

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**Bruno Fiorelini Pereira**

**Análise dos efeitos da exposição a ambientes poluídos  
na morfologia e no envelhecimento precoce, de  
brânquias e fígado em peixes.**



Rio Claro-SP  
2014

**Bruno Fiorelini Pereira**

**Análise dos efeitos da exposição a ambientes poluídos na morfologia e no envelhecimento precoce, de brânquias e fígado em peixes.**

Trabalho de Tese apresentado (a) ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Rio Claro, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular

**Orientador: Flavio Henrique Caetano**

Rio Claro-SP  
2014

## **Agradecimentos:**

Inicialmente agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo incentivo e apoio financeiro para o desenvolvimento e conclusão deste projeto (Processo número 2009/17118-9).

Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pelo apoio e infra-estrutura, em especial ao Departamento de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Ao ICMBio/CEPTA, pela doação dos espécimes e apoio prestado a mim e a todos os membros do laboratório. Agradeço especialmente a José Augusto Senhorini e Rita de Cássia Gimenez de Alcântara Rocha pela atenção e dedicação.

Ao Laboratório de Análise de Águas do Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas – UNESP – Campus de Rio Claro pelo auxílio nas análises químicas de água executadas neste trabalho.

Ao Laboratório ACUIGEN da Universidade de Santiago de Compostela – Campus de Lugo – ES e a toda a sua equipe, principalmente ao Professor Paulino Matínez Portela, pela oportunidade oferecida.

Ao meu Orientador e acima de tudo amigo Flavio Henrique Caetano, pelo apoio e dedicação incondicionais durante não só este período, mas também durante minha graduação. Não tenho como agradecer todos os momentos e esforços para que minha formação fosse a melhor possível, todos os conselhos tanto profissionais como pessoais, que me confortaram e me direcionaram sempre para um caminho melhor. Serei sempre grato as oportunidades didáticas que me ofereceu, pois estas não só me concederam experiência, mas também amor à docência. Tenha certeza de que meu carinho, amizade e admiração serão eternos, e que lhe sou grato pela pessoa que sou hoje.

À Rebeca Mamede da Silva Alves por ser minha parceira de trabalho durante seis anos, dividindo minhas conquistas e frustrações. Agradeço todo o carinho, atenção e amizade, sem sombra de dúvidas você se tornou minha melhor amiga e levarei nossos momentos juntos para toda a vida.

Aos servidores técnicos e administrativos que me acompanharam e apoiaram durante esta jornada Anderson Rodrigues, Antonio Teruyoshi Yabuki, Rosemary Donizete Oliveira Santos Cardoso, Gerson Mello Souza, Mara Silvia Duarte Moreira, Mônica Iamonte e Pablo Henrique Nunes.

Ao meu amigo e colaborador Dimítrios Leonardo Pitol, pelo apoio técnico e intelectual. Obrigado por nunca negar ajuda, espero que saiba que nunca negarei ajuda também.

Aos professores Anderson Luis Alves e Karen Cristiane Martinez de Moraes, pela ajuda na elaboração e desenvolvimento deste projeto.

À Beatriz Marques Vilela Simões e Alexandre Castellar, por terem se tornado um ramo de minha família e assim permanecerão para sempre.

Às Professoras Ana Maria Costa Leonardo e Doralice Maria Cella (em memória), as quais sempre demonstraram grande respeito e carinho por mim e por quem também guardo grande respeito e carinho também.

Às minhas queridas amigas Lara Teixeira Laranjo e Ana Cristina Prado Veiga Menoncello, por todo o apoio e amizade durante estes anos.

Ao meu sensei e grande amigo Leonardo Cassab Antunes de Oliveira, à Roberta Quartaroli Faria e a todos da Academia Leonardo Cassab de Judô, por todo suporte, ensinamentos e momentos felizes que me proporcionaram.

À minha família, em especial aos meus pais Edson Aparecido Pereira e Marly Aparecida Fiorelini Pereira, por sempre terem me apoiado em tudo sem questionamentos, por todo amor e dedicação que me ajudaram a chegar neste momento tão importante. À minha querida irmã Amanda Fiorelini Pereira, por ser sempre amiga e um porto seguro que eu sempre poderei contar.

