



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ANDERSON KELVIN SARAIVA MACÊDO

**ANÁLISE COMPARATIVA DO FENÓTIPO MULTIXENOBIÓTICO
RESISTENTE EM DUAS ASSEMBLEIAS DE PEIXES ESTUARINOS**

**JOÃO PESSOA
2018**

ANDERSON KELVIN SARAIVA MACÊDO

**ANÁLISE COMPARATIVA DO FENÓTIPO MULTIXENOBIÓTICO
RESISTENTE EM DUAS ASSEMBLEIAS DE PEIXES ESTUARINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso em formato de artigo, com as normas da revista *Journal of Fish Biology*, apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Lúcia Vendel.

Coorientadora: Prof. Dra. Enelise Marcelle Amado.

**JOÃO PESSOA
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

M141a Macêdo, Anderson Kelvin Saraiva.

Análise comparativa do fenótipo multixenobiótico resistente em duas assembleias de peixes estuarinos [manuscrito] : / Anderson Kelvin Saraiva Macêdo. - 2018.

36 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2018.

"Orientação : Prof. Dr. Ana Lúcia Vendel, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."

"Coorientação: Prof. Dr. Enelise Marcelle Amado, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA.""

1. Estuários tropicais. 2. MXR. 3. Pufferfish.

21. ed. CDD 639

ANDERSON KELVIN SARAIVA MACÊDO

ANÁLISE COMPARATIVA DO FENÓTIPO MULTIXENOBIÓTICO RESISTENTE
EM DUAS ASSEMBLEIAS DE PEIXES ESTUARINOS

Trabalho de Conclusão de Curso em formato de artigo, com as normas da revista Journal of Fish Biology, apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 26/01/2018.

BANCA EXAMINADORA

Ana Lúcia Vendel

Prof. Dra. Ana Lúcia Vendel (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Daniela Santos Pontes

Prof. Dra. Daniela Santos Pontes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Fernando R. Queiroga

Prof. Dr. Fernando Ramos Queiroga
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança (FACENE)

Ao meu esforço e a minha persistência,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial meus pais, Glauce e Marcos, por todos os ensinamentos. Aos meus irmãos, Marcos, Ramon e Matheus, mesmo sem saberem, são o motivo da minha dedicação. A minha vó e vô, Aurinete e Pedro, por todo o cuidado comigo. A Delian por acreditar em mim.

A minha orientadora, Ana Lúcia, pelo o apoio durante esses 4 anos, onde foi a primeira a me dar oportunidades e me ensinou a gostar do que faço. A minha coorientadora, Enelise, por toda ajuda nesse trabalho, por ter acreditado na minha ideia de fazê-lo e por ter despertado meu interesse nessa linha de pesquisa que, com certeza, renderá bons frutos.

As minhas companheiras do LABICTIO, Ana Luísa, Amayana, Nathália e Vivianne, por ter me acolhido, nunca esquecerei os congressos. A Samara e Jicaury por todo o apoio, amizade e dias de sofrimento compartilhados. A Patrícia (a melhor técnica da UEPB), por nos alimentar e ajudar nos experimentos.

A Jicaury (Sim, você tem um parágrafo só seu), por ser uma amiga dedicada, trazer alegria mesmo nos dias difíceis e me suportar, sem você nada disso aqui seria possível.

Aos amigos de turma, Glacy, Jicaury, Samara, Alice, Juliana e Sara pela cumplicidade ao longo do curso, pelos momentos de diversão e por não me excluírem por ser o único homem da turma.

Ao meu irmão de consideração, Marcelo, assim como Esther e Raiza, pelos bons momentos que já tivemos juntos.

Ao meu companheiro de todas as horas, Gabriel, pelos momentos de amizade e apoio.

A banca examinadora Dra. Daniela Santos Pontes e Dr. Fernando Ramos Queiroga, pelas colaborações no presente estudo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	DESENVOLVIMENTO	11
2.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1.1	LOCAIS DE ESTUDO.....	11
2.1.2	COLETA DE DADOS E ANÁLISES LABORATORIAIS.....	12
2.1.2.1	Dados ambientais.....	12
2.1.2.2	Dados bióticos	13
2.1.2.3	Ensaio de acúmulo de Rodamina B.....	14
2.1.3	ANÁLISE DE DADOS.....	15
3	RESULTADOS	16
3.1	PARÂMETROS AMBIENTAIS.....	16
3.2	ANÁLISE TECIDUAL DO ACÚMULO DE RODAMINA B DE <i>Atherinella brasiliensis</i>	17
3.3	ANÁLISE GERAL DO ACÚMULO DE RODAMINA B POR ZONA.....	17
3.4	ANÁLISE INTRAESPECÍFICA DO ACÚMULO DE RODAMINA B.....	20
3.4.1	COMPARAÇÃO ENTRE OS ESTUÁRIOS.....	20
3.4.2	COMPARAÇÃO ENTRE AS ZONAS EM CADA ESTUÁRIO.....	21
3.5	PARÂMETROS AMBIENTAIS ASSOCIADOS AO ACÚMULO DE RODAMINA B.....	25
4	DISCUSSÃO	26
4.1	BRÂNQUIAS COMO TECIDO ALVO.....	26
4.2	DIFERENÇA INTERESPECÍFICA DA ATIVIDADE DA MXR.....	27
4.3	ATIVIDADE DA MXR COMO BIOMARCADOR.....	28
4.4	MUDANÇAS NA ATIVIDADE DA MXR DE ACORDO COM A VARIAÇÃO AMBIENTAL.....	29
5	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

ANÁLISE COMPARATIVA DO FENÓTIPO MULTIXENOBIÓTICO RESISTENTE EM DUAS ASSEMBLEIAS DE PEIXES ESTUARINOS

Anderson Kelvin Saraiva Macêdo¹

RESUMO

O objetivo desse estudo foi investigar a atividade do fenótipo de resistência a multixenobióticos (MXR) das assembleias de peixes de dois estuários tropicais, com diferentes graus e tipos de impacto antrópico, um estuário mais impactado, estuário do Paraíba e um moderadamente impactado, estuário de Mamanguape, com a hipótese de que a atividade de resistência a multixenobióticos da assembleia de peixes é um bom indicador do *status* ecológico do ambiente onde esses peixes vivem. Para isso, foram utilizados ensaios de acúmulo de rodamina B (RB), um substrato fluorescente da glicoproteína transmembrana P (P-gp), a principal base molecular do fenótipo MXR responsável por retirar os xenobióticos de dentro da célula. Primeiramente, foi investigada a atividade do fenótipo MXR em diferentes tecidos da espécie chave *Atherinella brasiliensis*, indicando a diferença da atividade do mecanismo em cada tecido. Os resultados mostraram que as brânquias possuem um menor acúmulo de RB e, portanto maior expressão do fenótipo MXR, quando comparada aos demais tecidos analisados. Portanto, para os ensaios posteriores, foi analisado o acúmulo de RB apenas nas brânquias dos peixes dos dois estuários. Os resultados obtidos mostraram que as espécies possuem diferentes níveis de atividade da MXR, revelando, portanto, a existência de uma diferença espécie-específica na atividade da MXR de peixes submetidos a uma mesma condição. Dentre as espécies estudadas, *Eucinostomus melanopterus* foi uma das que apresentou os maiores acúmulos de RB no estuário do Paraíba, mostrando que nesse local, essa população seria mais vulnerável à poluição, quando comparada com as demais analisadas. Diferente disso, o baiacu, *Sphoeroides testudineus* apresentou um dos menores acúmulos de RB nos dois estuários. Isso pode estar ligado diretamente a fatores evolutivos e/ou ao seu hábito bentônico. Algumas outras espécies de mesmo hábito mostraram o mesmo resultado, contribuindo assim para sustentar a hipótese de que o hábito do peixe na coluna d'água influencia na atividade MXR. Com isso, o presente estudo fornece uma melhor compreensão da atividade MXR das assembleias de peixes de dois estuários tropicais, utilizando o potencial desse mecanismo para avaliar a qualidade ambiental de cada estuário, revelando quais espécies seriam mais vulneráveis e quais seriam mais resistentes à poluição nesses locais. Essas análises são inéditas para peixes estuarinos, sendo assim, relevantes para o melhor entendimento da fisiologia das espécies e da qualidade do ambiente em que vivem.

Palavras-Chave: Estuários tropicais, MXR, Pufferfish.

¹ Aluno de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – Campus V.

1 INTRODUÇÃO

Os estuários estão distribuídos ao longo das margens de oceanos tropicais, onde variam muito em origem, tipo e tamanho. Eles caracterizam-se como regiões costeiras parcialmente fechadas onde a água doce dos rios mistura-se com a água do mar (Castro e Huber, 2012). Esses ecossistemas aquáticos são bastante suscetíveis à contaminação, pois frequentemente são submetidos a múltiplos estressores antrópicos e, tradicionalmente, têm sido utilizados como receptores de esgotos e diversos poluentes domésticos e industriais (Marcelino, 2000). Muitos desses estressores são extremamente tóxicos para a biota aquática, constituindo uma séria ameaça à biodiversidade desses ambientes (Walker *et al.*, 2012; Amiard-Triquet e Amiard *et al.*, 2013).

A resistência simultânea de vários organismos aquáticos à presença de diferentes químicos em águas poluídas pode ser explicada, pelo menos parcialmente, devido a presença de um mecanismo intrínseco de efluxo que previne o acúmulo de xenobióticos no interior das células, antes que esses expressem seu efeito deletério (Kurelec *et al.*, 2000). Essa resistência constitui uma das estratégias de defesa mais intrigantes desenvolvidas em organismos aquáticos, chamada mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) (Kurelec, 1992). Trata-se de um mecanismo análogo ao mecanismo de resistência a múltiplas drogas (MDR) encontrado em mamíferos que possuem células resistentes a drogas quimioterapêuticas (Efferth e Volm, 2017).

A capacidade de indução da MXR por xenobióticos e a sua ampla distribuição taxonômica (compreendendo organismos aquáticos como gastrópodes, bivalves e peixes) sugere seu papel como a primeira linha de defesa biológica (Kurelec, 1992; Epel, 1998; Bard, 2000). A expressão desse mecanismo é mediada principalmente pelo transportador ABCB1 (*P-glycoprotein*, P-gp) um representante da superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) (Epel *et al.*, 2008). A P-gp liga-se a uma variedade de substratos e facilita seu efluxo, prevenindo assim o acúmulo intracelular de xenobióticos e causando, portanto, resistência a eles (Kurelec, 1995; Minier *et al.*, 1999; Jackson e Kennedy, 2017).

A exposição à água poluída induz a expressão da atividade da P-gp, que pode retornar a seu nível basal de atividade, quando cessa a exposição aos contaminantes (Smital *et al.*, 2000). Portanto, existe uma correlação entre o nível de poluição identificado e a atividade do transportador (Eufemia e Epel, 1998). Tal funcionamento da MXR deve aumentar a resistência dos indivíduos às águas poluídas, sugerindo que

esses possam ser utilizados como biomarcadores de poluição ambiental (Kurelec *et al.*, 2000). Devido a essa indutibilidade na presença de um contaminante, e pela inespecificidade do mecanismo, a expressão do fenótipo MXR pode ser considerada um biomarcador generalizado de contaminação aquática (Smital e Kurelec, 1998; Minier *et al.*, 1999; Bard 2000; Kurelec *et al.*, 2000).

