

AValiação GENOTOXICOLÓGICA EM PEIXES NATIVOS DO RIO PARDINHO, RS, BRASIL

Fernanda Fleig Zenkner¹,
Ana Paula Thumé Soares²,
Daniel Prá^{3,5},
Andreas Köhler^{4,5},
Alexandre Rieger^{3,5}

RESUMO

O Rio Pardinho é o principal recurso hídrico que abastece o município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil e apesar da sua importância diversos estudos constataram a poluição de suas águas. As principais fontes poluidoras são oriundas da indústria, agricultura e de efluentes domésticos. Diante da demanda crescente de conciliar as necessidades de desenvolvimento com a conservação do meio ambiente, tornou-se importante ampliar o uso de técnicas baseadas em respostas biológicas como uma ferramenta para avaliar a qualidade ambiental. A fim de avaliar o impacto subletal da carga poluidora do rio sobre a biota local, utilizou-se o Teste de Micronúcleo (MN) em células sanguíneas de peixes nativos do Rio Pardinho. Os peixes foram coletados em dois pontos do rio. No ponto 1, localizado em uma área rural, foram coletados espécimes de *Astyanax fasciatus* e *Crenicichla punctata*, e no ponto 2, localizado em área urbana, foram coletados apenas espécimes de *A. fasciatus*. Para o teste de micronúcleo foi utilizada a coloração com Giemsa (5%) sendo que a Frequência de Micronúcleos (FMN) foi calculada a partir de 1.000 células por animal. A FMN foi significativamente maior no ponto 2 ($P < 0,05$), possivelmente porque no ponto 2 a água é mais poluída. Isso ficou evidente pelo melhor Índice de Qualidade da Água (IQA) do ponto 1 em relação ao ponto 2, respectivamente bom e regular; e pela classificação do CONAMA (classe 2 = que pode ser destinada ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional; versus classes 3 ou 4 = que pode ser destinada apenas à navegação e à harmonia paisagística). Outros estudos deverão ser realizados no Rio Pardinho, aplicando biomarcadores variados a fim de obter mais informações sobre o impacto das condições do ambiente na biota local, que servirão para o desenvolvimento de estratégias de controle e medidas de prevenção da poluição.

1- Graduada em Ciências Biológicas e Bolsista do Laboratório de Biotecnologia e Genética. fzenkner@gmail.com

2- Bióloga graduada na Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC;

3- Laboratório de Biotecnologia e Genética;

4- Laboratório de Zoologia;

5- Departamento de Biologia e Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC.

Palavras-chave: Teste de Micronúcleos. Genotoxicidade. *Astyanax fasciatus*. *Crenicichla punctata*. Rio Pardinho.

GENOTOXICITY AVALIATION IN NATIVE FISHES IN PARDINHO RIVER, SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT

The Pardinho River is the main water supply resource of Santa Cruz do Sul municipality, RS, southern Brazil and several studies have shown that it is polluted. The pollution sources include industry, agriculture and domestic effluents. Facing the growing demand of reconciling development and environment conservation, it became important to extend techniques based in biological responses as a tool to evaluating environmental quality. To evaluate the impact of sublethal pollution burden over the local biota, the micronucleus test (MN) in blood cells of native fish of Rio Pardinho was applied. Fishes were collected in two sampling areas in the river. In sample area 1, a rural area, *Astyanax fasciatus* and *Crenicichla punctata* specimens were collected, and in sample area 2, located in urban area, only specimens of *A. fasciatus* were collected. The Micronucleus test (MN) with Giemsa stain (5%) was evaluated and the MN frequency (FMN) was calculated from 1000 cells per animal. The FMN was significantly higher in sample area 2 ($P < 0.05$), possibly because the waters in this sample area were more polluted. In agreement, the Water Quality Index (IQA) of sample area 1 was better than that of sample area 2, respectively good and regular, that was confirmed by the classification of the waters based in that of the Brazilian National Environmental Council - CONAMA classification scheme (respectively, class 2 = that can be used for human usage after conventional treatment versus class 3 or 4 = that usage only for navigation and paisagism). Other studies in the river are granted, using a variety of biomarkers to obtain more information to perform environmental impact evaluation in local biota, which shall serve for developing control strategies and measures to prevent pollution.

