associados a grandes contingentes demográficos e industriais apresentaram uma maior prevalência de microlesões, indicando que os contaminantes advindos de esgoto doméstico e industrial estão associados a danos que ocorrem a nível molecular. Diagnósticos como estes, também tem revelado a falta na qualidade desses recursos hídricos em centros metropolitanos em outras regiões do Brasil, como é o caso da região Sudeste (Manzano et al. 2015). Isto revela o efeito mutagênico que inúmeras categorias de contaminantes, como os HAPs, metais pesados e pesticidas, possam estar impactando esses ecossistemas e consequentemente um dos principais recursos pesqueiros nesta região.

Vários trabalhos têm demonstrado a eficiência dos métodos de avaliação genotóxica no diagnóstico da qualidade ambiental de regiões estuarinas (Araldi et al. 2015; Carrola et al. 2014; Pinheiro et al. 2013). Tal eficiência é comprovada em nosso trabalho pela sensibilidade destes marcadores na detecção de alterações no material genético de *M. curema*. O estuário do

rio Capibaribe, na região metropolitana do Recife, foi o que mostrou o maior nível de dano genômico. Tal constatação está associada à vasta região urbanizada que o rio Capibaribe percorre, recebendo efluentes de rejeitos domésticos e industriais (Barros et al. 2009; Farrapeira et al. 2010; Maciel et al. 2015). Essa evidência assemelha-se aos resultados encontrados para outros grupos taxonômicos de áreas estuarinas próximas de grandes centros urbanos (Pinheiro et al. 2013; Rocha et al. 2014). Além disso, estudos recentes comprovam que o sistema estuarino do rio Capibaribe funciona como retentor de contaminantes ambientais, sobretudo de HAPs de origem atmosférica (Maciel et al. 2015), sugerindo uma relação entre estes contaminantes e o dano genômico observado nas populações de *M. curema* do Capibaribe.

Embora em menor nível, os estuários dos rios: Goiana, Jaguaribe e Sirinhaém também apresentaram resultados significativos, indicando que a qualidade ambiental desses ecossistemas também possa estar comprometida pela descarga de poluentes. No rio Goiana as principais fontes de contaminação são provenientes do crescente pólo industrial que tem se desenvolvido no litoral norte e a intensa atividade canavieira que ocorre na região (Barletta & Costa 2009). O impacto causado nos estuários dos rios Jaguaribe e Sirinhaém possui uma forte associação com a atividade turística e canavieira dessas regiões. Esses resultados genotóxicos observados nos estuários de Pernambuco são semelhantes aos encontrados na região Sudeste do Brasil por Souza et al (2013) na espécie *Centropomus parallelus*, demonstrando que os níveis de danificação genômica aumentam em regiões próximas a áreas com grandes contingentes demográficos e industriais.

Um fato interessante, é que o estuário do rio Jaguaribe encontra-se inserido na área de preservação ambiental do canal de Santa Cruz, e mesmo sendo uma APA, tem sofrido os efeitos diretos das atividades turísticas que ocorrem nesta localidade. Estudos realizados por Vila Nova & Torres (2012), revelam que a presença de áreas de preservação ambiental próximas a mananciais, não são uma garantia da conservação dos recursos hídricos e biológicos. De fato, isto é corroborado por nossos dados, que destacam que a presença desta APA de Santa Cruz pode não estar sendo uma garantia de integridade do material genético das espécies que se encontram nesse ecossistema. Estudos recentes apontam que o DNA danificado conduz os organismos a alterações patofisiológicas que incluem: retardo do crescimento, disfunções enzimáticas e anormalidades no desenvolvimento, o que pode estar de fato não apenas acontecendo com as populações de *M. curema*, mas também em outros

organismos (Adam et al. 2010; Pinheiro et al. 2013; Pinheiro & Toledo 2010; Ribeiro et al. 2013; Vila Nova & Torres 2012).

De fato, estes efeitos podem comprometer a saúde ambiental dos estuários, com consequências negativas na perda de diversidade biológica e contaminação direta pelo consumo desses pescados pelas comunidades ribeirinhas, que tem a pesca de subsistência como seu principal meio de sobrevivência.