Muitos estudos de biomonitoramento que utilizam o fenótipo MXR como biomarcador de contaminação aquática vêm sendo realizados com invertebrados, particularmente moluscos (Achard *et al.*, 2004; Pain e Parant, 2007; Yawetz *et al.*, 2010; Bonnafé *et al.*, 2015; Franzellitti *et al.*, 2016). No entanto, poucos estudos foram feitos para investigar a expressão do fenótipo MXR em peixes (Albertus e Laine, 2001; Smital e Sauerborn, 2002).

Os métodos funcionais (medição da atividade de transporte), juntamente com métodos imunquímicos, são a melhor abordagem para determinar a expressão da MXR em organismos aquáticos (Smital e Sauerborn, 2002). Considerando a diminuição do acúmulo e/ou o aumento do efluxo de xenobióticos nos tecidos dos organismos aquáticos expostos à contaminantes, consequência crucial da atividade da MXR, foram desenvolvidos vários métodos de medição dessa atividade (Smital e Sauerborn, 2002). No entanto, como já exposto, quase todos foram desenvolvidos com o uso de invertebrados aquáticos como organismos experimentais. Portanto, aqui reside o diferencial do presente trabalho, aplicado aos peixes ocorrentes em estuários.

Com base nas informações aqui expostas, este trabalho objetivou, primeiramente, investigar a atividade do fenótipo MXR em diferentes tecidos da espécie chave, o residente estuarino *Atherinella brasiliensis*, demonstrando a diferença do mecanismo entre cada tecido analisado, além de, investigar a atividade do fenótipo MXR da assembleia de peixes de dois estuários tropicais brasileiros, com diferentes graus e tipos de impacto antrópico, um estuário mais impactado, estuário do Paraíba, PB e um moderadamente impactado, estuário de Mamanguape, PB. Foi utilizado o acúmulo de rodamina B (um substrato fluorescente da P-gp) que, portanto, funciona como um xenobiótico, onde a partir da mensuração da fluorescência emitida, foi possível observar a atividade da MXR no epitélio branquial dos peixes. A hipótese testada foi de que a atividade de resistência a multixenobióticos da assembleia de peixes poderia ser um bom indicador do *status* ecológico do ambiente onde esses peixes vivem. Sendo assim, em ambientes mais poluídos, a atividade da MXR será maior e conseqüentemente haverá um baixo acúmulo de rodamina B, no interior das células do epitélio branquial.

O inverso seria encontrado em ambientes com menor grau de poluição, onde a atividade da MXR dos peixes desse local seria menor e, portanto, o acúmulo de rodamina B seria maior. Dessa forma, foi esperado que a poluição regulasse a atividade da MXR das espécies. Também foi objetivo do trabalho analisar as diferenças constitutivas entre as espécies e testou-se a hipótese de que os níveis de atividade da MXR são inerentes a cada espécie. Assim, os níveis de atividade da MXR podem ser, em parte, responsáveis pela resistência ou sensibilidade de uma espécie a determinado nível de poluição local.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 LOCAIS DE ESTUDO

O estuário do Paraíba (Fig. 1 A) localiza-se entre as latitudes de 6°54'14" e 7°07'36"S, e as longitudes de 34°58'16" e 34°49'31"W, possui características típicas de um rio submetido a um regime de fluxo médio, permitindo a formação de pequenos bancos de areia circundados por extensos canaviais, pela carcinocultura, pelo Porto de Cabedelo e por uma área metropolitana composta por cinco municípios, Santa Rita, Bayeux, João Pessoa, Cabedelo e Lucena, que juntos perfazem mais de um milhão de habitantes (Alves *et al.*, 2016). No canal principal, a profundidade média é de 3,0 m, exceto na região do Porto onde frequentes dragagens mantêm uma profundidade de 11,0 m (Alves *et al.*, 2016). Este estuário é margeado por remanescentes de um bosque de mangue, porém com áreas bastante descaracterizadas, devido principalmente aos canaviais e aos aglomerados urbanos, fontes de grande impacto antrópico (Marcelino *et al.*, 2005).

O estuário do Mamanguape (Fig. 1 B), está situado entre as coordenadas 06°43'02" e 06°51'01"S e 35°07'46" e 34°54'46"W, possui cerca de 25 km de extensão e 2,5 km de largura. Este estuário abrange os municípios de Marcação e Rio Tinto e está inserido numa Área de Proteção Ambiental (APA da Barra de Mamanguape). O local possui uma vasta área de mangue e é considerado um estuário preservado, apesar de apresentar distintos focos de influência antrópica, como desmatamento, cultivo de cana de açúcar e carcinocultura que ocorrem em seu entorno (Alves e Nishida, 2004; Alves *et al.*, 2016).

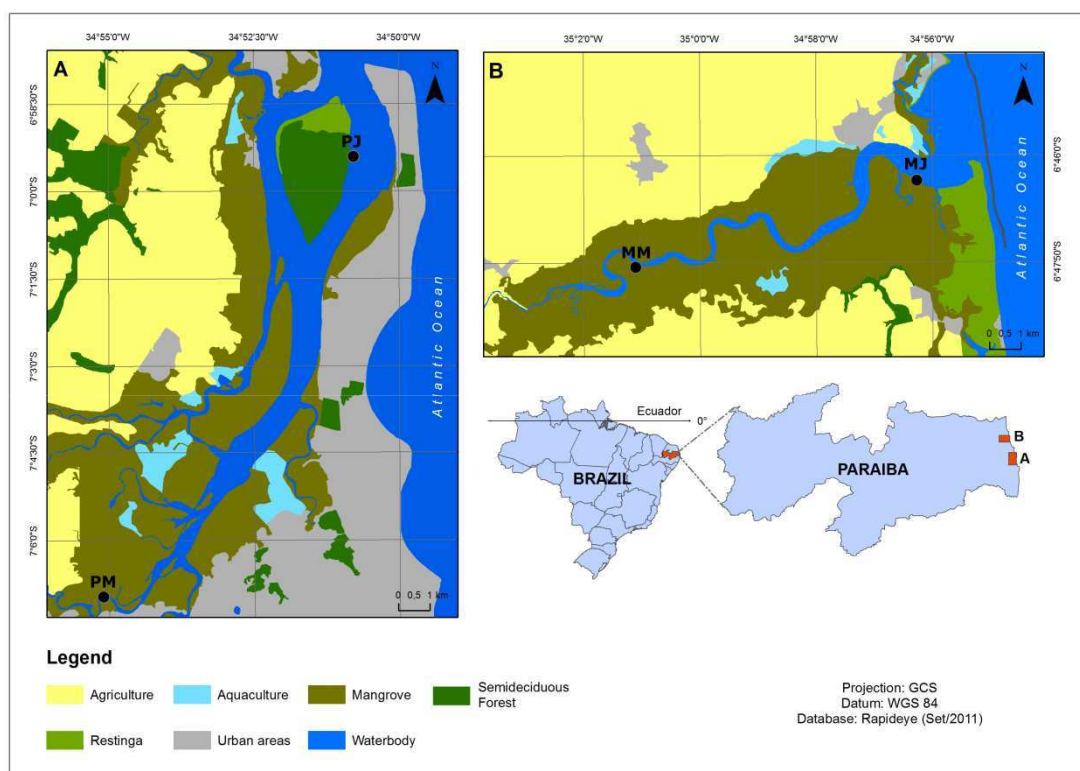


Figura 1. Localização das áreas de estudo: A. Estuário do Paraíba; B. Estuário do Mamanguape, Paraíba, Brasil. Pontos de coleta no estuário do Paraíba, PM (Ponto de coleta na zona montante) e PJ (Ponto de coleta na zona jusante), e no estuário do Mamanguape MM (Ponto de coleta na zona montante) e MJ (Ponto de coleta na zona jusante).

2.1.2 COLETA DE DADOS E ANÁLISES LABORATORIAIS

2.1.2.1 Dados Ambientais

As campanhas de amostragem foram feitas bimestralmente entre Abril/2016 e Março/2017, num total de seis campanhas em cada estuário. Os dois estuários foram divididos em duas zonas de coleta, segundo o gradiente de salinidade. No estuário do Paraíba, o ponto de coleta na zona montante (PM) está localizado em uma área urbana, onde a população despeja uma grande carga de esgoto doméstico. Já o ponto na zona jusante do estuário (PJ), encontra-se próximo ao porto de Cabedelo, na desembocadura do estuário. No estuário do Mamanguape, o ponto de coleta na zona montante (MM), é onde o ecossistema manguezal encontra-se aparentemente preservado. Já o ponto na zona jusante (MJ), é o local com a melhor qualidade de água do estuário. Para esse estudo, essa zona foi considerada como referência, ou seja, como o local menos

impactado entre os analisados, baseado nos trabalhos de Alves, *et al.* (2016) e dos Santos *et al.* (2017).

Valores de superfície para salinidade, temperatura da água (°C), pH, oxigênio dissolvido - OD (mg/l), sólidos totais dissolvidos - TDS (g/l) e potencial de oxirredução - ORP, foram medidos *in situ* utilizando uma sonda multiparâmetros (Horiba/U-50). Uma amostragem em MM e MJ e duas em PM e PJ foram desconsideradas devido ao mau funcionamento da sonda.

2.1.2.2 Dados Bióticos

Durante as mesmas campanhas de amostragem, em cada ponto nos estuários, os peixes foram capturados via arrastos manuais, realizados com rede de 10 m de comprimento X 1,5 m de altura e malha de 8 mm. Os arrastos ocorreram nas margens à montante e à jusante em cada estuário, em período diurno, na baixamar. As amostragens foram realizadas mediante a devida permissão do órgão ambiental competente, de acordo com Licenças concedidas ao Laboratório de Ictiologia (IBAMA/ICMBIO n°18623-1 e n. 31000-1).

Os indivíduos coletados (Tab. 1) foram transportados e mantidos em caixas plásticas com água do mesmo local em que foram capturados e aeração constante até a realização do experimento, que ocorreu no mesmo dia da coleta, no Laboratório de Ictiologia, Campus V, João Pessoa, UEPB.

Tabela 1. Peixes capturados nos estuários Paraíba e Mamanguape, entre Abril/2016 e Março/2017. Ordem segundo Eschemeyer *et al.* (2017).