Keywords: Micronucleus Test. Genotoxicity. *Astyanax fasciatus*. *Crenicichla punctata*. Pardinho River.

INTRODUÇÃO

O Rio Pardinho constitui o principal recurso hídrico que abastece o município de Santa Cruz do Sul, além de drenar parte dos municípios de Boqueirão do Leão, Gramado

Xavier, Herveiras, Sinimbu, Venâncio Aires e Vera Cruz. Diferentes estudos que avaliaram aspectos físicos, químicos e biológicos da água apontaram altos níveis de poluição em diversos pontos do rio (Wetzel et al., 2008; Machado, 2004; Goettems, 2003; Wetzel et al., 2002; Rathke, 2001; Lobo e Costa, 1997).

Em relação à qualidade das águas da Bacia Hidrográfica, dados do Comitê Pardo (2008) mostram que a influência antrópica é determinante neste sentido. No meio urbano, os principais agentes poluentes são provenientes do lançamento de esgotos domésticos não depurados, efluentes industriais e resíduos sólidos, além da própria drenagem pluvial urbana, que ocorrem de forma concentrada. Já o meio rural tem como principais contaminantes os fertilizantes e agrotóxicos utilizados nas lavouras de arroz, soja, fumo e milho que são estabelecidas as suas margens e de seus afluentes.

Os efluentes oriundos da cidade são lançados em arroios que chegam ao rio. Assim, os esgotos do município de Santa Cruz do Sul constituem a principal carga poluidora da Sub-Bacia do Rio Pardinho (ECOPLAN, 2004). Aliado a isso, no mesmo município concentra-se grande parte da população urbana do Vale do Rio Pardo (Conselho Regional de Desenvolvimento do Vale do Rio Pardo, 1998), o que acaba por incrementar ainda mais a carga poluidora local.

De acordo com o Índice de Qualidade das Águas (IQA), diferentes pontos do Rio Pardinho apresentaram, durante o ano de 2008, qualidade boa à regular (Wetzel et al., 2008). Já em relação à resolução nº 357/2005 do CONAMA, no mesmo ano, pontos do rio variaram entre as classes 2, 3 e 4, sendo que alguns pontos, independentemente da época do ano, permaneceram sempre na classe 4, ou seja, águas destinadas apenas à navegação e à harmonia paisagística.

O impacto causado por esses efluentes na biota deve ser avaliado diretamente, visto que os sistemas biológicos são alvos da ação dos tóxicos e apresentam resposta integrada ao seu ambiente. Além disso, fornecem informações importantes que não são detectadas nas análises físico-químicas das amostras ambientais (Frenzilli et al., 2009). Apesar dos dados ecotoxicológicos que confirmaram a poluição do Rio Pardinho (Wetzel et al., 2008) testes genotoxicológicos não foram realizados até o momento.

Considerando que muitos compostos ou substâncias descartadas em corpos d'água podem ter potencial mutagênico e/ou clastogênico, o campo da genotoxicologia tem sido amplamente explorado nos últimos anos. O Teste de Micronúcleo é um dos métodos preferenciais para avaliar o dano genético nos organismos, pois permite detectar danos provenientes tanto de agentes clastogênicos, responsáveis por quebras cromossômicas, como de agentes aneugênicos que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (Ansari et al., 2011).

O Teste de Micronúcleo é frequentemente aplicado em células sanguíneas de peixes. Devido à sua importância na cadeia alimentar, a utilização desses animais no monitoramento da poluição de ambientes aquáticos é de extrema relevância (Bolognesi e Hayashi, 2011). Peixes são organismos bioconcentradores e muitos contaminantes, mesmo em baixas concentrações, podem afetar sua fisiologia e capacidade de sobrevivência (Grisolia et al., 2009). Além disso, parecem responder à xenobióticos da

mesma maneira que vertebrados superiores, sendo rotineiramente utilizados como organismos sentinela em estudos de monitoramento de água doce (Polard et al., 2011).