O estuário do rio Formoso apresentou resultados que o enquadram como o mais semelhante ao grupo controle, isso indica que as áreas de preservação ambiental de Guadalupe e Costa dos Corais exercem influência positiva para os níveis de conservação observados neste estuário. Além disso, a ausência de um pólo industrial no entorno do estuário e os baixos índices populacionais na região do rio Formoso são fatores que contribuem para bons níveis de conservação das populações de tainhas observadas nesta localidade, sendo um indicativo de bom consumo desse pescado para as populações humanas.

Considerações Finais

Nossos resultados através da análise de MN e EC nas Tainhas provenientes dos estuários de Pernambuco, demonstram a eficiência das avaliações genotóxicas para fins de diagnóstico ambiental. Apresentando sensibilidade na detecção dos efeitos causados pelas populações humanas nos recursos hídricos e biológicos. Este estudo utilizou populações de *M. curema*, de grande importância econômica na região, como um modelo para entender os impactos das atividades antrópicas nestes ecossistemas do Nordeste do Brasil. O alto impacto detectado através dessas metodologias nestas populações mostrou um diagnóstico efetivo e aponta a necessidade da criação de programas de monitoramento ambiental nessa região, que visem contribuir para a manutenção da diversidade biológica, vital para a conservação desses ecossistemas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE, número do processo (APQ-0017-2.02/11) e ao Instituto Nacional de

Ciência e Tecnologia – INCT ambientes tropicais/ CNPq, número do processo (Proc. 565054/2010-4), pelo apoio financeiro concedido em todas as etapas do trabalho. O autor correspondente é especialmente grato a Danielle Maia pelo mapa ilustrativo do litoral de Pernambuco fornecido para nosso artigo.

Referências Bibliográficas

- Abessa, D. M. S., Carr, R. S., Sousa, E. C. P. M., Rachid, B. R. F., Zaroni, L. P., & Pinto, Y. A. (2008). Integrative ecotoxicological assessment of a complex tropical estuarine system. *Marine Pollution: New Research*, 1-36.
- Adam, M. L., Torres, R. A., Sponchiado, G., Motta, T. S., Oliveira, C. M. R., Carvalho-Filho, M. A., et al. (2010). Environmental Degradation at a Public Park in Southern Brazil as Revealed Through a Genotoxicity Test (MN) on Peripheral Blood Cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). *Water Air Soil Pollut*, 211, 61-68.
- Amorim, L. C. A. (2003). Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Rev Bras Epidemiol*, 6, 158-170.
- Araldi, R. P., de Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sa Junior, P. L., Nozima, B. H., Ito, E. T., et al. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother*, 72, 74-82.
- Araujo, M. C. B., Souza, S. T., Chagas, A. C. O., Barbosa, S. C. T., & Costa, M. F. (2007). Análise da Ocupação Urbana das Praias de Pernambuco, Brasil. *Revista da Gestão Costeira Integrada*, 97-104.
- Azevedo, J. S., Braga, E. S., Silva de Assis, H. C., & Ribeiro, C. A. O. (2013). Biochemical changes in the liver and gill of *Cathorops spixii* collected seasonally in two Brazilian estuaries under varying in fluences of anthropogenic activities. *Ecotoxicol Environ Saf*.
- Barletta, M., & Costa, M. F. (2009). Living and non-living resources exploitation in a Tropical Semi-arid Estuary. *J Coastal Res*.(56), 371-375.
- Barros, C. N., Vaz, R. V., Pinto, S. L., Souza, M., & Mendes, E. S. (2009). *Coliformes na água e no molusco bivalve Anomalocardia brasiliiana (GMELIN, 1791) da Bacia do Pina, Recife, PE*. Paper presented at the Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade Federal de Pernambuco,