Ordem	Família	Espécie	Abrev.	PB		MM		
				PM	PJ	MM	MJ	
Clupeiformes	Clupeidae	<i>Harengula clupeola</i>	<i>H. clu</i>				5	
		<i>Opisthonema oglinum</i>	<i>O. ogl</i>		7			
Siluriformes	Ariidae	<i>Cathorops spixii</i>	<i>C. spi</i>				10	
Atheriniformes	Atherinopsidae	<i>Atherinella brasiliensis</i>	<i>A. bra</i>	37	21	22	10	
Beloniformes	Hemiramphidae	<i>Hyporhamphus roberti roberti</i>	<i>H. rob</i>	27		10		
Perciformes	Centropomidae	<i>Centropomus undecimalis</i>	<i>C. und</i>	11				
		Carangidae	<i>Caranx latus</i>	<i>C. lat</i>				5
			<i>Oligoplites saliens</i>	<i>O. sal</i>		5		
	<i>Oligoplites saurus</i>		<i>O. sau</i>	3		4		
	Lutjanidae	<i>Lutjanus jocu</i>	<i>L. joc</i>	4			12	
	Gerreidae	<i>Diapterus auratus</i>	<i>D. aur</i>	12				
		<i>Eucinostomus argenteus</i>	<i>E. arg</i>	9	7	24		
		<i>Eucinostomus melanopterus</i>	<i>E. mel</i>	28	10		3	
		<i>Haemulopsis corvinaeformis</i>	<i>H. cor</i>		7			
	Sciaenidae	<i>Ophioscion punctatissimus</i>	<i>O. pun</i>		8			
	Mugilidae	<i>Mugil curema</i>	<i>M. cur</i>	8	7			
	Gobiidae	<i>Bathygobius soporator</i>	<i>B. sop</i>		3	5	16	
		<i>Gobionellus oceanicus</i>	<i>G. oce</i>	8	3			
<i>Gobionellus stomatus</i>		<i>G. sto</i>		9				
Ephippidae		<i>Chaetodipterus faber</i>	<i>C. fab</i>		8			
Pleuronectiformes		Achiridae	<i>Achirus achirus</i>	<i>A. ach</i>	4			
	<i>Achirus lineatus</i>		<i>A. lin</i>	6				
	<i>Trinectes paulistanus</i>		<i>T. pau</i>	6				
Tetraodontiformes	Tetraodontidae	<i>Colomesus psittacus</i>	<i>C. psi</i>	10				
		<i>Sphoeroides greeleyi</i>	<i>S. gre</i>		7	13	54	
		<i>Sphoeroides testudineus</i>	<i>S. tes</i>	38	8			
Total				211	110	93	100	

PM: Paraíba Montante; PJ: Paraíba Jusante; MM: Mamanguape Montante; MJ: Mamanguape Jusante.

2.1.2.3 Ensaio de acúmulo de rodamina B

A atividade de resistência a multixenobióticos foi determinada de acordo com uma adaptação do método descrito por Smital e Kurelec (1998). Para o experimento, os peixes foram transferidos para um aquário de vidro com densidade média de dois peixes/L de água reconstituída (água desclorada + sal marinho na salinidade do local de coleta) onde foi adicionado rodamina B (RB) (2,5 µM), um substrato fluorescente da P-

gp. Os peixes ficaram expostos a essa condição experimental durante 2h e, durante a exposição, o aquário foi protegido da incidência de luz direta.

Após o período de exposição, os peixes foram anestesiados com Eugenol e sacrificados. As brânquias, fígados, vesículas biliares e gônadas do peixe-rei *A. brasiliensis* (n=10), capturados na zona montante do estuário do rio Paraíba, e as brânquias das demais espécies, foram amostradas, pesadas e transferidas individualmente para microtubos de 2 mL. As amostras dos tecidos foram então homogeneizadas em 500 µl de água destilada e o homogeneizado foi centrifugado a 3000 g por 7 min. O sobrenadante foi transferido para uma microplaca escura de 96 poços em triplicata de 100 µl cada, onde a intensidade de fluorescência desse sobrenadante (que corresponde à fluorescência intracelular contida no tecido) foi medida através de um leitor de fluorescência (544 nm excitação e 590 nm emissão). Com o valor de fluorescência obtido de cada triplicata foi feita uma média, esse valor foi então dividido pelo peso correspondente da brânquia de cada indivíduo.

2.1.3 ANÁLISE DE DADOS

Os dados abióticos de cada zona dos dois estuários foram testados quanto a normalidade, em um nível de significância de $\alpha=0.05$. Tais valores foram submetidos à análise de Kruskal-Wallis One Way Anova, seguido pelo pós-teste Dunn para identificar possíveis diferenças entre as zonas.

Os dados de fluorescência obtidos foram primeiramente divididos por 100 para a melhor visualização dos valores. Assim como os dados abióticos, os dados de fluorescência também foram testados para a normalidade, em um nível de significância de $\alpha=0.05$. Foram submetidos à análise de Kruskal-Wallis One Way Anova, seguido pelo pós-teste Dunn, para identificar as diferenças de acúmulo de rodamina B entre os tecidos de *A. brasiliensis*. Assim como para identificar as diferenças de acúmulo de rodamina B entre as espécies de cada zona, em cada estuário.

As espécies mais abundantes e com melhor distribuição também foram submetidas à análise descrita acima, sendo plotadas individualmente em histogramas segundo as zonas em que foram capturadas.

Uma análise de correspondência canônica (CCA), utilizando o Past versão 3.18 (Hammer *et al.*, 2001), foi realizada para identificar possíveis relações entre as variáveis abióticas mensuradas e o acúmulo de fluorescência das mesmas espécies, as mais

abundantes e com melhor distribuição. Para os dados de fluorescência, foram feitas médias dos valores obtidos de cada indivíduo por espécie em cada estuário, onde foi feita a transformação dessa média utilizando Log10.

3 RESULTADOS

3.1 PARÂMETROS AMBIENTAIS

Dentre os fatores abióticos mensurados, a maioria não revelou diferença significativa entre as zonas em cada estuário ($p > 0,05$). Somente a salinidade diferiu significativamente entre as zonas nos dois estuários ($p < 0,05$). Como esperado, a salinidade foi alta nas zonas a jusante (PJ e MJ) e baixa nas zonas a montante (PM e MM) nos dois estuários.

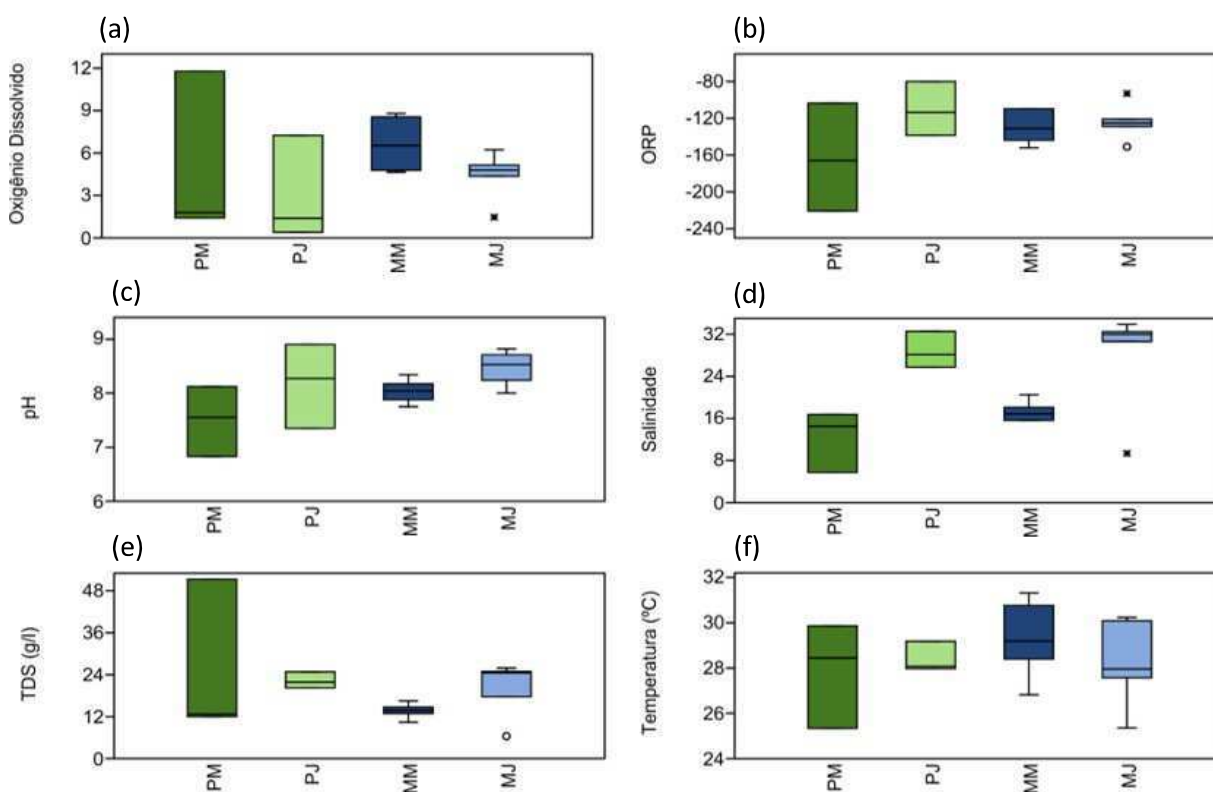


Figura 2 - Boxplots dos parâmetros físico-químicos das zonas a montante (PM) e jusante (PJ) do estuário do Paraíba e das zonas montante (MM) e jusante (MJ) do Mamanguape: (a) oxigênio dissolvido, (b) ORP, (c) pH, (d) salinidade, (e) TDS, (f) temperatura.

3.2 ANÁLISE TECIDUAL DO ACÚMULO DE RODAMINA B DE *Atherinella brasiliensis*

Os resultados obtidos mostraram uma diferença clara na acumulação de RB entre os tecidos de *A. brasiliensis*. Foi observado um maior acúmulo de RB na vesícula biliar, sendo esse, 171,3 vezes maior do que nas brânquias. Uma maior acumulação também foi observada no fígado (11,8 vezes em comparação com as brânquias). Enquanto que o acúmulo de RB nas gônadas foi 6,0 vezes maior do que nas brânquias (Fig. 3).