## Resumo

Uns dos compostos mais despejados nas águas de rios, em geral, são os detergentes biodegradáveis, os quais ainda geram desconfiança, na população, quanto ao fato de serem ou não poluentes. Na verdade são, em geral, substâncias químicas liberadas em ambientes aquáticos e que podem gerar alterações em organismos que vivem nestas áreas. Tendo em vista a crescente preocupação da população em geral sobre os efeitos de poluentes liberados na natureza e de sua ação sobre a fauna, este trabalho pretendeu verificar os efeitos dos poluentes na água do Lago Azul (2° 24' 39"S, 47° 33' 39"L) e dos efeitos da água com uma diluição de detergentes biodegradáveis, comparados com um grupo controle, tratado com água pura, retirada do poço artesiano da UNESP – Campus de Rio Claro, a qual é clorada segundo os padrões exigidos pela SABESP, em espécies de peixes de grande porte: *Prochilodus lineatus* (Curimatá) e de pequeno porte: *Astyanax altiparanae* (Lambari). Para isso foram utilizadas técnicas de histologia, histoquímica, fluorescência e ultra-estrutura, para avaliar os danos na morfologia do fígado e brânquias e no acúmulo de lipofuscina (pigmento do envelhecimento), após 1 e 5 meses de exposição. As análises de histologia e histoquímica demonstraram, no caso do fígado, para ambas as espécies, redução da área ocupada pelo glicogênio, elevação no número de macrófagos recrutados, diminuição de lisossomos presentes nos hepatócitos, além de alterações na morfologia dos hepatócitos. Com relação às brânquias, foram encontradas diversas modificações morfológicas, como fusões lamelares, hipertrofia e hiperplasia epiteliais, aneurismas, sendo que estas alterações variaram quanto a sua frequência nos tratamentos e nas espécies testadas. Além disso, nesse mesmo órgão pudemos identificar a proliferação de células de muco e células ricas em mitocôndrias. Nossas análises ultra-estruturais evidenciaram, que as brânquias são gravemente afetadas a nível celular, com degradação citoplasmática, fusões e danos mitocondriais e, em alguns casos, células em processo apoptótico. O estudo quantitativo de lipofuscina baseado em microscopia de fluorescência nos permitiu constatar que a presença de poluentes gera o acúmulo de tal pigmento, em ambos os órgãos testados, bem como forçam a regeneração celular, tendo em vista que seu acúmulo leva ao processo chamado de apoptose. Estes resultados comprovam que mesmo em baixas concentrações de poluentes, como testado neste trabalho, os danos a fauna aquática podem ser relevantes e novas metodologias para tal avaliação devem ser aplicadas para ampliar nosso conhecimento na área de ecotoxicologia em peixes.

Palavras-chave: *Astyanax altiparanae*; *Prochilodus lineatus*; lipofuscina; brânquia; fígado.

## Abstract

Biodegradable detergents are some of the compounds most dumped into rivers and still raise distrust among the general population concerning its potential to be pollutants. In fact these pollutants are generally chemical substances released onto aquatic environments that can cause alterations in animals who live in these areas. Keeping in mind the growing concern of general population about the effects of pollutants released in nature and their action on fauna, the present study wished to verify effects of water pollutants in lake waters and a biodegradable detergent dilution compared to control groups, exposed to pure water from an artesian well at UNESP- *campus* de Rio Claro, which is chlorinated according to standards required by SABESP, on large-sized: *Prochilodus lineatus* (Curimbatá) and small-sized species: *Astyanax altiparanae* (Lambari). For such purposes histological, histochemical, fluorescence and ultrastructural techniques were used to assess damage in liver and gill morphology and lipofuscin (aging pigment) accumulation after 1 and 5 months of exposure. Histological and histochemical analyses revealed reduced glycogen area, increased number of recruited macrophages, lysosome reduction and general morphological alterations in liver of both species. Gills showed several morphological modifications such as lamellar fusion, epithelial hypertrophy and hyperplasia and aneurisms, with varying frequencies amongst treatments and species tested. Furthermore, the same organ also exhibited mucous cell proliferation and mitochondria-rich cell proliferation. Our ultrastructural analyses revealed that gills are severely affected at cellular levels, presenting cytoplasmic degradation, mitochondrial fusions and damages and in some cases, apoptotic cells. Quantitative studies of lipofuscin presence based on fluorescence microscopy allowed us to verify that these pollutants not only promote lipofuscin accumulation in both organs tested, but they also force cellular regeneration, given that such accumulation leads to a process called apoptosis. These results prove that even in low pollutant concentrations as was tested in this study, damages to aquatic fauna can be very relevant and new methodologies to evaluate such effects must be applied to expand our knowledge of fish ecotoxicology.

Key words: *Astyanax altiparanae*; *Prochilodus lineatus*; lipofuscin; gill; liver.