- Barsiene, J., Rybakovas, A., Lang, T., Andreikenaite, L., & Michailovas, A. (2013). Environmental genotoxicity and cytotoxicity levels in fish from the North Sea offshore region and Atlantic coastal waters. *Mar Pollut Bull*, 68(1-2), 106-116.
- Benincá, C., Ramsdorf, W., Vicari, T., Ribeiro, C. A. O., Almeida, M. I., & Assis, H. C. S. (2011). Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil. *Environ Monit Assess*.
- Bianchi, J., Espindola, E. L., & Marin-Morales, M. A. (2011). Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicol Environ Saf*, 74(4), 826-833.
- Bolognesi, C., & Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205-213.
- Carrola, J., Santos, N., Rocha, M. J., Fontainhas-Fernandes, A., Pardal, M. A., Monteiro, R. A., et al. (2014). Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries--Portugal. *Environ Sci Pollut Res Int*, 21(9), 6057-6068.
- De Flora, S., Bagnasco, M., & Zanacchi, P. (1991). Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutat Res*, 258(3), 285-320.
- Farrapeira, C. M. R., Mendes, E. S., Dourado, J., & Guimarães, J. (2010). Coliform accumulation in *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854) (Cirripedia) and its use as an organic pollution bioindicator in the estuarine area of Recife, Pernambuco, Brazil. *Braz. J. Biol*, 70, 301-309.
- Galindo, T. P., & Moreira, L. M. (2009). Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). *Genet Mol Biol*, 32(2), 394-398.
- Ghisi, N. C., de Oliveira, E. C., Favaro, L. F., Silva de Assis, H. C., & Prioli, A. J. (2014). In situ assessment of a neotropical fish to evaluate pollution in a river receiving agricultural and urban wastewater. *Bull Environ Contam Toxicol*, 93(6), 699-709.
- IBGE (2010). Censo Demográfico.
- Isaac, V. J., Martins, A. S., Haimovici, M., & Andriguetto Filho, J. M. (2006). A pesca marinha e estuarina do Brasil no início do século XXI: recursos, tecnologias, aspectos socioeconômicos e institucionais. *Editores Universitários UFPA*, 67-91.

- Maciel, D. C., Souza, J. R. B., Taniguchi, S., Bicego, M. C., & Zanardi-Lamardo, E. (2015). Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in a an urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. *Mar Pollut Bull*, 101, 429-433.
- Maia, D. J. G. (2014). *Variação genética e a conservação do guaiamum (Cardisoma guanhumí, Decapoda: Gecarcinidae) em estuários do litoral de Pernambuco/ Recife.*, Universidade Federal de Pernambuco,
- Manzano, B. C., Roberto, M. M., Hoshina, M. M., Menegario, A. A., & Marin-Morales, M. A. (2015). Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of Sao Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22(2), 1399-1407.
- Ohe, T., Watanabe, T., & Wakabayashi, K. (2004). Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res*, 567(2-3), 109-149.
- Pereira, C. D., Martín-Díaz, M. L., Catharino, M. G., Cesar, A., Choueri, R. B., & Taniguchi, S. (2012). Chronic contamination assessment integrating biomarkers' responses in transplanted mussels-A seasonal monitoring. *Environ. Toxicol*, 27, 257-267.
- Pesca, B. d. (2011). Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. In M. d. P. e. Aquicultura (Ed.).
- Pinheiro, M. A., Duarte, L. F., Toledo, T. R., Adam, M. L., & Torres, R. A. (2013). Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environ Monit Assess*, 185(10), 8273-8285.
- Pinheiro, M. A., & Toledo, T. R. (2010). Malformation in the crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)(Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), in São Vicente (SP), Brazil. *Revista CEPSUL - Biodiversidade e Conservação Marinha*, 1, 61-65.
- Ragunetti, M., Adam, M. L., Guimarães, A. T. B., Sponchiado, G., Vasconcelos, E. C., & Oliveira, C. M. R. (2011). Ibuprofen Genotoxicity in Aquatic Environment: An Experimental Model Using *Oreochromis niloticus*. *Water Air Soil Pollut*, 218, 361-364.
- Ribeiro, C. A. O., Katsumiti, A., França, P., Maschio, J., Zandoná, E., & Cestari, M. M. (2013). Biomarkers Responses in Fish (*Atherinella brasiliensis*) of Paranaguá Bay, Southern Brazil, for Assessment of Pollutant Effects. *Brazilian Journal of Oceanography*, 61, 1-11.