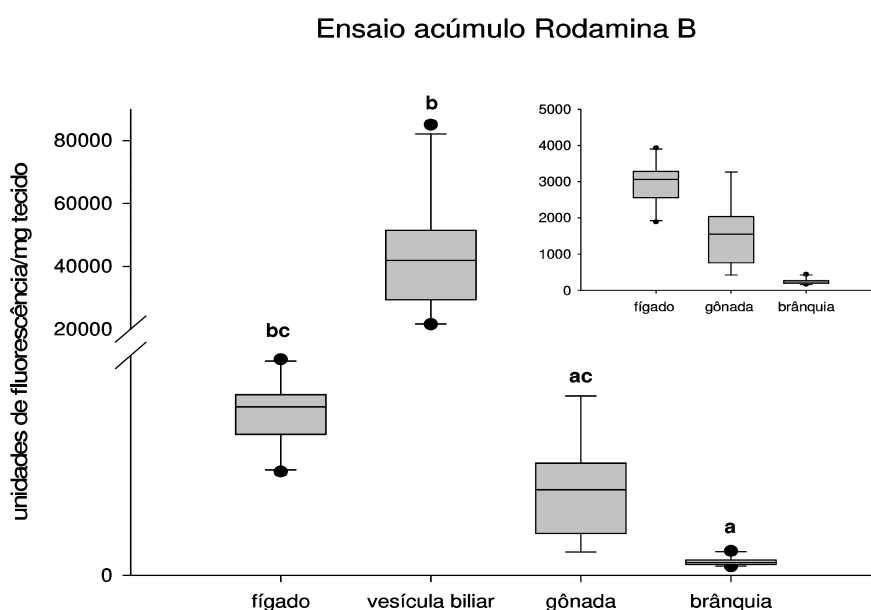


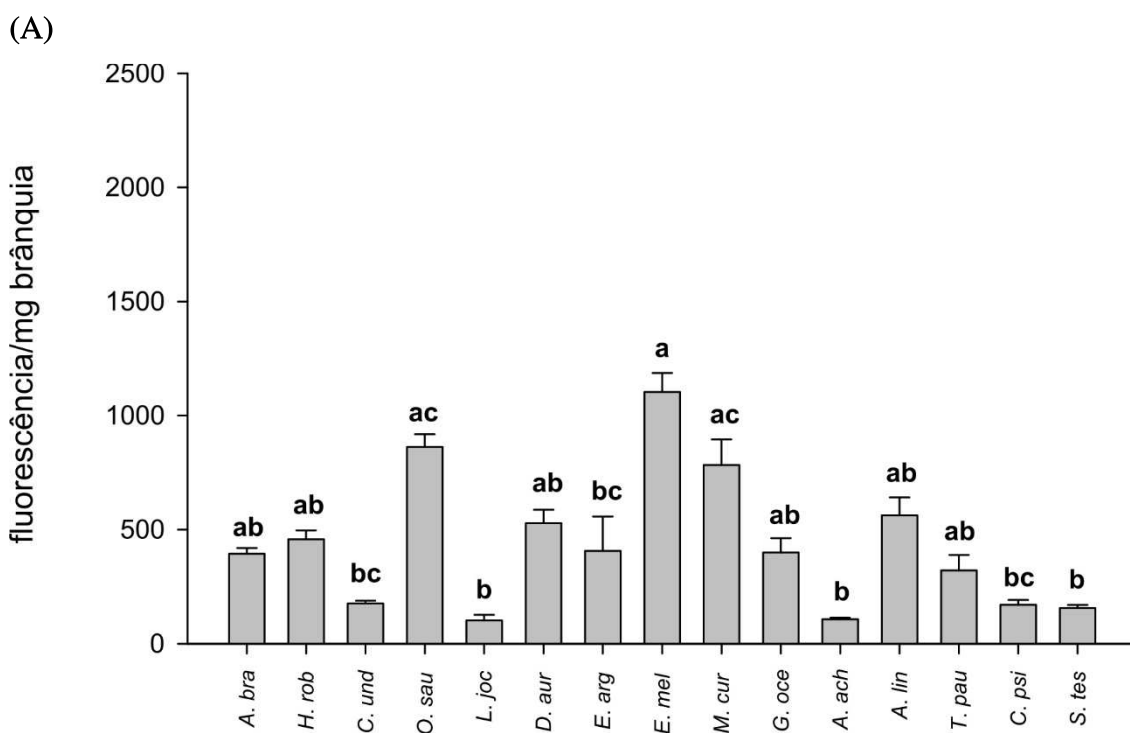
Figura 3 - Ensaio de acumulação de rodamina B (RB) em diferentes tecidos de *Atherinella brasiliensis* provenientes do estuário do rio Paraíba. Em destaque, acúmulo de RB no fígado, gônada e brânquia para a melhor visualização dos valores de fluorescência para esses tecidos. Colunas com letras iguais representam valores médios de fluorescência estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,05$).

3.3 ANÁLISE GERAL DO ACÚMULO DE RODAMINA B POR ZONA

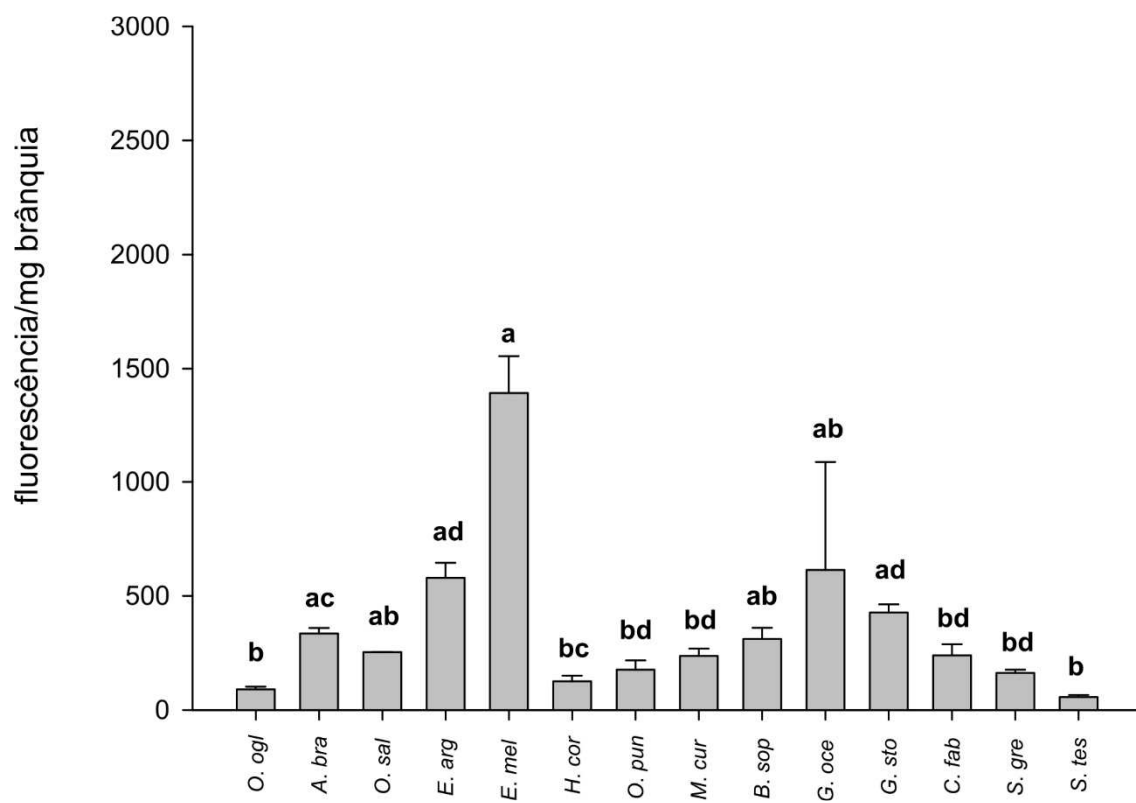
O ensaio de acúmulo de rodamina B com as espécies encontradas no estuário do Paraíba, mostrou que tanto na zona montante (PM) (Fig. 4 A), quanto na zona jusante (PJ) (Fig. 4 B) *E. melanopterus* (1103,54) apresentou o maior acúmulo médio de RB. O acúmulo encontrado nessa espécie apresentou diferença estatística significativa com 6 espécies na PM (*C. undecimales*, *L. jocu*, *E. argenteus*, *A. achirus*, *C. psittacus* e *S. testudineus*) e 7 espécies na PJ (*O. oglinum*, *H. corvinaeformis*, *O. puctatissimus*, *M.*

curema, *C. faber*, *S. greeleyi* e *S. testudineus*) ($p < 0,05$). Uma dessas espécies, *S. testudineus*, figurou entre as que apresentaram os menores acúmulos tanto na zona PM (156,07), quanto na PJ (55,99).

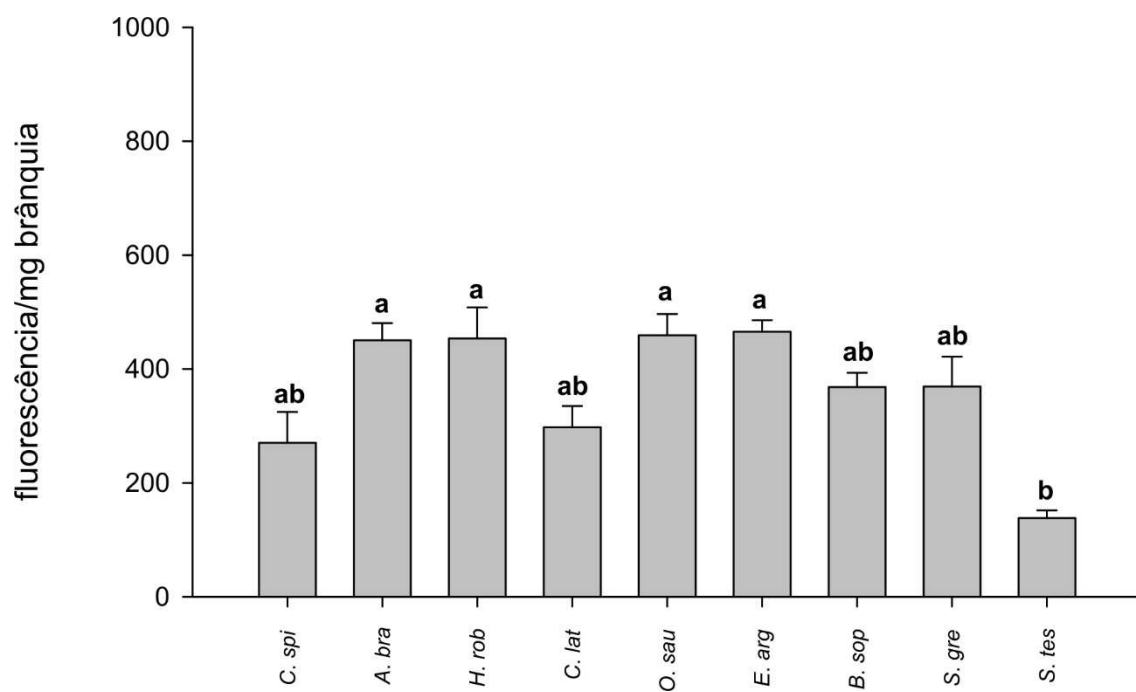
No estuário do Mamanguape, *E. argenteus* (518,44) foi a espécie que apresentou o maior acúmulo médio na zona MM (Fig. 4 C) e *L. jocu* (1208,18) na zona MJ (Fig. 4 D). *E. argenteus* apresentou diferença significativa quanto o acúmulo de RB somente com *S. testudineus* ($p < 0,05$), enquanto que *L. jocu* não apresentou diferença significativa com nenhuma espécie ($p > 0,05$). *S. testudineus* também se destacou por apresentar os menores valores de acúmulo médio de RB nas duas zonas, MM (138,16) e MJ (61,53), apresentando diferença significativa com 4 outras espécies ($p < 0,05$) na zona MM (*A. brasiliensis*, *H. roberti roberti*, *O. saurus* e *E. argenteus*) e 2 na MJ (*A. brasiliensis* e *B. soporator*).