Grande representatividade numérica tem sido comum em estudos envolvendo espécies de lambaris do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 no Rio Pardinho (Ribeiro e Köhler, 2007). Tal característica se dá pelo fato das espécies apresentarem ciclos de vida dinâmicos com elevado potencial reprodutivo e oportunismo trófico, fato interessante para o uso do gênero como modelo biológico para diferentes estudos. Além disso, o gênero apresenta comportamento reofílico, ou seja, realiza apenas curtas migrações reprodutivas durante os períodos de maior precipitação, não variando muito sua ocorrência nas diferentes faixas dos corpos hídricos (Ramsdorf, 2007).

Da mesma forma, o gênero *Crenicichla* Heckel, 1840, que inclui as joaninhas, apresenta espécies extremamente territoriais, encontradas permanecendo sempre no mesmo local. Esses peixes são considerados bons bioindicadores para avaliação local de genotoxicidade e monitoramento ambiental devido a seus hábitos piscívoro e sedentário (Egito et al., 2010).

Assim, através do Teste de Micronúcleo, foram analisados os danos encontrados no DNA de células sanguíneas de peixes dos gêneros *Astyanax* e *Crenicichla* coletados no Rio Pardinho, em pontos com diferentes graus de influência antrópica.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

A Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Pardinho é um componente da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo e está localizada na região central do estado do Rio Grande do Sul, entre as coordenadas geográficas 52°21'30" a 52°40'30" de longitude oeste e 29°14'30" a 29°52'30" de latitude sul, possuindo uma área superficial de drenagem de 1.085,15 km² (Ribeiro et al., 2007).

Dois pontos de coleta (Figura 01) foram selecionados de acordo com a classificação do IQA e da resolução 357/2005 do CONAMA. O ponto 1 localiza-se na Linha Primavera, no município de Sinimbu e caracteriza-se por receber carga menor de efluentes, pois o seu entorno é constituído principalmente de propriedades rurais e pequenos agregados urbanos. Portanto, apresentando ao longo de 2008 qualidade boa, segundo o IQA, e variou entre as classes 2, 3 e 4 do CONAMA. Já o ponto 2 localiza-se na divisa entre os municípios de Vera Cruz (Linha Capão) e Santa Cruz do Sul (Dona Carlota), e é caracterizado por ter carga poluidora proveniente das descargas de rejeitos domésticos e industriais dos dois municípios. Em concordância, ao longo de 2008, o ponto 2 apresentou qualidade regular e permaneceu sempre na classe 4, indicando águas impróprias para o consumo (Wetzel et al., 2008; Brasil, 2005).