- Rocha, T. L., Gomes, T., Cardoso, C., Letendre, J., Pinheiro, J. P., Sousa, V. S., et al. (2014). Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Environ Res*, *101*, 29-37.
- Sharif, A., Monperrus, M., Tessier, E., Bouchet, S., Pinaly, H., Rodriguez-Gonzalez, P., et al. (2014). Fate of mercury species in the coastal plume of the Adour River estuary (Bay of Biscay, SW France). *Sci Total Environ*, *496*, 701-713.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, *175*, 184-191.
- Souza, I. C., Duarte, I. D., Pimentel, N. Q., Rocha, L. D., Morozesk, M., Bonomo, M. M., et al. (2013). Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. *Environ Pollut*, *180*, 136-144.
- Sponchiado, G., Reynaldo, E. M. F. L., Andrade, A. C. B., Vasconcelos, E. C., Adam, M. L., & Oliveira, C. M. R. (2011). Genotoxic Effects in Erythrocytes of *Oreochromis niloticus* Exposed to Nanograms-per-Liter Concentration of 17 β -Estradiol (E2): An Assessment Using Micronucleus Test and Comet Assay. *Water Air Soil Pollut*, *218*, 353-360.
- Tsangaris, C., Vergolyas, M., Fountoulaki, E., & Nizheradze, K. (2011). Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in grey mullet (*Mugil cephalus*) from a polluted environment in Saronikos Gulf, Greece. *Arch Environ Contam Toxicol*, *61*(3), 482-490.
- Vila Nova, F. V. P., & Torres, M. F. A. (2012). Environmental Evaluation in Conservation Units: Estuary of the Maracaípe River, Ipojuca-PE. *Revista de Geografia*, *29*, 199-224.

*Tabelas***Tabela 1.** Estuários do litoral de Pernambuco e nº de espécimes coletados

Estuários	Nº de Espécimes Coletados
Rio Goiana	10
Rio Jaguaribe	14
Rio Capibaribe	10
Rio Sirinhaém	10
Rio Formoso	10

Tabela 2. Teste de Tukey (*a posteriori*) entre as frequências de células micronucleadas encontradas em *Mugil curema* nos estuários avaliados.

	Juréia (1)	Goiana (2)	Jaguaribe (3)	Capibaribe (4)	Sirinhaém (5)	Rio Formoso (6)
	M = 2,1	M = 5,6	M = 5,4	M = 8,2	M = 6,2	M = 4,6
(1)		0,0078*	0,0047*	0,0001*	0,0011*	0,1156
(2)	0,0078*		0,9999	0,1637	0,9933	0,9366
(3)	0,0047*	0,9999		0,0722	0,9705	0,9599
(4)	0,0001*	0,1637	0,0722		0,4331	0,0162*
(5)	0,0011*	0,9933	0,9705	0,4331		0,6707
(6)	0,1156	0,9366	0,9599	0,0162*	0,6707	

*diferença significativa – nível de significância 0.05

Tabela 3. Teste de Tukey (*a posteriori*) entre os índices de dano genômico encontrados em *Mugil curema* nos estuários avaliados.

	Juréia (1)	Goiana (2)	Jaguaribe (3)	Capibaribe (4)	Sirinhaém (5)	Rio Formoso (6)
	M = 14,6	M = 54,1	M = 29,1	M = 64,5	M = 42,6	M = 17,5
(1)		0,0001*	0,0004*	0,0001*	0,0001*	0,9611
(2)	0,0001*		0,0001*	0,0898	0,0415*	0,0001*
(3)	0,0004*	0,0001*		0,0001*	0,0046*	0,0196*
(4)	0,0001*	0,0898	0,0001*		0,0001*	0,0001*
(5)	0,0001*	0,0415*	0,0046*	0,0001*		0,0001*
(6)	0,9611	0,0001*	0,0196*	0,0001*	0,0001*	

*diferença significativa – nível de significância 0.05

Tabela 4. Teste de Tukey (*a posteriori*) entre as frequências de dano genômico encontradas em *Mugil curema* nos estuários avaliados.