(B)



(C)



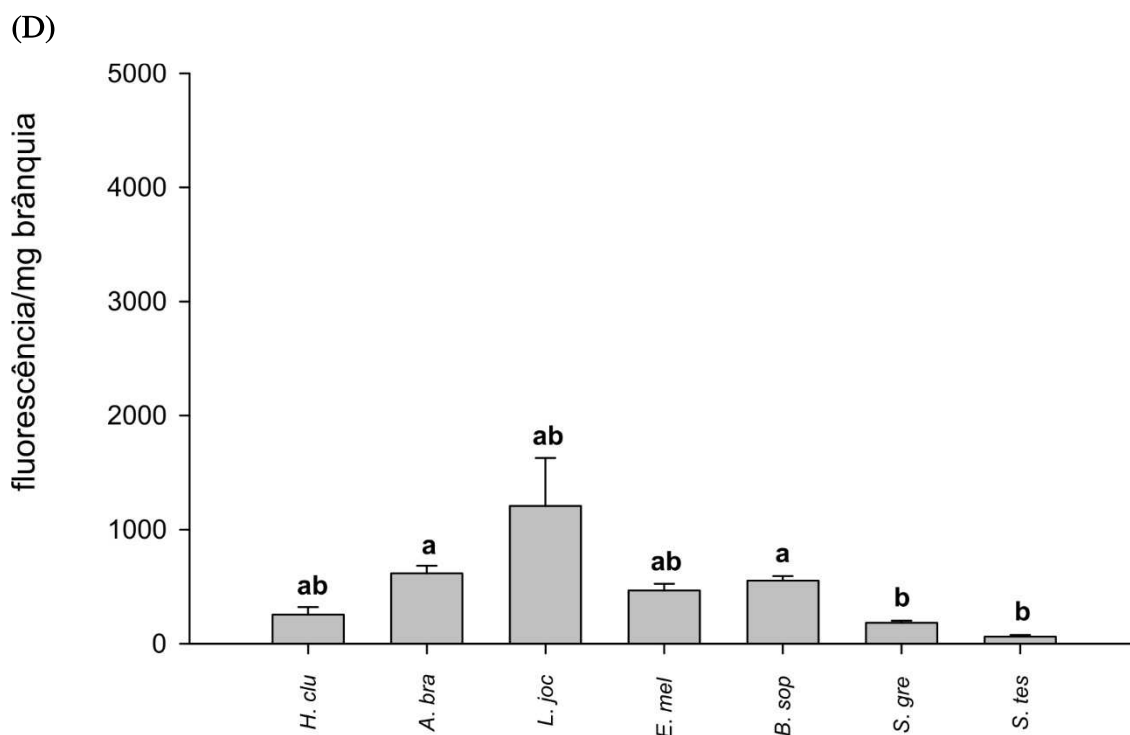


Figura 4 – Fluorescência das brânquias da ictiofauna do estuário do rio Paraíba à montante (A) e à jusante (B) e do estuário do rio Mamanguape à montante (C) e à jusante (D). Colunas com letras iguais representam valores médios de fluorescência estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,05$).

3.4 ANÁLISE INTRAESPECÍFICA DO ACÚMULO DE RODAMINA B

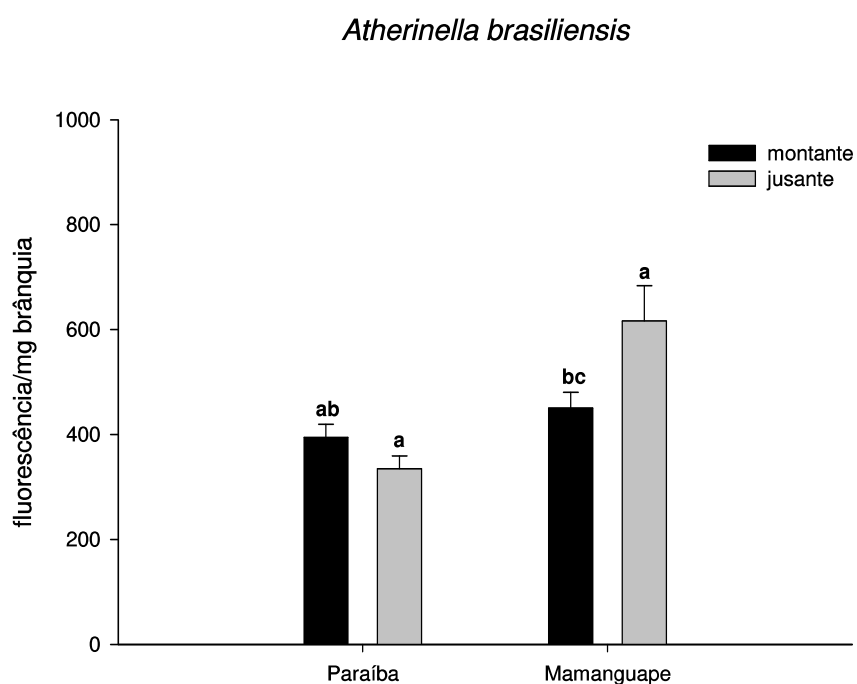
A atividade da MXR de sete espécies com melhor distribuição espacial (*A. brasiliensis*, *E. argenteus*, *E. melanopterus*, *M. curema*, *B. soporator*, *S. greeleyi*, *S. testudineus*) foram plotadas individualmente (Fig. 5), *A. brasiliensis* e *S. testudineus* foram as únicas a apresentarem indivíduos capturados nos dois estuários e nas duas zonas em cada estuário, sendo aqui apresentada uma comparação espacial para estas duas espécies.

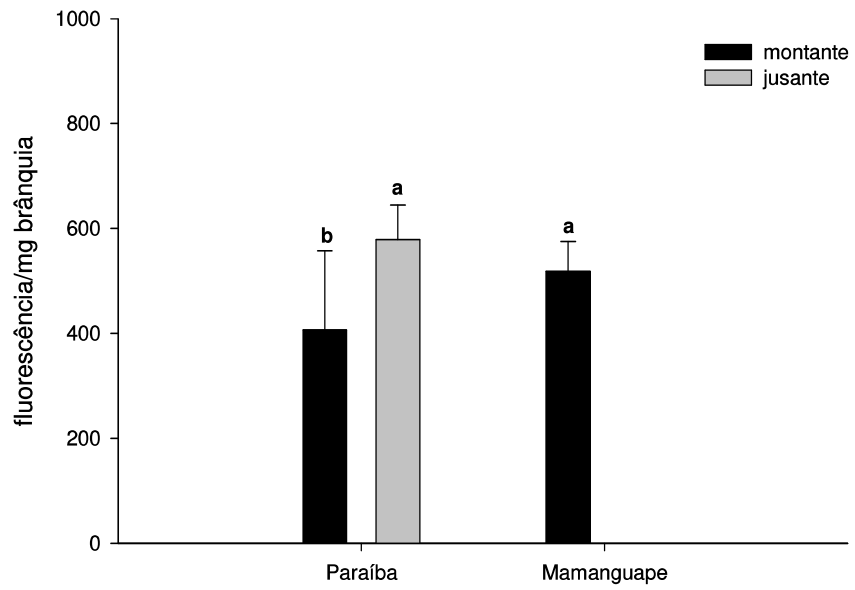
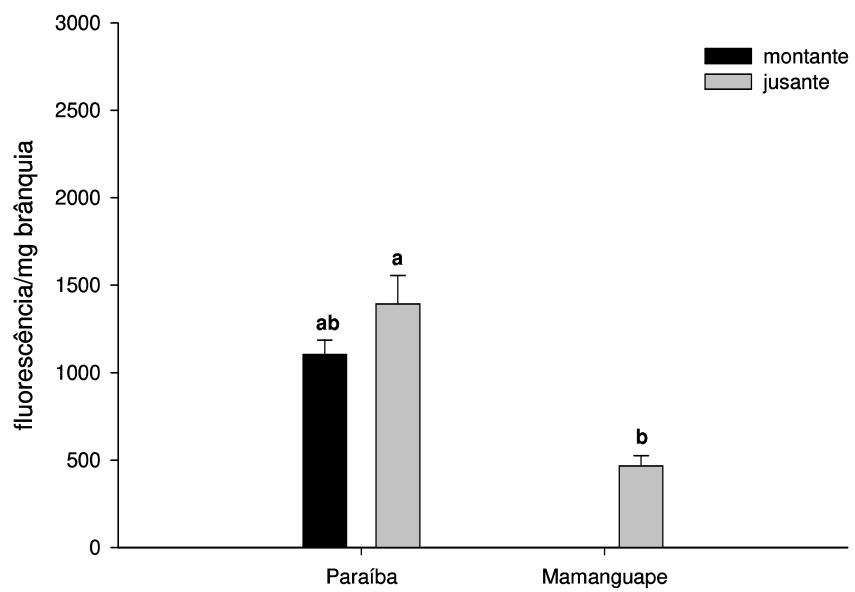
3.4.1 COMPARAÇÃO ENTRE OS ESTUÁRIOS

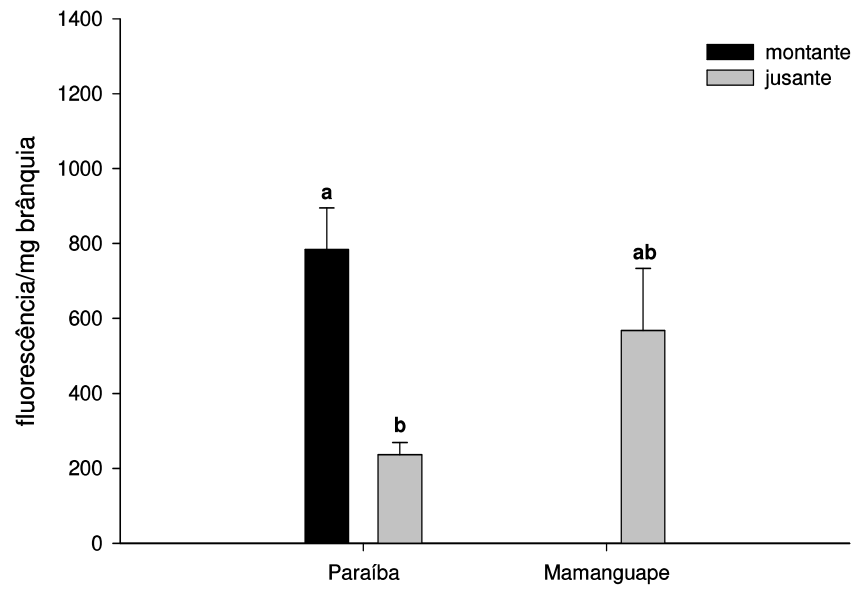
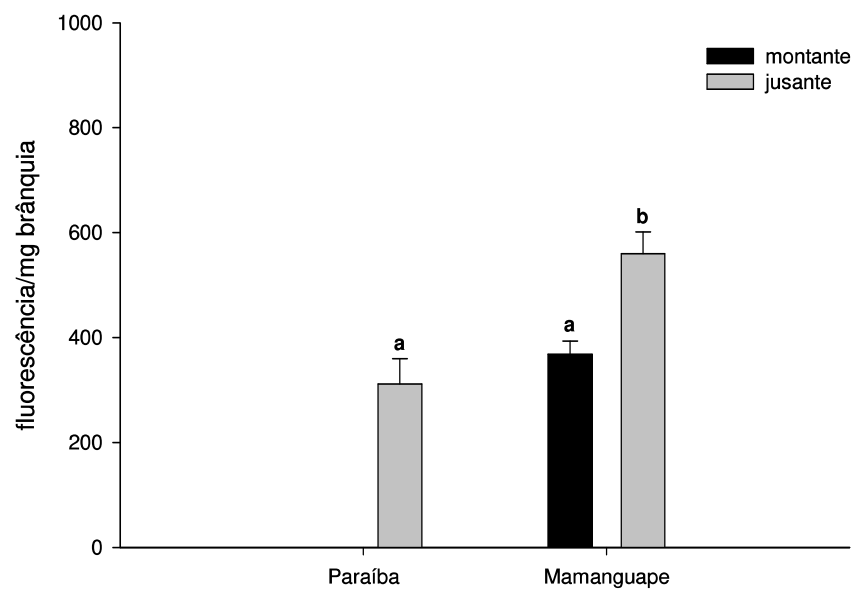
Quando comparadas as zonas PM com MM e PJ com MJ, foi observado que *E. argenteus* foi a única espécie, dentre as estudadas, que apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados os acúmulos de RB nas zonas PM e MM. Enquanto *E. melanopterus* e *B. soporator* apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparadas as zonas PJ e MJ (Fig. 5).