## Sumário

<b>Introdução geral</b> .....	8
<b>Objetivos</b> .....	15
<b>Metodologia</b> .....	16

### CAPÍTULO 1 - Alterações hepáticas em *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus* expostos a detergentes biodegradáveis e poluentes urbanos

1.1 Resumo.....	21
1.2 Introdução.....	21
1.3 Metodologia.....	23
1.4 Resultados.....	26
1.5 Discussão.....	28
1.6 Conclusões.....	31
1.7 Bibliografia.....	32
1.8 Tabelas.....	36
1.9 Imagens.....	39

### CAPÍTULO 2 - Efeitos da exposição a detergente e outros poluentes aquáticos em brânquias de *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus*

2.1 Resumo.....	44
2.2 Introdução.....	44
2.3 Metodologia.....	46
2.4 Resultados.....	49
2.5 Discussão.....	51
2.6 Conclusões.....	55
2.7 Bibliografia.....	55
2.8 Tabelas.....	60
2.9 Imagens.....	63

### CAPÍTULO 3 - Acúmulo de lipofuscina em resposta à exposição a detergentes biodegradáveis e poluentes aquáticos nas brânquias e fígado de *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus*

3.1 Resumo.....	70
-----------------	----

3.2	Introdução.....	70
3.3	Metodologia.....	71
3.4	Resultados.....	74
3.5	Discussão.....	75
3.6	Conclusões.....	78
3.7	Bibliografia.....	78
3.8	Tabelas.....	83
3.9	Imagens.....	85
CAPÍTULO 4 - Análise ultraestrutural das brânquias de <i>Astyanax altiparanae</i> e <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a detergentes biodegradáveis e poluentes urbanos		
4.1	Resumo.....	90
4.2	Introdução.....	90
4.3	Metodologia.....	91
4.4	Resultados.....	93
4.5	Discussão.....	95
4.6	Conclusões.....	99
4.7	Bibliografia.....	99
4.8	Imagens.....	103
	<b>Considerações finais.....</b>	<b>106</b>
	<b>Referências gerais.....</b>	<b>107</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>111</b>



## **Introdução geral:**

### **Lipofuscina**

Segundo Arking (2008) de forma resumida a teoria do acúmulo de resíduos propõe que o envelhecimento celular é causado pelo depósito de produtos residuais intracelulares que não podem ser destruídos ou eliminados exceto por meio do processo de divisão celular. Já é de conhecimento geral que as células pós-mitóticas, tal como os neurônios e as células do músculo cardíaco, acumulam durante o processo de envelhecimento, grânulos citoplasmáticos de cor marrom amarelada, ricos em lipídios e de formato irregular. Esses grânulos de lipofuscina foram observados pela primeira vez em 1842, e a possibilidade de uma relação entre o envelhecimento e o acúmulo de lipofuscina foi discutida já em 1886. Numerosos estudos foram realizados desde então em um esforço para compreender os mecanismos responsáveis pela formação da lipofuscina e para esclarecer o papel dela no processo de envelhecimento.

Segundo Silva & Silva (2005) e Kishi et. al. (2008) a lipofuscina, é um produto da peroxidação lipídica e uma evidência de lesão oxidativa. É formada pelos produtos finais resultantes da glicosilação não-enzimática celular e da degradação incompleta de mitocôndrias danificadas, que não podem ser degradadas pelas hidrolases lisossomais nem ser exocitadas. Acumulando-se ao longo do tempo nas células pós-mitóticas estes resíduos não são destruídos durante divisão celular e são importantes não só no envelhecimento, mas também no diabetes, e seu acúmulo intracelular pode resultar no aparecimento de doenças. Segundo Terman & Brunk (1998) os materiais formadores dos grânulos de lipofuscina são inicialmente seqüestrados por um autofagossomo. Estas estruturas geralmente são circundadas por duas membranas e não possuem enzimas lisossomais. Estes, posteriormente fundem-se a um lisossomo primário ou secundário. Com isso, segundo estes mesmos autores, existem dois mecanismos principais para o acúmulo de lipofuscina:

1: se os materiais autofagocitados, não puderem ser totalmente eliminados de células pós mitóticas, independentemente de sua idade, tanto por degradação quanto por exocitose, a formação de lipofuscina ocorrerá.

2: se a formação da lipofuscina é o resultado de transformações relacionadas à idade na função lisossomal, aumento no número de autofagossomos, decréscimo na capacidade de degradação intralisossomal ou diminuição da exocitose, qualquer acúmulo de lipofuscina, não será substancial até que todas estas modificações sejam observadas na célula.