	Juréia (1)	Goiana (2)	Jaguaribe (3)	Capibaribe (4)	Sirinhaém (5)	Rio Formoso (6)
	M = 15,3	M = 42,1	M = 20,6	M = 108,3	M = 30,2	M = 14,6
(1)		0,0001*	0,3779	0,0001*	0,0001*	0,9998
(2)	0,0001*		0,0001*	0,0001*	0,0059*	0,0001*
(3)	0,3779	0,0001*		0,0001*	0,0231*	0,3523
(4)	0,0001*	0,0001*	0,0001*		0,0001*	0,0001*
(5)	0,0001*	0,0059*	0,0231*	0,0001*		0,0002*
(6)	0,9998	0,0001*	0,3523	0,0001*	0,0002*	

*diferença significativa – nível de significância 0.05

Legenda das Figuras

Fig1 Mapa do litoral de Pernambuco mostrando a localização dos estuários avaliados. Imagem obtida de (Maia 2014).

Fig2 Gráfico comparando as frequências de micronúcleos encontrados em *M. curema* nos estuários avaliados, de acordo com a análise de variância (ANOVA).

Fig3 Gráfico comparando os índices de dano encontrados em *M. curema* nos estuários avaliados, de acordo com a análise de variância (Kruskall-Wallis).

Fig4 Gráfico comparando as frequências de dano encontradas em *M. curema* nos estuários avaliados, de acordo com a análise de variância (Kruskall-Wallis).