3.4.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS ZONAS EM CADA ESTUÁRIO

A maioria das espécies não diferiu significativamente, quando houve a possibilidade de comparar seus respectivos acúmulos de RB entre as zonas montante e jusante de cada estuário, com exceção de três espécies no Paraíba (*E. argenteus*, *M. curema* e *S. testudineus*) e três no Mamanguape (*A. brasiliensis*, *B. soporator* e *S. greeleyi*), as quais diferiram significativamente entre as zonas montante e jusante, em cada estuário ($p < 0,05$) (Fig. 5).



Eucinostomus argenteus*Eucinostomus melanopterus*

Mugil curema*Bathygobius soporator*

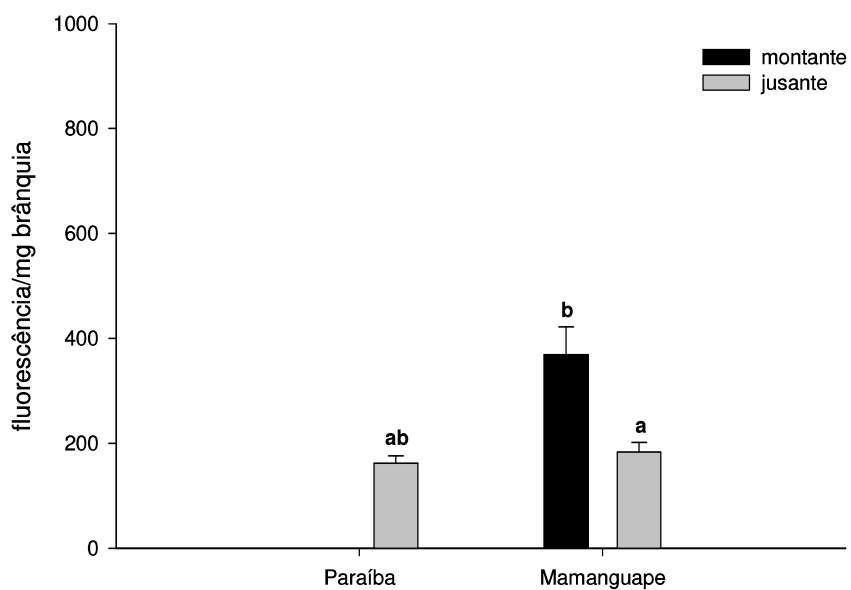
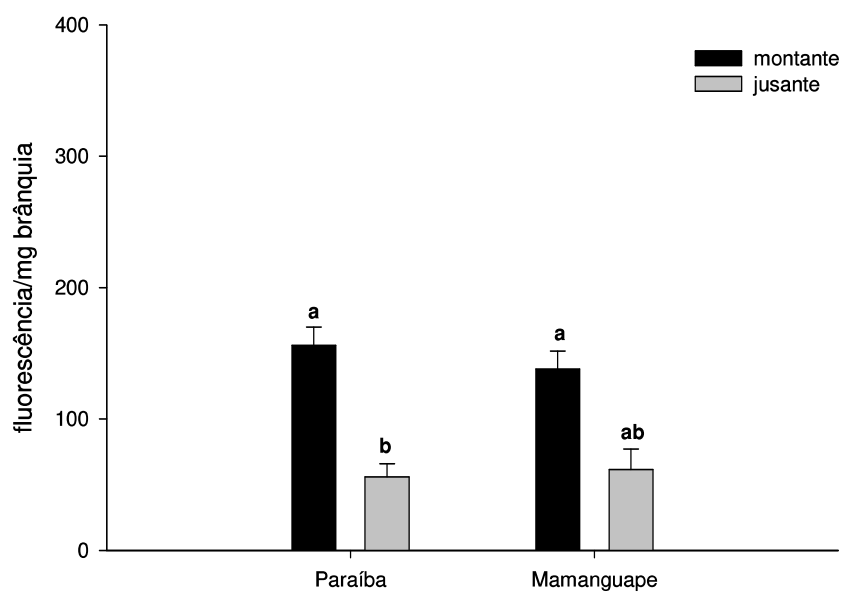
Sphoeroides greeleyi*Sphoeroides testudineus*

Figura 5 – Fluorescência intracelular das brânquias das espécies de peixe mais abundante e com melhor distribuição considerando dois estuários, Paraíba e Mamanguape e duas zonas, montante e jusante. Colunas com letras iguais representam valores médios de fluorescência estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,05$).

3.5 PARÂMETROS AMBIENTAIS ASSOCIADOS AO ACÚMULO DE RODAMINA B

A análise da correspondência canônica (CCA) aplicada as mesmas sete espécies, foi significativa ($p = 0,015$) e explicou 89,25% da variação no acúmulo de RB nos peixes (69,23% no primeiro eixo e 20,02% no segundo). Tal análise definiu dois eixos distintos, um determinado pela oposição entre oxigênio dissolvido e TDS, que pode ser associado ao gradiente de poluição e outro associado ao gradiente de salinidade, que opõe setores à montante e à jusante nos dois estuários. De acordo com o primeiro eixo, as espécies *M. curema*, *S. greeleyi* e *S. testudineus* variam o acúmulo de RB de acordo com a temperatura e oxigênio dissolvido, já as espécies *A. brasiliensis*, *E. argenteus*, *E. melanopterus* e *B. soporator* variam o acúmulo de RB de acordo com TDS, ORP, pH e salinidade. O segundo eixo do CCA mostra que *E. argenteus*, *M. curema* e *S. testudineus* estão relacionados com um maior acúmulo de RB em ambientes com grande quantidade de materiais dissolvidos na água, enquanto que esse eixo ainda separa as outras espécies, que estão relacionadas com os demais parâmetros ambientais (Fig. 6).

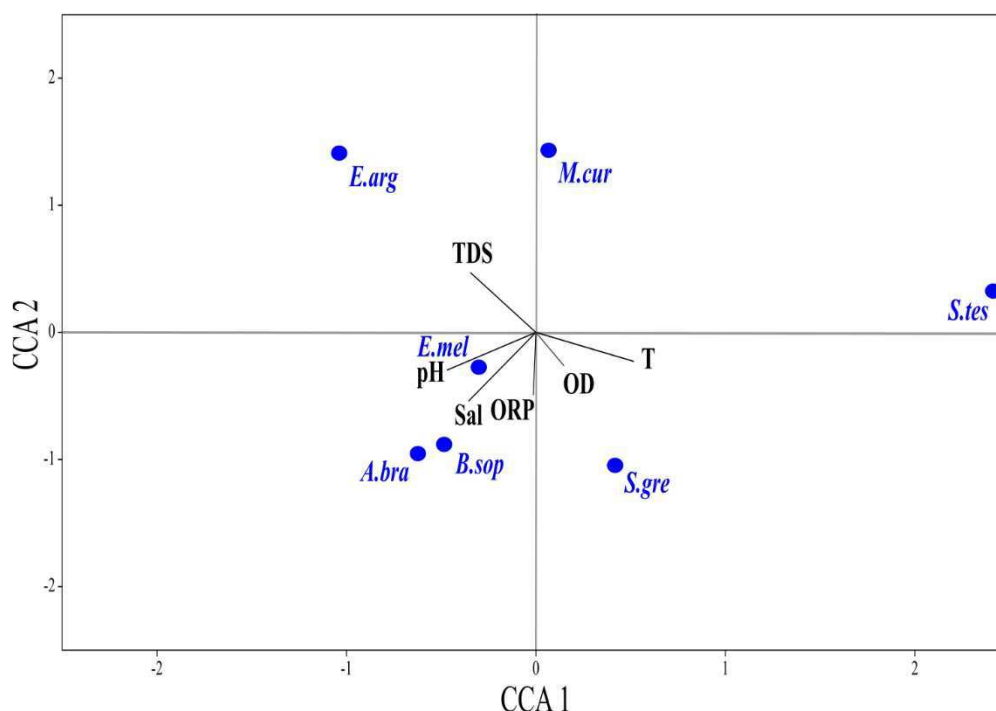


Figura 6 - Diagrama de dispersão dos dois primeiros eixos resultantes da análise de correspondência canônica (CCA) utilizando os dados de fluorescência das sete espécies de peixes mais abundantes utilizadas neste estudo (*Atherinella brasiliensis*, *Eucinostomus argenteus*, *Eucinostomus melanopterus*, *Mugil curema*, *Bathygobius soporator*, *Sphoeroides greeleyi* e *Sphoeroides testudineus*) confrontando com parâmetros ambientais obtidos nos estuários.

4 DISCUSSÃO

4.1 BRÂNQUIA COMO TECIDO ALVO

A diferença na acumulação de RB entre os tecidos de *A. brasiliensis* comprova que, para essa espécie, ocorre uma diferença de expressão do mecanismo MXR entre esses tecidos. O alto acúmulo de RB na vesícula biliar sugere que esse tecido possui uma baixa atividade da MXR. Ao mesmo tempo, esse acúmulo pode ser devido ao transporte de efluentes advindos do fígado por bombas canaliculares, o que resulta em uma excreção biliar, como evidencia Luckenbach *et al.* (2014) em sua revisão, o que resulta em um aumento da quantidade de RB presente nesse tecido, explicando assim os altos valores de fluorescência observados.

A elevada acumulação no fígado indica o papel fundamental que esse órgão desempenha. Segundo Schlenk *et al.* (2008), o fígado é importante na desintoxicação de compostos endógenos e exógenos, incluindo muitos produtos químicos orgânicos que têm relevância como poluentes ambientais. Devido a isso, o fígado possui diversos mecanismos de desintoxicação, principalmente através de outras proteínas de resistência, como destacado na revisão feita por Luckenbach *et al.* (2014). Essa característica pode ser a causa da baixa atividade da MXR, pois, como essa é responsável pela desintoxicação inespecífica e o fígado já possui diversos outros mecanismos mais específicos, esse órgão não necessitaria da expressão do mecanismo MXR, levando então ao alto acúmulo de RB observado nesse tecido.

O elevado acúmulo observado na vesícula biliar e no fígado corrobora com os estudos de Smital e Sauerborn (2002) para a carpa *Cyprinus carpio*, porém, nessa espécie, o fígado mostrou uma maior acumulação de RB em relação à vesícula biliar, contudo, ambos possuem um acúmulo de RB muito elevado, quando comparados com os demais tecidos.

O menor acúmulo nas gônadas mostra que esse tecido possui uma maior atividade da MXR. Apesar de poucos estudos com esse tecido, Loncar *et al.* (2010) constataram que transcritos da P-gp eram abundantes nos ovários da truta-arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. Essa maior expressão pode estar ligada a proteção que esse tecido necessita, pois danos no tecido gonadal podem levar a uma disfunção reprodutiva.

As brânquias, por possuírem uma grande superfície epitelial, bem como um contato constante com a água e uma efetiva circulação de sangue, representam um local predominante tanto para a absorção, quanto para a eliminação de xenobióticos, como mostrado por Kleinow *et al.* (2008). Devido a isso, a atividade da MXR é necessária nesse tecido, impedindo que xenobióticos entrem nas células e, por esse motivo, a brânquia apresentou a menor acumulação de RB dentre todos os tecidos analisados.

A gônada e, principalmente, a brânquia mostraram-se como os órgãos mais importantes dentre os analisados, para a detecção funcional da atividade do fenótipo MXR, por possuírem os menores acúmulos de RB e consequentemente demonstrarem uma maior atividade de transporte desse substrato, mostrando a atuação do mecanismo MXR na proteção desses tecidos. Por isso, recomenda-se a utilização das brânquias para observar a atividade da MXR da espécie *A. brasiliensis*.