Segundo Radu et. al. (2005), um dos principais componentes da lipofuscina é a bis-retinoide N-retinolidina-retinoletanolamina (A2E), que confere à lipofuscina sua autofluorescência. As propriedades biológicas da A2E têm sido extensivamente estudadas; demonstrando possuir várias propriedades citotóxicas, como por exemplo, a inibição das funções degradativas dos lisossomos, a indução da apoptose e pode agir como um detergente catiônico, dissolvendo as membranas celulares. O principal gene relacionado à formação da lipofuscina é o gene ABCA4, cuja baixa expressão gera o acúmulo deste pigmento, o que pode ocorrer não só com o envelhecimento mas também com o estresse oxidativo. Em peixes a proteína que exerce esta função é CH211-195I6.3 expressa pelo gene 555506.

Segundo Arking (2008) a lipofuscina não parece ser muito reativa quimicamente e provavelmente não interfere no funcionamento adequado da célula no nível químico; entretanto, a obstrução mecânica e/ou a interferência com outros processos celulares é certamente uma possibilidade.

Até o presente momento nenhum trabalho foi realizado visando observar os efeitos do acúmulo deste grupo de proteínas em peixes de ambientes neotropicais.

### **A importância dos estudos morfológicos e os impactos de poluentes em peixes**

A maioria dos vertebrados aquáticos possui brânquias, estruturas especializadas nas trocas gasosas (POUGH et al, 2003). As brânquias dos peixes estão posicionadas em bolsas faríngeas. O fluxo de água é geralmente unidirecional – entrando pela boca e saindo pelas brânquias e o arranjo vascular nas brânquias maximiza a troca de oxigênio (POUGH et al, 2003). Cada filamento branquial possui duas artérias, um vaso aferente, que vai do arco branquial até a extremidade distal do filamento, e um vaso eferente, o qual retorna o sangue para o arco (POUGH et al, 2003). As brânquias devem ser permeáveis ao oxigênio e ao dióxido de carbono e também permeáveis à água. Como resultado, a maioria dos movimentos da água e dos íons ocorre na superfície das brânquias (POUGH et al, 2003). Revestindo o arco branquial, os rastros, os filamentos branquiais e as regiões interlamelares, encontra-se o epitélio branquial. Esse epitélio é estratificado e composto por diversos tipos celulares, incluindo as células pavimentosas, as células secretoras de muco e as células de cloro, além de botões gustativos e células de suporte não diferenciadas (MACHADO, 1999). As células de cloro são grandes, encontram-se esparsas na superfície lamelar, são ricas em mitocôndrias e atuam em processos de transporte ativo de íons (MACHADO, 1999; PERRY, 1997).

Segundo Evans (2008), desde o início dos estudos fisiológicos, numerosos grupos de pesquisa têm demonstrado que as células de cloro, em grande variedade de teleósteos podem

manifestar  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase ativas. Devido ao grande número de mitocôndrias presentes nestas células, elas também são conhecidas como células ricas em mitocôndrias ou MRC.

Segundo Perry (1997), vários estudos sugerem que as células de cloro são os sítios ativos da regulação do transporte de íons em peixes marinhos e de água doce. Esta regulação, sobretudo em peixes marinhos pode representar uma parcela substancial do orçamento energético, devido à hidrólise de ATP pelos vários transportadores íon-ATPases. Estes incluem  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase de alta afinidade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e, talvez, o mal-definido  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -ATPase (PERRY, 1997).

Em condições iônicas desfavoráveis ou em contato com agentes tóxicos, ocorre a proliferação das células de cloro nos filamentos e na superfície lamelar da brânquia (PERRY, 1997). Segundo Perry & Walsh (1989), as células de cloro possuem taxa metabólica mais elevada do que a das outras células da brânquia e a taxa metabólica do restante da brânquia afeta diretamente a população de células de cloro, podendo gerar a proliferação das mesmas.

A grande superfície das brânquias é favorável a trocas gasosas, mas pode também causar vários problemas, incluindo fluxos energeticamente desfavoráveis de água e íons. Como resultado, os peixes apresentam a superfície respiratória que se iguala a sua demanda de oxigênio (NILSSON, 2007). Quando se deparam com mudanças em sua necessidade por obtenção de oxigênio, devido à alteração em suas atividades físicas ou a alterações no nível de oxigênio do ambiente, os peixes possuem dois ajustes amplamente conhecidos: podem mudar o fluxo de água nas brânquias ou mudar o fluxo de sangue no interior das brânquias e recentemente foi constatado que alguns teleósteos possuem uma terceira opção: remodelar a morfologia das brânquias (NILSSON, 2007). Neste contexto, a análise das mudanças morfológicas constitui uma ferramenta eficiente para diagnosticar e identificar as conseqüências fisiológicas de contaminações quase letais (ROMÃO et al 2006).