Fig1

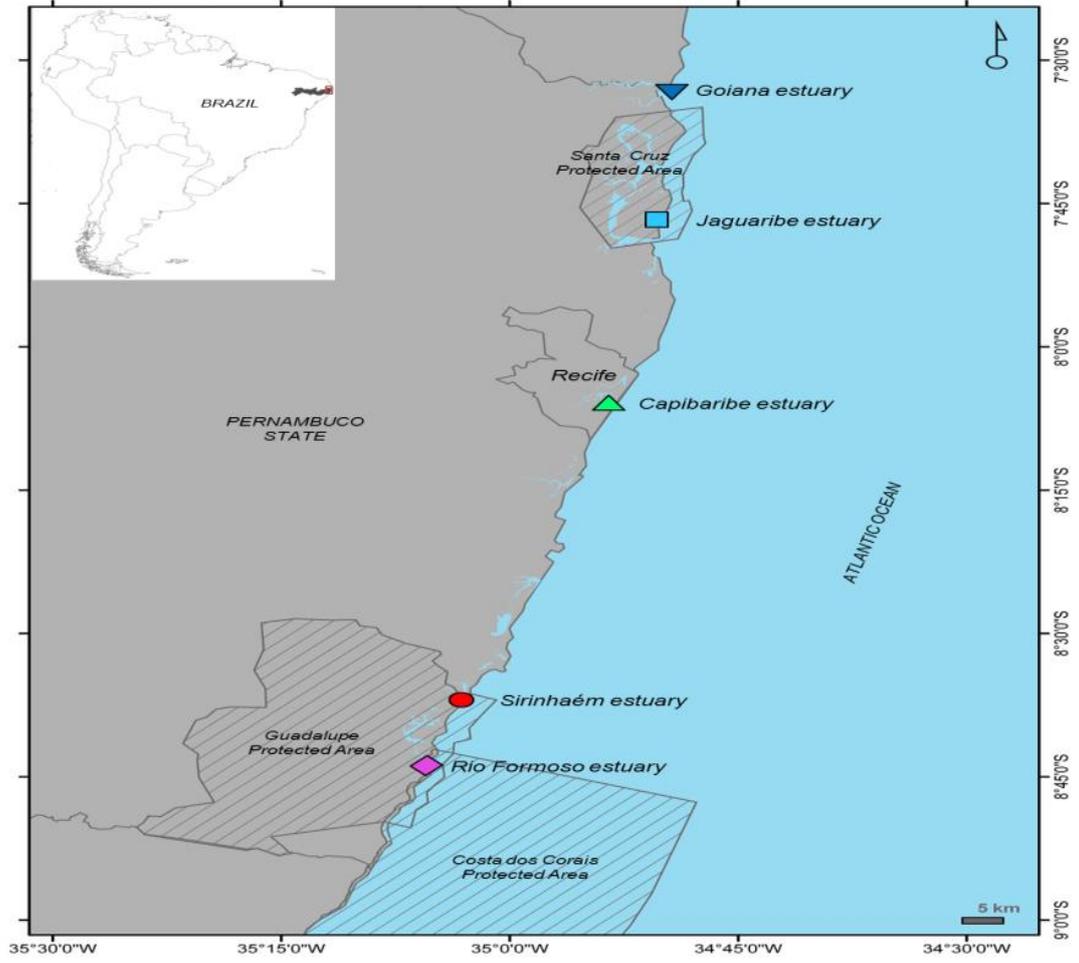


Fig2

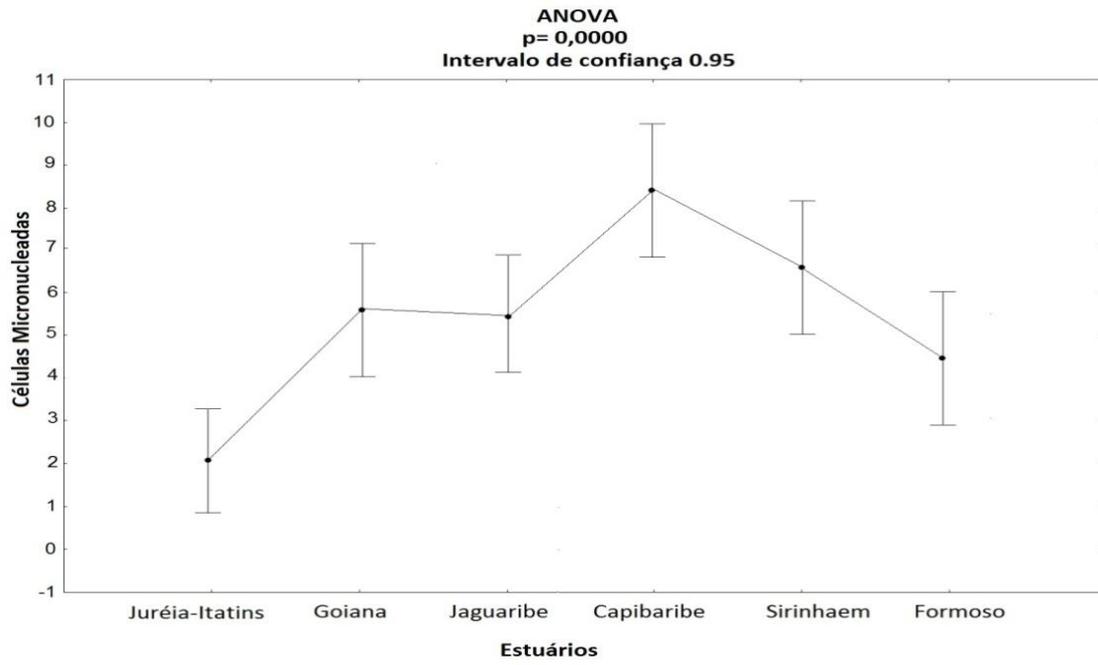