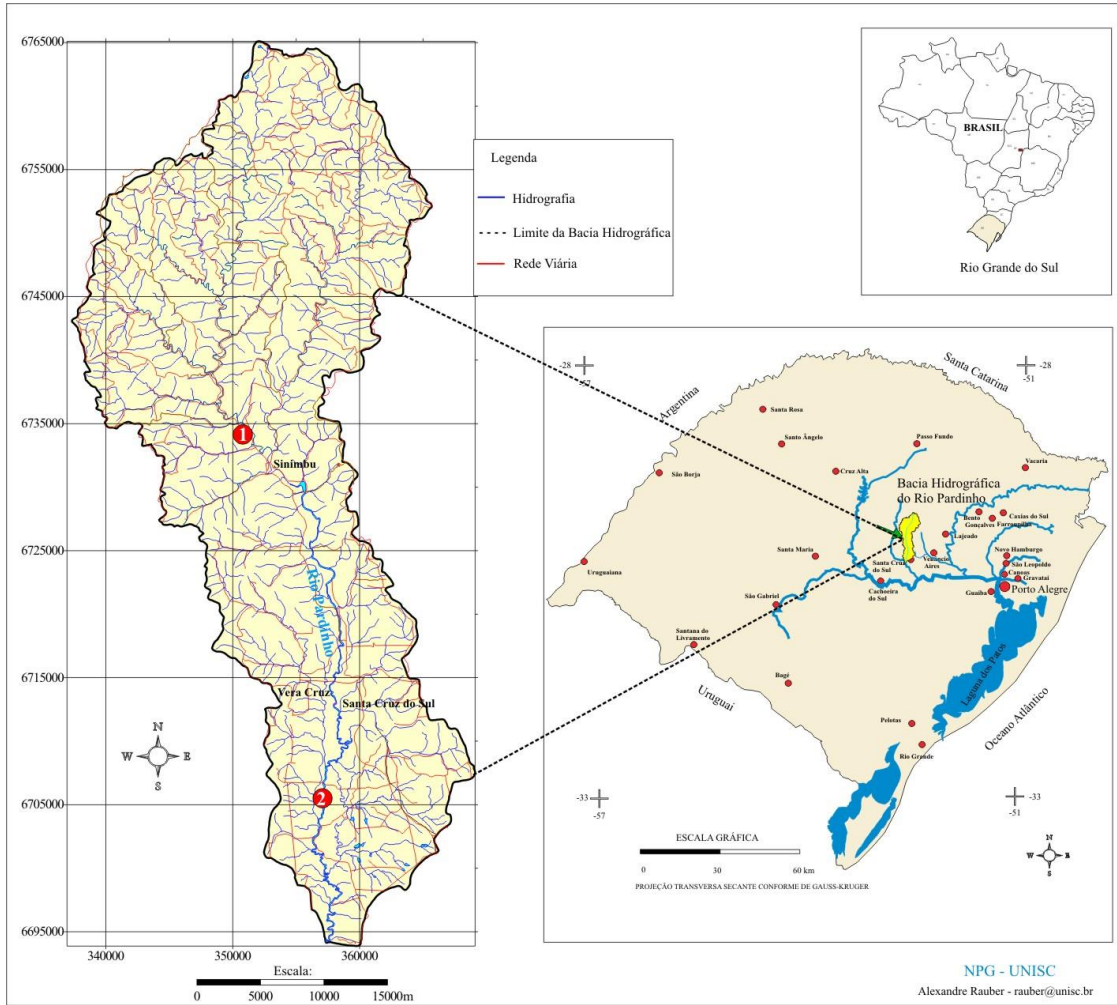


Figura 01: Mapa da Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Pardo, RS, Brasil, com a identificação dos dois pontos de coleta.

Fonte: Núcleo de Planejamento e Gestão da UNISC.

Coletas

Foram realizadas duas coletas no primeiro ponto, no mês de março de 2009, e uma coleta no segundo ponto, no mês de abril de 2009, totalizando 10 indivíduos por ponto. Apesar de realizadas em meses diferentes, todas as coletas aconteceram em período de seca, com poucos registros de chuva, e clima semelhante.

Os peixes foram coletados através de linhas de pesca com anzóis, e imediatamente colocados em baldes com água do próprio rio. Para a retirada das amostras de sangue foi realizada uma incisão cranial para a morte rápida e indolor dos peixes e logo em seguida fez-se um corte longitudinal no tórax para a exposição do coração, de onde o sangue foi retirado com seringa heparinizada.

As lâminas para o Teste de Micronúcleo foram confeccionadas no próprio local de coleta e os procedimentos seguintes foram realizados no Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Os peixes fixados em formalina 4% para posterior identificação e tombamento no Laboratório de Zoologia da UNISC, segundo os critérios estabelecidos por Ribeiro et. al (2007).

Teste de micronúcleo (MN)

Para cada indivíduo, duas lâminas foram confeccionadas através do método padrão de esfregaço de sangue. As mesmas foram deixadas secar à temperatura ambiente por 24 horas e após, fixadas em metanol e coradas com solução de Giemsa 5% (Rivero, 2007).

As lâminas foram observadas em microscopia óptica convencional e a Frequência de Micronúcleos (FMN) foi obtida realizando-se a contagem de 1.000 células por amostra em aumento de 1.000 x. Os micronúcleos foram identificados de acordo com os critérios propostos por Fenech (2000) e Al-Sabti e Metcalfe (1995).

Análise estatística

Os resultados da análise estatística foram obtidos através do teste não-paramétrico Teste-U de Mann-Whitney para a FMN, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o software BioEstat, versão 5.0.