O fígado é um órgão muito irrigado, devido às suas funções de processamento e armazenagem de nutrientes absorvidos no trato digestivo e de neutralização e eliminação de substâncias tóxicas. É um órgão composto basicamente por hepatócitos, que são células poliédricas, com seis ou mais superfícies (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2004). Por ser o principal órgão no processo de detoxificação de xenobióticos o fígado está sujeito a alterações, uma vez que este normalmente acumula concentrações mais elevadas de substâncias tóxicas (MADUENHO et. al 2007). Em estudos realizados por estes mesmos autores com a espécie *P. lineatus*, foi possível identificar estágios de degeneração do fígado após a exposição dos animais a DFB (diflubenzuron), sendo que o estágio I foi caracterizado por apresentar agregados de melanomacrófagos, hipertrofia celular e nuclear e núcleos dos

hepatócitos deslocados para a periferia; o segundo estágio apresenta vacuolização nuclear, degeneração citoplasmática e nuclear, estagnação biliar e núcleos picnóticos.

Segundo Simonato et al (2007), peixes expostos a poluentes como petróleo, por exemplo, podem apresentar modificações em seus fígados como hipertrofia do núcleo, núcleos em posição lateral, vacuolização do citoplasma, degeneração do citoplasma, entre outras. Em estudos toxicológicos realizados por Jiraungkooskul et al. (2002), com herbicidas demonstraram proliferação das células das lamelas secundárias, hiperplasia, fusão lamelar e aneurisma na brânquia, vacuolização e picnose nuclear no fígado e dilatação do espaço de Bowman no rim em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*. Em estudo semelhante, Aguiar et. al. (2004) demonstraram que em *Anguilla anguilla*, o fenitrothion, um outro tipo de herbicida, causou redução do nível de glicogênio no fígado e no músculo.

### **Biologia de *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae)**

As espécies da família Prochilodontidae (onde está incluído o gênero *Prochilodus*) possuem como características em comum corpo de porte médio a grande, iliofagia (alimenta-se de detritos nos fundos lamacentos), reofilias (dependem da correnteza do ambiente natural fluvial) e capacidade migratória durante o período de piracema (SILVA, 2006). O gênero *Prochilodus* destaca-se por sua ampla distribuição na região neotropical, e possui 13 espécies descritas até o momento. Quanto à morfologia, os representantes desse gênero possuem lábios grossos, móveis e providos de dentículos, escamas ecnóides formando o anel etário durante a época de desova. Espécies de *Prochilodus* são conhecidas no Brasil pelos nomes populares de curimbatá, curimba, curimatã, curimatã-pioa, curimatã-pacu, papa-terra e corimbatá (SILVA, 2006). As espécies de *Prochilodus* possuem características reprodutivas em comum, tais como: desova única por temporada com elevado número de óvulos, fecundação externa e ausência de cuidado parental. A espécie *P. lineatus*, conhecida popularmente como curimbatá, encontra-se amplamente distribuída em toda a bacia dos rios Paraná-Paraguai e no Rio Paraíba do Sul (na costa sudeste do Brasil).

O *P. lineatus* tem um ótimo potencial para a piscicultura por ter um baixo custo de produção, tornando-se uma alternativa economicamente atrativa. Devido a sua importância econômica e por ter sua biologia bem conhecida e ser sensível a poluentes, esta espécie é apropriada para testes de toxicidade (MADUENHO et. al 2007).

### **Biologia de *Astyanax altiparanae* (Characidae)**

Os lambaris ou tambiús pertencem à subfamília Tetragonopterinae, que são estritamente de água doce e na família Characidae são os que apresentam o maior número de espécies, sendo o gênero *Astyanax* o mais comum no Estado de São Paulo (NOMURA, 1975).

Os lambaris são altamente utilizados para consumo humano, porém apresentam médio valor comercial devido ao seu pequeno tamanho. Por outro lado, possuem grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975). Além disso, são considerados transformadores de partículas orgânicas em proteína, que por sua vez deverá alimentar aves e peixes pertencentes a níveis tróficos superiores, como os piscívoros.