Fig3

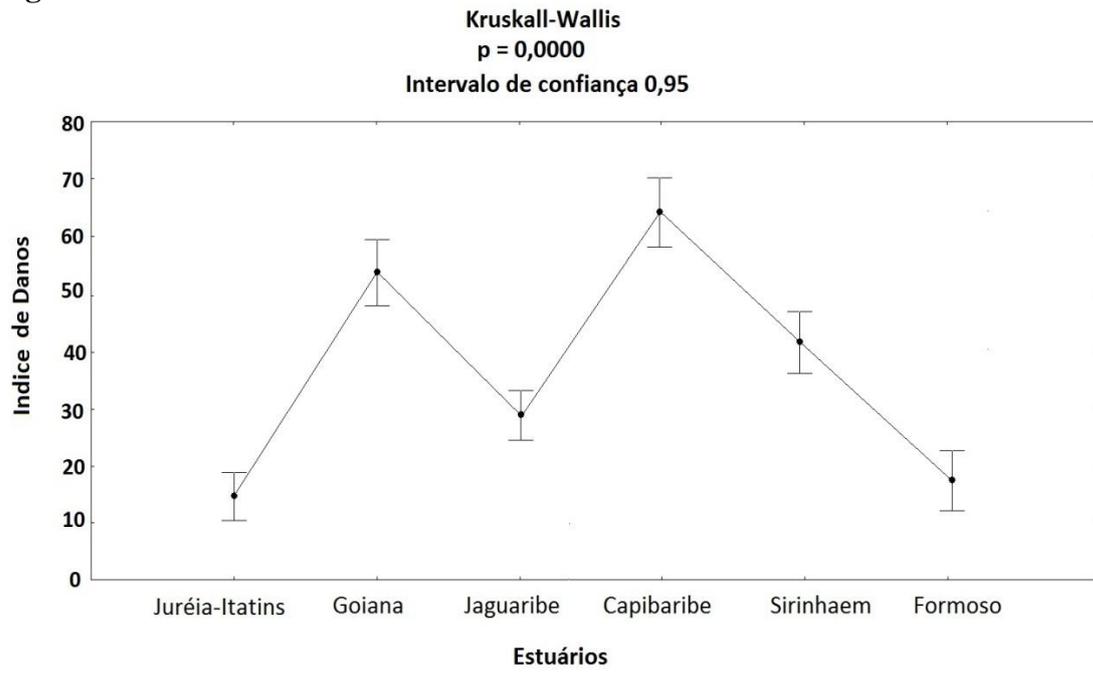
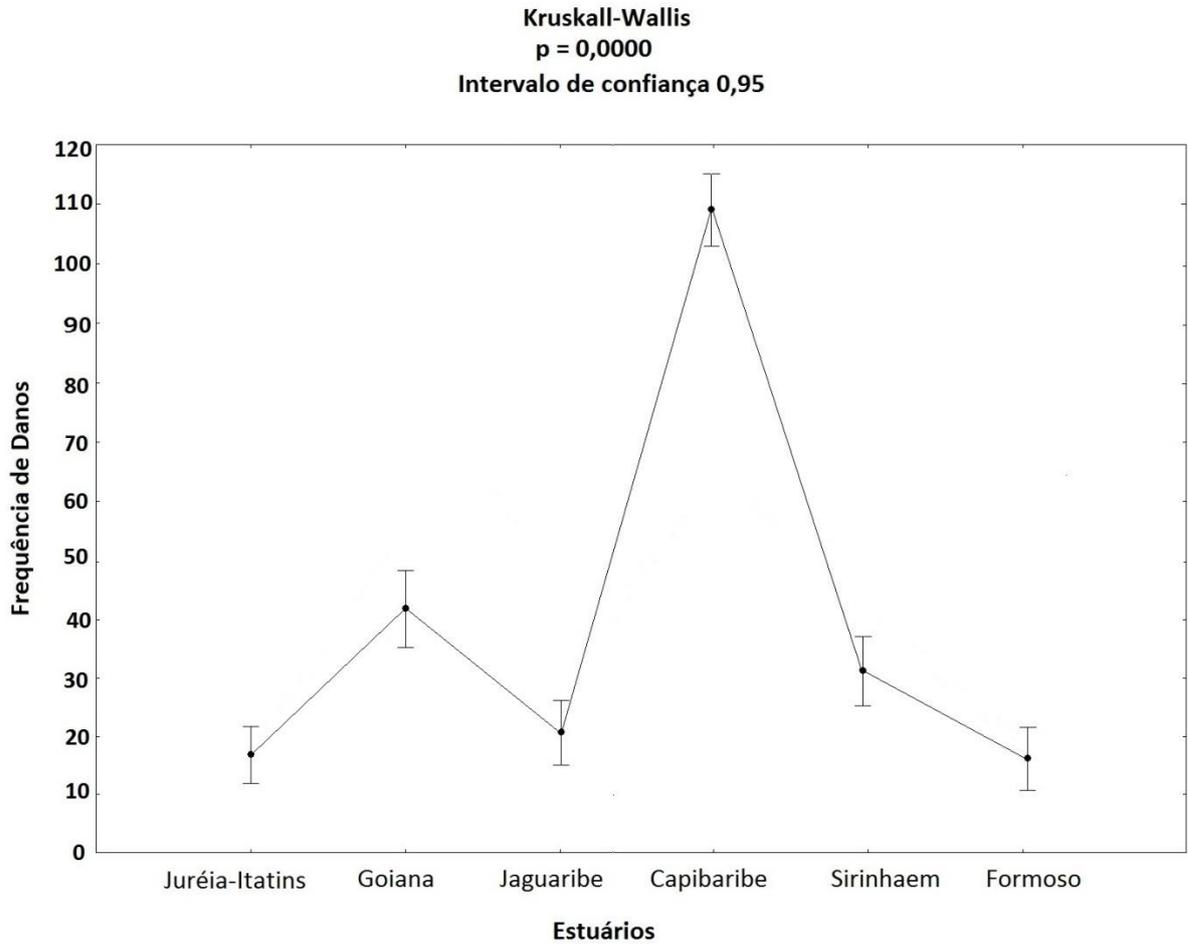