RESULTADOS

Foram coletados e analisados 10 exemplares de peixes em cada ponto, sendo que no ponto 1, 5 espécimes foram identificados como *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819, popularmente conhecido como Lambari, e os outros 5 identificados como *Crenicichla punctata* Hensel, 1870, conhecida como Joaninha. Já no ponto 2, os 10 espécimes coletados pertencem a *A. fasciatus*.

A FMN dos exemplares coletados foi comparada entre os pontos de coleta 1 e 2 do Rio Pardinho (Tabela 1; Figura 2).

Tabela 1: Comparação da frequência de micronúcleos (por 1000 células) em eritrócitos de peixes coletados no ponto 1 com os peixes coletados no ponto 2 do Rio Pardinho, RS, Brasil.

Espécie	Ponto 1		Ponto 2		P*
	MN (‰)	Variação	MN (‰)	Variação	
<i>Astyanax fasciatus</i>	4,6 ± 0,55	4—5	6,3 ± 0,95	5—8	0.003
<i>Crenicichla punctata</i>	4,2 ± 1,30	3—6			0.015
Ambas as espécies	4,4 ± 0,97	3—6			0.001

MN: Micronúcleo

* Valor de P obtido pela comparação do ponto 1 e 2 usando teste U de Mann-Withney

Independentemente das espécies comparadas, os exemplares do ponto 1 sempre apresentaram uma FMN significativamente inferior aos coletados no ponto 2. Cabe ressaltar que quando foram comparadas as FMN entre as espécies do ponto 1, não houve diferença significativa entre elas ($P = 0,58$).

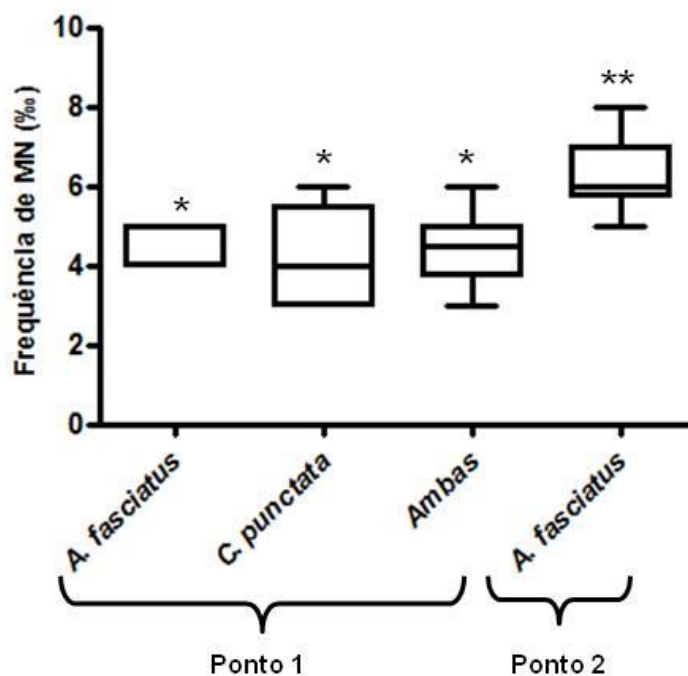


Figura 2: Comparação da frequência de micronúcleos (por 1000 células) em eritrócitos dos espécimes do ponto 1, e entre os do ponto 1 com os do ponto 2, coletados no Rio Pardinho, RS, Brasil.

* $P > 0,05$; ** $P < 0,05$, ambos em relação ao ponto 2.

DISCUSSÃO

O presente estudo consistiu em uma comparação entre dois pontos de coleta no Rio Pardinho, sem a utilização de um controle negativo e um positivo para a genotoxicidade relacionada com a presença de micronúcleos. A FMN significativamente aumentada no ponto 2 permite inferir apenas que as condições do ponto 1 apresentam menor efeito de genotoxicidade sobre os peixes em relação as condições do ponto 2.

Esse resultado era esperado, pois no ponto 1, embora o IQA tenha sido classificado como bom, apresentou variação entre as classes 2, 3 e 4 de qualidade da água em diferentes épocas do ano, enquanto que o ponto 2 sempre foi classificado na classe 4 de qualidade da água, indicando claramente a contaminação deste ambiente (Wetzel et al., 2008; Brasil, 2005).