A espécie *Astyanax altiparanae* caracteriza-se por apresentar o corpo prateado, com a região ventral esbranquiçada e a região dorsal cinzenta, as nadadeiras caudal, anal e pélvica são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando os lobos, superior e inferior. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (BRITSKI, 1988) sendo esta espécie conhecida popularmente por lambari relógio ou lambari-de-rabo-amarelo. Contudo, como esta espécie ocorre numa grande diversidade de microambientes, as populações desse lambari não são homogêneas quanto à morfologia.

Essa espécie apresenta grande capacidade adaptativa exploratória, utilizando estratégias diferenciadas na estrutura da população (GOMIEIRO & BRAGA, 2003). Portanto, a elevada plasticidade alimentar de *Astyanax altiparanae*, bem como sua capacidade de se reproduzir em todos os ambientes, explicam o sucesso desta espécie no processo de colonização de novos habitats. Entretanto, observa-se uma preferência pela permanência em águas mais lânticas.

### **Detergentes biodegradáveis**

Populações de peixes são sensíveis a impactos ambientais resultantes de diversos fatores, seja a introdução de espécies exóticas, de detritos industriais ou residuais, derramamento de óleo, de pesticidas ou de outros agentes, que podem afetar diretamente a ecologia e a sobrevivência das espécies.

Os detergentes biodegradáveis, compostos à base de dodecil-benzeno-sulfonado de sódio, são considerados detergentes brandos, por possuírem uma cadeia lateral linear alifática. Os detergentes utilizados atualmente têm sido alvo de críticas. Não se trata apenas do problema da biodegradação, mas também do elevado teor de fosfato (de até 50%) que aumenta a eficiência na limpeza e é responsável, quando as águas residuais são despejadas em

rios e lagos pelo aumento na velocidade de crescimento e reprodução de algas e ervas daninha. Este processo é conhecido como eutrofização, que faz com que diminua o teor de oxigênio disponível nas águas, com efeitos graves sobre a vida animal (ALLINGER et al., 1978).

### **Caracterização do Lago Azul**

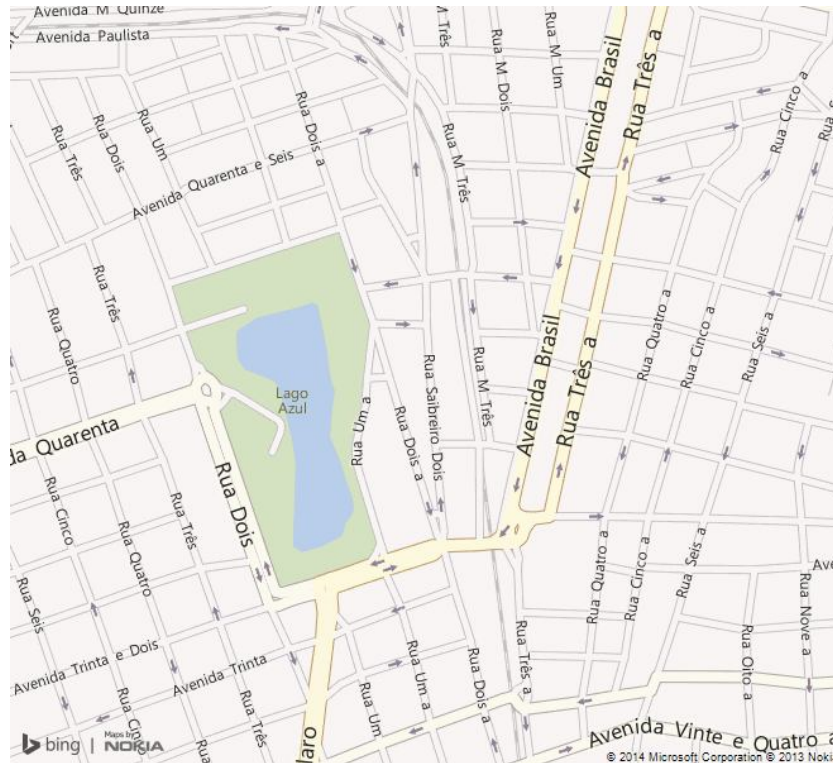
O principal canal de drenagem fluvial do município de Rio Claro - SP é o rio Corumbataí, que ao longo de seu curso, em perímetro urbano, recebe contribuições de afluentes como o ribeirão Claro e o córrego da Servidão. O córrego da Servidão, que nasce próximo à Rodovia Washington Luís e, segundo De Mauro (1993), sofreu por um longo período com a deposição de efluentes advindo da Empresa Química Nheel.