4.2 DIFERENÇA INTERESPECÍFICA DA ATIVIDADE DA MXR

As proteínas transportadoras transmembranas da família ABC contribuem para o fenótipo MXR nas células, levando a extrusão de substâncias tóxicas. O potencial de utilização da atividade da MXR como biomarcador da contaminação aquática baseou-se em vários estudos que indicaram a maior expressão da P-gp e a maior atividade da MXR, quando o organismo aquático é exposto a poluentes como resíduos industriais (produtos químicos, alimentos, entre outros), resíduos domésticos (esgoto) e atividades agrícolas (fertilizantes, pesticidas, herbicidas) (Albertus e Laine, 2001; Anjos *et al.*, 2017; Cunha *et al.*, 2017; Honorato *et al.*, 2017; Valton *et al.*, 2017). O presente estudo fornece uma melhor compreensão da atividade da MXR das assembleias de peixes de dois estuários tropicais, utilizando o potencial desse mecanismo como ferramenta de avaliação da qualidade ambiental em estuários, apontando espécies mais vulneráveis e mais resistentes a uma variação ambiental decorrente do aumento da poluição local.

Os resultados obtidos mostraram que as espécies possuem diferentes níveis de atividade da MXR, comprovando a hipótese de que essa atividade é inerente a cada espécie, corroborando assim com o estudo de Smital *et al.* (2000) que mostra que existe uma diferença espécie-específica na atividade da MXR em moluscos. Isso pode causar consequências na distribuição natural e na abundância das espécies.

E. melanopterus, apesar de compor a ictiofauna de diversos estuários com níveis altos de poluição (Rocha e Dias., 2015; Cortelleto *et al.*, 2017; Falcão *et al.*, 2017), foi

uma das espécies que apresentou os maiores acúmulos de RB nas duas zonas do Paraíba, mostrando que nesse estuário essa população está mais vulnerável a poluição, quando comparada com as demais. Esses resultados mostram a necessidade do estudo dessa espécie quanto a sua suscetibilidade à poluição. Isso se aplica a várias outras espécies presentes nesse estudo, como é o caso de *B. soporator*, *S. greeley* e *E. argenteus*, que não possuem estudos com essa abordagem.

Diferente de *E. melanopterus*, o baiacu, *S. testudineus* apresentou um dos menores acúmulos de RB nos dois estuários, isso pode estar ligado diretamente a fatores evolutivos e/ou ao seu hábito bentônico. Essa é uma espécie pouco predada, pois são tóxicas devido a presença de tetrodotoxina (Macêdo *et al.*, 2017), por isso também não são explorados economicamente no Brasil (Possatto, 2006). Devido ao hábito bentônico, eles estão em contato constante com o sedimento e, portanto, pode-se inferir que o mesmo encontra-se exposto à maior contaminação que os peixes da coluna d'água. Sabendo-se que o sedimento é um compartimento onde ocorre acumulação expressiva de contaminantes (Adams *et al.*, 1992). Portanto, a baixa taxa de predação e o contato constante com a poluição do sedimento, podem ter conferido evolutivamente uma maior resistência a esses animais. Essa espécie ainda apresenta um comportamento não-migratório, ou seja, são residentes estuarinos. Isso é reforçado pela afirmação de Figueiredo e Menezes (2000) de que os baiacus podem permanecer em um mesmo local durante todo o ano. Noletto (2009) sugere que tal comportamento garante uniformidade nos padrões genéticos populacionais.

Algumas outras espécies de mesmo hábito mostraram o mesmo resultado que *S. testudineus*, como foi o caso do linguado *A. achirus* (PM) e do congênere *S. greeleyi* (MJ), contribuindo assim para sustentar a hipótese de que o hábito do peixe influencia na atividade da MXR. Portanto, peixes com hábito pelágico teriam uma menor atividade da MXR em comparação com peixes de hábito bentônico. Isso poderá ser evidenciado em estudos futuros que analisem a atividade da MXR de indivíduos capturados em regiões mais profundas.

4.3 ATIVIDADE DA MXR COMO BIOMARCADOR

Para observar a qualidade ambiental a partir dos resultados obtidos, faz-se necessário analisar cada espécie e o comportamento da atividade da MXR em cada zona, pois, como visto, cada espécie possui uma atividade espécie-específica. Para a

comparação das zonas em cada estuário, no Paraíba foi observado que a tainha *M. curema* e o baiacu *S. testudineus* obtiveram acúmulo de RB significativamente maior em PM do que em PJ, esse resultado sugere que a atividade da MXR é maior à jusante e por isso uma maior quantidade de RB foi retirada das células. Segundo Damaré *et al.* (2009), muitos poluentes têm a capacidade de modular o mecanismo MXR através da inibição ou indução da P-gp. O aumento da expressão dessa proteína é induzido pela presença de contaminantes (Smital *et al.*, 2000). Portanto, os peixes capturados na área com a maior concentração de poluentes devem apresentar um menor acúmulo de RB. Sendo assim, a atividade da MXR de *M. curema* e *S. testudineus* no estuário do Paraíba, sugere que a zona PJ tem uma maior concentração de poluentes em comparação a PM. Em contrapartida, no mesmo estuário, *E. argenteus* mostra o inverso, onde o baixo acúmulo de RB à montante no Paraíba sugere que essa zona seria mais poluída do que a PJ. Essa diferença de resultados mostra a importância de se comparar a bioacumulação em diferentes espécies para poder utilizar o mecanismo MXR como uma ferramenta confiável de avaliação da condição ambiental local.

No estuário do Mamanguape, *A. brasiliensis* e *B. soporator*, tiveram um menor acúmulo de RB na zona MM confirmando, portanto, que essa zona é mais poluída que a zona MJ (tomada nesse estudo como a zona de referência). No mesmo estuário *S. greeleyi* mostrou o inverso do apresentado pelas outras espécies, porém, isso foi associado ao número elevado de indivíduos analisados na zona MJ em comparação com a zona MM, o que indica a influência do tamanho amostral na aplicação dessa ferramenta de avaliação.

4.4 MUDANÇAS NA ATIVIDADE DA MXR DE ACORDO COM A VARIAÇÃO AMBIENTAL

Vários estudos realizados nos últimos anos em ambientes aquáticos indicaram a necessidade de considerar as interações entre fatores bióticos e abióticos (Horak e Assef, 2017). Parâmetros abióticos, como temperatura, salinidade, turbidez, entre outros, podem influenciar a interpretação das respostas dos biomarcadores (Bodin *et al.*, 2004; Pain *et al.*, 2007). Alguns estudos procuraram evidenciar a interação desses fatores abióticos com a MXR (Horak e Assef, 2017), ou como também, com o transportador ABCB1 (Honorato *et al.*, 2017). Porém, nenhum deles, traz peixes como organismo alvo.

Devido a isso, no presente estudo foi feita uma CCA que permite uma melhor visualização de como os fatores abióticos estão relacionados com a MXR dos peixes. No gradiente de poluição da CCA nota-se uma redução do OD, que pode resultar do aumento da degradação aeróbica por bactérias que se proliferam com o aumento do impacto antrópico indicado pelo aumento do TDS, parâmetro associado à incidência indireta de poluição antrópica. De toda forma, essa análise mostra claramente que existe uma interação entre os fatores abióticos e a atividade da MXR que vem a afetar a retirada de xenobióticos das células desses peixes.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo evidenciam, dentre os tecidos analisados, as brânquias e as gônadas como principais órgãos para a detecção funcional da atividade da MXR de *A. brasiliensis*. Além disso, a atividade inerente espécie-específica também foi evidenciada. Foi observado ainda, que o hábito dos peixes na coluna d'água é um fator determinante na atividade da MXR devido à diferença no acúmulo de RB encontrada entre peixes bentônicos e pelágicos. Com isso, foi verificado que a utilização da atividade da MXR da comunidade de peixes pode ser importante na avaliação do *status* ecológico dos estuários estudados, comprovando assim, a hipótese inicial. Porém, isso deve ser feito com base na atividade da MXR individual da espécie.

Com isso os resultados aqui apresentados são relevantes para o melhor entendimento da fisiologia dessas espécies e para a avaliação da qualidade do ambiente estuarino. Estes resultados devem ser interpretados com cautela porque o mecanismo MXR não está totalmente caracterizado em espécies aquáticas. São necessários mais estudos para avaliar a importância deste sistema em comparação com outros mecanismos de desintoxicação em peixes. Contudo, o experimento concebido e executado com foco em peixes de ambientes estuarinos, locais de fácil acesso e com indícios claros de resiliência ao grau de impacto ao qual estão expostos, demonstra que é possível, à luz do conhecimento atual e com baixo custo, avaliar os impactos aos quais estes ecossistemas estão sujeitos, levando em conta a facilidade e a necessidade de um monitoramento constante dos estuários urbanos, amplamente distribuídos ao longo de toda costa brasileira.

COMPARATIVE ANALYSIS OF MULTIXENOBIOTIC RESISTANCE
PHENOTYPE IN TWO ESTUARINE FISH ASSEMBLAGES

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the activity of the multixenobiotic resistance (MXR) phenotype of the fish assemblages from two tropical estuaries, with different degrees and types of anthropic impact, a more impacted estuary, the Paraíba estuary, and a moderately impacted, the Mamanguape estuary, with the hypothesis that the activity of multixenobiotics resistance of the fish assemblage is a good indicator of the ecological status of the environment. For this, were used rhodamine B (RB) accumulation assays, a fluorescent substrate of the transmembrane glycoprotein P (P-gp), the major molecular basis of the MXR phenotype responsible for removing the xenobiotics from within the cell. First, the activity of the MXR phenotype in different tissues of the key species *Atherinella brasiliensis* was investigated, indicating the difference on the mechanism in each tissue. The results showed that the gills have a lower accumulation of RB. Therefore, a greater expression of the MXR phenotype when compared to the other tissues analysed. Thus, for the later tests, the accumulation of RB was only analysed in the fish gills of the two estuaries. The results also showed that the species have different levels of MXR activity, thus revealing the existence of a species-specific difference in the MXR activity in fishes submitted to the same condition. Among another species studied, *Eucinostomus melanopterus* was one of the ones that presented the highest RB accumulations in the Paraíba estuary, showing that in this estuary, this population would be more vulnerable to pollution, when compared to the others analysed. On the other hand, the pufferfish, *Sphoeroides testudineus* presented one of the smallest accumulations of RB in the two estuaries. This may be linked directly to evolutionary factors and/or to its benthic habit. Some other species of the same habit showed the same result, thus contributing to the hypothesis that the habit of the fish in the water column influences MXR activity. The present study provides a better understanding of the MXR activity of fish assemblages from two tropical estuaries using the potential of this mechanism to assess the environmental quality of each estuary, revealing which species would be most vulnerable and which would be more resistant to pollution in those estuaries. These analyses are unprecedented for fish on estuaries and are therefore relevant to a better understanding of the physiology of the species and the quality of the environment in which they occur.

Palavras-Chave: Tropical estuaries, MXR, Pufferfish.