Além disso, quando as FMN obtidas nos pontos 1 e 2 são comparadas com outros estudos, elas se assemelham aos controles positivos de testes realizados em peixes para a avaliação do potencial genotóxico de substâncias como o inseticida organofosforado Clorpirifós (Ali et al., 2008), o óleo diesel (Vanzella et al., 2007), o cloreto de mercúrio e o acetato de chumbo (Cavas, 2008).

Como no ponto 1 foram coletadas 2 espécies de peixes com comportamentos distintos, sendo *A. fasciatus* um peixe de correnteza e de águas mais superficiais e *C. punctata* um peixe com hábitos de fundo, comparou-se a FMN entre as espécies deste ponto.

Apesar de *C. punctata* e *A. fasciatus* ocuparem nichos diferentes no ambiente aquático, o seu hábito alimentar é semelhante consistindo essencialmente de insetos, larvas, material vegetal e ambos apresentam curto deslocamento durante sua vida (Gomiero e Braga, 2008; Egito et al., 2010). Assim, participam do mesmo nível trófico na cadeia alimentar, estando sujeitos ao mesmo tipo de bioacumulação de substâncias tóxicas (Grisolia et al., 2009). Também, quando foram somadas as FMN de ambas as espécies do ponto 1 e comparadas com a FMN de *A. fasciatus* obtida no ponto 2 a diferença significativa se manteve. Assim, é provável que as espécies do ponto 1 metabolizem os agentes genotóxicos de modo similar, podendo, por isso, apresentarem genotoxicidade semelhante.

Vale ressaltar, todavia, que a interpretação dos resultados de campo é sempre muito complexa, pois um grande número de fatores pode influenciar as variáveis analisadas de maneira não controlada (Pantalea et al., 2006).

CONCLUSÃO

A partir deste estudo, o primeiro avaliando o potencial genotóxico das águas do Rio Pardinho, outros poderão ser realizados, inclusive avaliando múltiplos biomarcadores, o que fornecerá uma melhor caracterização do local e do efeito causado

aos organismos. A exposição a misturas complexas de poluentes, especialmente quando elas ocorrem em baixas concentrações, nem sempre resultam em efeitos letais sobre os seres vivos. Efeitos mais sutis, subletais, podem ocorrer a nível bioquímico, molecular e/ou fisiológico, podendo influenciar na sobrevivência à longo prazo das populações.

A avaliação dos efeitos subletais, como a genotoxicidade, em sistemas biológicos alvos de ação tóxica, juntamente com a análise de amostras ambientais, pode fornecer mais informações sobre a saúde do ecossistema. Essas ferramentas integradas podem ser úteis para o diagnóstico de condições do ambiente bem como para o desenvolvimento de estratégias de controle e medidas de prevenção da poluição (González-Mille et al., 2010).

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao IBAMA pela concessão da autorização para a coleta de material ictiológico, nº 14221-1.

REFERÊNCIAS

ALI, D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Chemosphere*, 71, p. 1823-1831, 2008.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D.; Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343, p. 121-135, 1995.

ANSARI, R. A.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S.; RAISUDDIN, S. *In vivo* cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, p. 50-156, 2011.

BRASIL. *Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA*. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26, p. 205-213, 2011.

CAVAS, T. *In vivo* genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46, p. 352-358, 2008.

COMITE PARDO. *Comitê de Gerenciamento da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo*. Santa Cruz do Sul, 2008. Disponível em:

<<http://www.comitepardo.com.br/>>. Acesso em: 03 dez. 2008

CONSELHO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO VALE DO RIO PARDO. *Plano Estratégico de desenvolvimento do Vale do Rio Pardo*. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 1998. 140p.

ECOPLAN, Engenharia Ltda. *Consolidação do Conhecimento sobre os Recursos Hídricos da Bacia do Rio Pardo e Elaboração do Programa de Ações da Sub-Bacia do Rio Pardinho*. Sub-programa 3. 2004. Disponível em:

<<http://www.comitepardo.com.br/>>. Acesso em: 03 dez. 2008.