Em 1970, o córrego da Servidão foi represado originando o "Lago Azul", situado no perímetro urbano de Rio Claro, SP. Devido a sua localização geográfica (2° 24' 39"S, 47° 33' 39"L), as águas provenientes do escoamento superficial das ruas dos bairros, situados à montante, carreavam grande carga de sedimentos (terra, lixo, entulho) para o Lago, fato que resultou em seu assoreamento gradual, culminando na formação de um brejo.

O córrego da Servidão passou por obras de canalização e atualmente encontra-se confinado sob a Avenida Visconde do Rio Claro, entretanto, problemas de inundação, infiltração, erosão e contaminação das águas por esgoto são verificados em diferentes pontos deste córrego e também no Lago Azul.

Estes problemas são resultantes da ineficiência do processo de planejamento das obras, pois antes do represamento e da alteração do curso do córrego fazia-se necessário um planejamento sério que contemplasse a preservação e a recuperação da vegetação, bem como a organização da ocupação das encostas e do vale do córrego da Servidão.

Preocupada com a possível contaminação das espécies existentes no lago, a prefeitura de Rio Claro proibiu a pesca e, juntamente com a SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado São Paulo), iniciou um estudo das águas e sedimentos do Lago Azul. Cabe ressaltar que, sendo o Lago Azul um represamento do córrego da Servidão, afluente direto do rio Corumbataí, este corpo d'água fluvial, bem como sua fauna, são diretamente afetados pelos despejos e impactos impostos ao Lago e vão atingir o Rio Piracicaba.



Mapa da cidade de Rio Claro - SP, evidenciando a localização do Lago Azul (2° 24' 39"S, 47° 33' 39"L). Fonte: <http://www.bing.com/maps/print.aspx?mkt=pt-br&z=16&s=r&cp=-22.392467,-47.561332&pt=pb>

## Ecotoxicologia

A ecotoxicologia possui duas linhas de pesquisa, uma envolvendo a toxicologia e a outra envolvendo a ecologia aplicada e a química ambiental. Ela é importante, pois estuda as interações da química ambiental e a biota, assim, tem como foco os efeitos adversos encontrados nos diferentes níveis de organização biológica, desde níveis mais simples como a molécula, célula, tecido, órgão, até níveis mais complexos como organismos, populações e ecossistemas. Os efeitos tóxicos de compostos antropogênicos na biota e em ecossistemas são investigados numa conexão próxima com a química ambiental e o destino desses produtos químicos, incluindo sua disponibilidade natural (FENT, 1996).

Segundo Zagatto & Bertoletti (2006) embora os primeiros testes de toxicidade com despejos industriais tenham sido realizados entre 1863 e 1917, somente na década de 1930 foram implementados alguns testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos, com o objetivo de estabelecer a relação causa/efeito de substâncias químicas e despejos líquidos. Segundo Rand (1940), vários estudos realizados na década 1940 recomendavam o uso de

testes com peixes para avaliar a toxicidade de despejos líquidos. Nesse período, os estudos mostraram também a maior resistência de algumas espécies de peixes aos reagentes químicos, sendo então desenvolvidos estudos com espécies mais sensíveis, de importância econômica e representativos do ambiente aquático, tornando evidente a diferença na sensibilidade das espécies e seu significado ecológico.

Segundo Bols et al (2001) e Bols et al (2005) na perspectiva da ecotoxicologia, os peixes são especialmente importantes. Com aproximadamente 20.000 espécies diferentes ocupando todos os nichos aquáticos, os peixes constituem o grupo de vertebrados mais diversificado. Assim o entendimento das ações de poluentes em peixes auxilia a avaliar o estado de degradação dos ambientes aquáticos. Os efeitos de poluentes em peixes também são importantes para a previsão de possíveis impactos na saúde humana. Agentes tóxicos são usualmente liberados primeiramente em ambientes aquáticos, por diversas vias, nas quais humanos podem ser expostos. Como diversos sistemas biológicos têm sido preservados através da evolução, efeitos em peixes podem servir como um alerta para futuros impactos na saúde humana. Nesta mesma linha, peixes podem servir como modelos laboratoriais para estudos ecotoxicológicos, visando sua importância econômica. Para a indústria da pesca, não só a saúde de determinadas espécies alvo é de extrema importância, mas também a manutenção das demais espécies é considerada crítica para a manutenção de cardumes pesqueiros.