REFERÊNCIAS

- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., & Bourdineaud, J. P. (2004). Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic toxicology*, 67(4), 347-357. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.01.014

- Adams, W. J., Kimerle, R. A., & Barnett Jr, J. W. (1992). Sediment quality and aquatic life assessment. *Environmental science & technology*, 26(10), 1864-1875. doi: 10.1021/es00034a001
- Albertus, J. A., & Laine, R. O. (2001). Enhanced xenobiotic transporter expression in normal teleost hepatocytes: response to environmental and chemotherapeutic toxins. *Journal of Experimental Biology*, 204(2), 217-227.
- Alves, R. R. N., & Nishida, A. K. (2004). Population structure of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda; Brachyura) in the estuary of the Mamanguape River, Northeast Brazil. *Tropical Oceanography*, 32(1), 23-37. doi: 10.5914/tropocean.v32i1
- Alves, V. E. N., Patrício, J., Dolbeth, M., Pessanha, A., Palma, A. R. T., Dantas, E. W., & Vendel, A. L. (2016). Do different degrees of human activity affect the diet of Brazilian silverside *Atherinella brasiliensis*?. *Journal of fish biology*, 89(2), 1239-1257. doi: 10.1111/jfb.13023
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C., & Rainbow, P. S. (Eds.). (2012). *Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects*. CRC Press.
- Anjos, V. A., Sandrini, J. Z., Martinez, C. B. R., & Souza, M. M. (2017). Characterization of MXR activity in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* exposed to copper. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 202, 12-18. doi: 10.1016/j.cbpc.2017.07.003
- Bard, S. M. (2000). Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 48(4), 357-389. doi: 10.1016/S0166-445X(00)00088-6
- Bodin, N., Burgeot, T., Stanisiere, J. Y., Bocquené, G., Menard, D., Minier, C., ... & Budzinski, H. (2004). Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138(4), 411-427. doi: 10.1016/j.cca.2004.04.009
- Bonnafé, E., Sroda, S., Budzinski, H., Valière, A., Pedelluc, J., Marty, P., & Geret, F. (2015). Responses of cytochrome P450, GST, and MXR in the mollusk *Corbicula fluminea* to the exposure to hospital wastewater effluents. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 11033-11046. doi: 10.1007/s11356-015-4309-x
- Castro, P., & Huber, M. E. (2012). *Biologia Marinha*. AMGH Editora. 8ª ed.

- Cortellete, G. D. M., Godefroid, R. S., Silva, A. L. C. D., Cattani, A. P., Daros, F. A., & Spach, H. L. (2017). Peixes da área de deposição de material dragado na Baía de Antonina, Paraná, Brasil. *Cadernos da Escola de Saúde*, 1(2).
- Cunha, V., Burkhardt-Medicke, K., Wellner, P., Santos, M. M., Moradas-Ferreira, P., Luckenbach, T., & Ferreira, M. (2017). Effects of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on multixenobiotic resistance (MXR) related efflux transporter activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology and environmental safety*, 136, 14-23. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.10.022
- Damaré, C. L., Kaddoumi, A. K., & Baer, K. N. (2009). Investigation of the multixenobiotic resistance mechanism in the freshwater fishes western mosquitofish, *Gambusia affinis*, and Bluegill Sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 83(5), 640. doi: 10.1007/s00128-009-9846-x
- dos Santos, M. B., Neto, I. E. M., de Souza Melo, S. R. C., & Amado, E. M. (2017). Hemolymph and gill carbonic anhydrase are more sensitive to aquatic contamination than mantle carbonic anhydrase in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 201, 19-25. doi: 10.1016/j.cbpc.2017.08.008
- Efferth, T., & Volm, M. (2017). Multiple resistance to carcinogens and xenobiotics: P-glycoproteins as universal detoxifiers. *Archives of Toxicology*, 91(7), 2515-2538. doi: 10.1007/s00204-017-1938-5
- Epel, D. (1998). Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(1), 23-28. doi: 10.1016/S1095-6433(98)10005-3
- Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C. N., MacManus-Spencer, L. A., Hamdoun, A., & Smital, A. T. (2008). Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants: cellular “bouncers” help keep toxicants out of cells, but anthropogenic chemicals can circumvent or overwhelm this defense. *Environmental science & technology*, 42(11), 3914. doi: 10.1021/es087187v
- Eschmeyer W. N., (2014). Catalog of fishes: genera, species, references. Available at <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmais.asp>. (último acesso em 11 de Novembro de 2017).

- Eufemia, N. A., & Epel, D. (1998). The multixenobiotic defense mechanism in mussels is induced by substrates and non-substrates: implications for a general stress response. *Marine environmental research*, 46(1-5), 401-405. doi: 10.1016/S0141-1136(97)00051-2
- Falcão, M. G., Pichler, H. A., Felix, F. C., Spach, H. L., Barril, M. E., Araujo, K. C. B. D., & Godefroid, R. S. (2017). A inctiofauna como indicador de qualidade ambiental em planícies de maré do complexo estuarino de Paranaguá, Brasil. *Cadernos da Escola de Saúde*, 1(1).
- Figueiredo, J. L.; Menezes, N. A. (2000). Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. VI. Teleostei (5). São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.
- Franzellitti, S., Striano, T., Valbonesi, P., & Fabbri, E. (2016). Insights into the regulation of the MXR response in haemocytes of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Fish & shellfish immunology*, 58, 349-358. doi: 10.1016/j.fsi.2016.09.048
- Hammer, Ø., D.A.T. Harper & P.D. Ryan, (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. Disponível em: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm (último acesso em 18 de novembro de 2017).
- Honorato, T. B. M., Boni, R., da Silva, P. M., & Marques-Santos, L. F. (2017). Effects of salinity on the immune system cells of the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 486, 22-31. doi: 10.1016/j.jembe.2016.09.012
- Horak, C. N., & Assef, Y. A. (2017). Influence of Water Temperature on the MXR Activity and P-glycoprotein Expression in the Freshwater Snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Zoological Studies*, 56(27). doi: 10.6620/ZS.2017.56-27
- Jackson, J. S., & Kennedy, C. J. (2017). Regulation of hepatic abcb4 and cyp3a65 gene expression and multidrug/multixenobiotic resistance (MDR/MXR) functional activity in the model teleost, *Danio rerio* (zebrafish). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.*, 200, 34-41. doi: 10.1016/j.cbpc.2017.06.004
- Kleinow, K. M., Nichols, J. W., Hayton, W. L., McKim, J. M., & Barron, M. G. (2008). Toxicokinetics in fishes. *The toxicology of fishes*, 55-152.

- Kurelec, B. (1992). The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical reviews in toxicology*, 22(1), 23-43. doi: 10.3109/10408449209145320
- Kurelec, B. (1995). Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. *Science of the total environment*, 171(1-3), 197-204. doi: 10.1016/0048-9697(95)04689-4
- Kurelec, B., Smital, T., Pivèevia, B., Eufemia, N., & Epel, D. (2000). Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers. *Ecotoxicology*, 9(5), 307-327. doi: 10.1023/A:1026560922731
- Lončar, J., Popović, M., Zaja, R., & Smital, T. (2010). Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(2), 209-215. doi: 10.1016/j.cbpc.2009.10.009
- Luckenbach, T., Fischer, S., & Sturm, A. (2014). Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 165, 28-52. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.05.002
- Macêdo, A. K. S., Da Silva, J. R. P., De Oliveira, S. P., Jr, V. H., & Vendel, A. L. (2017). Potentially dangerous fish of the Paraíba Estuary: Identification and envenomation mechanisms. *Journal of Coastal Life Medicine*, 5(11), 459-462. doi: 10.12980/jclm.5.2017J7-139
- Marcelino, R. L. (2000). Diagnóstico sócio-ambiental do estuário do Rio Paraíba do Norte-PB, com ênfase nos conflitos de uso e interferências humanas em sua área de influência direta. Tese de mestrado. Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, BR. http://www.ccen.ufpb.br/ppgg/contents/documentos/dissertacoes/adriano_rodrigues.pdf (último acesso em 22 de novembro de 2017).
- Marcelino, R. L., Sassi, R., Cordeiro, T. A., & Costa, C. F. (2005). Uma abordagem sócio-econômica e sócio-ambiental dos pescadores artesanais e outros usuários ribeirinhos do estuário do rio Paraíba do Norte, Estado da Paraíba, Brasil. *Tropical Oceanography- ISSN: 1679-3013*, 33(2). doi: 10.5914/tropocean.v33i2.5061
- Minier, C., Eufemia, N., & Epel, D. (1999). The multi-xenobiotic resistance phenotype as a tool to biomonitor the environment. *Biomarkers*, 4(6), 442-454. doi: 10.1080/135475099230606

- Noletto, R. B. (2009). Cariótipo e mapeamento cromossômico de sequências repetitivas em peixes marinhos com ênfase em Tetraodontiformes do litoral paranaense. Tese de doutorado em Ciências Biológicas–Setor de Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, BR. <http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/18216> (último acesso em 02 de Dezembro de 2017)
- Pain, S., & Parant, M. (2007). Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. *Chemosphere*, 67(6), 1258-1263. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.11.017
- Pain, S., Devin, S., & Parant, M. (2007). Biomarker versus environmental factors: seasonal variations and modelling multixenobiotic defence (MXD) transport activity in transplanted zebra mussels. *Science of the total environment*, 373(1), 103-112. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.10.054
- Possatto, F. E., (2006). Dinâmica de crescimento e peso de *Sphoeroides testudineus* (Actinopterygii, Tetraodontidae) na Gamboa do perequê PR-Brasil. Monografia de Bacharelado, curso de Oceanografia da Universidade Federal do Paraná, Paraná, BR.
- Rocha, M. L. F. D., & Dias, J. F. (2015). Inventory of Chondrichthyes and Actinopterygii species collected in the central coast of São Paulo State, Brazil. *Biota Neotropica*, 15(2). doi: 10.1590/1676-06032015013614
- Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E. P., George, S., James, M., Kullman, S. W., ... & Willett, K. (2008). Biotransformation in fishes. *The toxicology of fishes*, 153-234. doi: 10.1201/9780203647295.ch4
- Smital, T., & Kurelec, B. (1998). The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine B-efflux method as a biomarker of exposure. *Marine environmental research*, 46(1-5), 443-447. doi: 10.1016/S0141-1136(97)00087-1
- Smital, T., & Sauerborn, R. (2002). Measurement of the activity of multixenobiotic resistance mechanism in the common carp *Cyprinus carpio*. *Marine environmental research*, 54(3), 449-453. doi: 10.1016/S0141-1136(02)00155-1
- Smital, T., Sauerborn, R., Pivčević, B., Krča, S., & Kurelec, B. (2000). Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*:

Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 126(2), 175-186. doi: 10.1016/S0742-8413(00)00110-9

Valton, E., Wawrzyniak, I., Amblard, C., Combourieu, B., Bayle, M. L., Desmolles, F., ... & Bamdad, M. (2017). P-gp expression levels in the erythrocytes of brown trout: a new tool for aquatic sentinel biomarker development. *Biomarkers*, 22, 566-574. doi: 10.1080/1354750X.2017.1338314

Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., & Peakall, D. B. (2012). *Principles of ecotoxicology*. CRC press.

Yawetz, A., Fishelson, L., Bresler, V., & Manelis, R. (2010). Comparison of the effects of pollution on the marine bivalve *Donax trunculus* in the vicinity of polluted sites with specimens from a clean reference site (Mediterranean Sea). *Marine pollution bulletin*, 60(2), 225-229. doi: 10.1016/j.marpolbul.2009.09.022