Fig4



3 CONCLUSÕES

Os métodos de avaliação genotóxica utilizados no presente estudo apresentaram sensibilidade na detecção de alterações no DNA da espécie *M. curema*.

A espécie *M. Curema* representa um eficiente bioindicador das condições ambientais dos estuários de Pernambuco.

Os estuários avaliados, com exceção do rio Formoso, apresentaram resultados que indicam uma forte pressão antrópica, resultante da intensa atividade humana que ocorre nessas regiões.

Nossos resultados sugerem que a espécie e os estuários avaliados (com exceção do rio Formoso) encontram-se ameaçados pela contaminação ambiental resultante das atividades humanas no litoral de Pernambuco.

O presente diagnóstico fornece um panorama da qualidade ambiental dos principais sistemas estuarinos do litoral de Pernambuco e mostra a necessidade de criação de programas de monitoramento ambiental que visem proteger a rica diversidade biológica encontrada nessas regiões.

ANEXOS

Instructions for authors

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use the decimal system of headings with no more than three levels.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article
Harris, M., Karper, E., Stacks, G., Hoffman, D., DeNiro, R., Cruz, P., et al. (2001). Writing labs and the Hollywood connection. *Journal of Film Writing*, 44(3), 213–245.
- Article by DOI
Slifka, M. K., &Whitton, J. L. (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Journal of Molecular Medicine*, doi:10.1007/s001090000086
- Book
Calfee, R. C., & Valencia, R. R. (1991). *APA guide to preparing manuscripts for journal publication*. Washington, DC: American Psychological Association.
- Book chapter
O’Neil, J. M., & Egan, J. (1992). Men’s and women’s gender role journeys: Metaphor for healing, transition, and transformation. In B. R. Wainrib (Ed.), *Gender issues across the life cycle* (pp. 107–123). New York: Springer.
- Online document
Abou-Allaban, Y., Dell, M. L., Greenberg, W., Lomax, J., Peteet, J., Torres, M., & Cowell, V. (2006). Religious/spiritual commitments and psychiatric

practice.Resource document.American Psychiatric Association.
http://www.psych.org/edu/other_res/lib_archives/archives/200604.pdf.
 Accessed 25 June 2007.

Journal names and book titles should be italicized.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 3 kB)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

After Acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License..

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.