EGITO, L. C. M.; SANTOS, P. E.; AMARAL, V. S.; MEDEIROS, S. R. B.; AGNEZ-LIMA, L. F. Use of native species *Crenicichla menezzi* (Ariidae) as a model for *in situ* evaluation of genotoxicity in surface water. *Science of the Total Environment*, 408, p. 6042-6046, 2010.

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

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, 681, p. 80-92, 2009.

GOETTEMS, Carlos Henrique. *Estudo de eficiência das estações de tratamento de efluentes de frigoríficos localizados na bacia hidrográfica do Rio Pardo, RS, Brasil e da qualidade da água dos corpos receptores*. 2003. 135 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional – Mestrado e Doutorado) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2003.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. Feeding habits of the ichthyofauna in a protected area in the state of São Paulo, southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, 8, p. 41-47, 2008.

GONZÁLEZ-MILLE, D. J.; ILIZALITURRI-HERNÁNDEZ, C. A.; ESPINOSA-REYES, G.; COSTILLA-SALAZAR, R.; DÍAZ-BARRIGA, F.; IZE-LEMA, I.; MEJÍA-SAAVEDRA, J. Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Ecotoxicology*, 19, p. 1238-1248, 2010.

GRISOLIA, C. K.; RIVERO, C. L. G.; STARLING, F. L. R. M.; SILVA, I. C. R.; BARBOSA, A. C.; DOREA, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage

in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*, 32, p. 138-143, 2009.

LOBO, E. A., COSTA, A. B. da. Estudo da qualidade da água do Rio Pardinho, Município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Tecno-Lógica*, Santa Cruz do Sul, 1, p. 11-36, 1997.

MACHADO, E. O. *Desenvolvimento regional: avaliação da eficiência de detoxificação de efluentes químicos no município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil utilizando bioensaios*. 2004. 100 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional - Mestrado e Doutorado) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2004.

PANTALEA, S. M.; ALCÂNTARA, A. V.; ALVES, J. P. H.; SPANÓ, M. A. The Piscine Micronucleus Test to Assess the Impact of Pollution on the Japarutuba River in Brazil. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47, p. 219-224, 2006.

POLARD, T.; JEAN, S.; MERLINA, G.; LAPLANCHE, C.; PINELLI, E.; GAUTHIER, L. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, p. 144-149, 2011.

RAMSDORF, W. *Utilização de duas espécies de Astyanax (Astyanax sp B e A. altiparanae) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR)*. 2007. 127 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética – Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RATHKE, F. S. *Avaliação da qualidade da água em propriedades de produtores de tabaco nos municípios de Gramado Xavier, Sinimbu e Santa Cruz do Sul, RS, Brasil, utilizando bioensaios*. 2001. 256 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional - Mestrado e Doutorado) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2001.

RIBEIRO, M. F. et al. *Os peixes do Rio Pardinho*. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2007. 98 p.

RIBEIRO, M. F.; KÖLER, A. Ictiofauna do Rio Pardinho. *Caderno de Pesquisa: Série Biologia*, 19, p. 37-45, 2007.

RIVERO, C. L. G. *Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes do Lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil*. 2007. 113 f.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

VANZELLA, T. P., MARTINEZ, C.B.R., CÓLUS, I.M.S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research*, 631, p. 36-43, 2007.

WETZEL, A. P.; COSTA, A. B. da; LOBO, E. A. *Monitoramento da qualidade das águas da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo, RS, Brasil, utilizando variáveis físicas, químicas e microbiológicas*. 2008. Disponível em:
<http://www.comitepardo.com.br/temp/apresentacao_comite_pardo_18-11-2008.ppt>
Acesso em: 16 dez. 2010.

WETZEL, C. E. et al. Diatomáceas epilíticas relacionadas a fatores ambientais em diferentes trechos dos rios Pardo e Pardinho, bacia hidrográfica do rio Pardo, RS, Brasil: resultados preliminares. *Caderno de Pesquisa: Série Biologia*, Santa Cruz do Sul, 14, p.17-38, jul./dez.2002.