### **Objetivos:**

O presente projeto foi desenvolvido nos laboratórios de Histologia e Microscopia Eletrônica, do Departamento de Biologia da UNESP, Campus de Rio Claro, e no Laboratório de Reprodução de Peixes localizado no CEPTA – Instituto Chico Mendes, Pirassununga – SP, e visou implementar uma nova metodologia de estudo toxicológico em peixes. Terá para o seu desenvolvimento a participação dos Dr. Anderson Luis Alves (Embrapa, TO), dos Drs. José Augusto Senhorini e analista ambiental Rita de Cássia Gimenes de Alcântara Rocha, ambos do ICMBio/CEPTA.

As espécies *Prochilodus lineatus* e *Astyanax altiparanae*, foram escolhidas por serem de diferentes portes o que possibilita a análise de tais efeitos em indivíduos de massa corpórea distinta e por serem espécies abundantes nos rios as quais recebem poluentes semelhantes aos que foram estudados neste trabalho.



Nesse sentido pretendemos neste projeto testar a seguinte hipótese de trabalho: se, “após a exposição dos indivíduos aos poluentes, há modificações morfológicas nas brânquias e no fígado e ocorre maior acúmulo de lipofuscina nestes organismos”.

Com isso este trabalho tem como objetivo geral:

- Identificar e comparar as possíveis alterações na morfologia das células do fígado e brânquias, bem como um provável envelhecimento celular precoce destes órgãos, em peixes das espécies *P. lineatus* e *A. altiparanae*.

E como objetivos específicos:

- A identificação de possíveis alterações na morfologia do fígado e brânquias destes espécimes após a exposição aos poluentes, submetidos a dois tratamentos, bem como as alterações no acúmulo de glicogênio no fígado, através de análises ultra-estruturais e histológicas.
- Quantificação do acúmulo do pigmento lipofuscina nestes órgãos, através de análises ultra-estruturais, histológicas e de fluorescência.

## **Metodologia geral:**

### **Material**

Para a realização do presente projeto foram utilizados 60 indivíduos da espécie *Prochilodus lineatus* e 60 indivíduos de *Astyanax altiparanae*, com o mesmo estágio de desenvolvimento, que foram obtidos junto ao ICMBio/CEPTA – Instituto Chico Mendes (Pirassununga, SP).

Os peixes de cada espécie a serem analisados separadamente em períodos distintos foram mantidos em três caixas de polietileno com capacidade de 500 litros cada, que receberam amostras de água dos dois tratamentos e do controle. Tratamento 1: água com poluentes do tipo detergentes biodegradáveis (ver método para as concentrações); Tratamento 2: água proveniente do Lago Azul (Rio Claro, SP) com altos níveis de poluentes dissolvidos; Controle: água limpa coletada no poço artesiano, situado na UNESP (Rio Claro).

Para as análises ultra-estruturais foram utilizadas as instalações do Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP, Rio Claro, enquanto as análises histológicas foram realizadas no laboratório de histologia da mesma unidade. Os equipamentos usados foram os microscópios Leica CM 2000 e Olympus BX51, providos de câmera para captura de imagens e o microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100.

## Métodos:

### A) Amostragem e Tratamentos

Para cada espécie foram utilizados 3 casais, sendo as matrizes escolhidas ao acaso para a reprodução, garantindo a manutenção de variabilidade genética dos indivíduos para o experimento. Os representantes provenientes dos três cruzamentos foram expostos aos poluentes pelos período de 5 meses, sendo efetuadas coletas após 1 e 5 meses de experimento.

Os animais foram alimentados com a mesma ração fornecida no ICMBio/CEPTA. O grupo controle foi exposto à água comprovadamente pura do poço artesiano da UNESP, Rio Claro, que recebe posterior tratamento com cloro, segundo as normas da SABESP, para eliminar as possíveis contaminações da mesma. O Tratamento 1 foi exposto a uma diluição na proporção de 1:1000000 de uma mistura de 10 marcas de detergentes biodegradáveis comerciais, que foram acrescentadas na mesma água utilizada no grupo controle, para que os parâmetros químicos, como a concentração de cloro fossem mantidas as mesmas. O Tratamento 2 foi exposto à água do Lago Azul, Rio Claro, SP.



Figura 1: Estrutura montada na UNESP – Campus de Rio Claro, contendo caixas de polietileno de 500L, nas quais o experimento foi realizado. Foto de Bruno Fiorelini Pereira.

Para uma melhor análise dos resultados obtidos, amostras das águas do grupo controle e dos dois tratamentos, foram analisadas no Laboratório de Análise de Águas do Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas – UNESP – Campus de Rio Claro. Estas análises foram realizadas para os dois experimentos deste

trabalho, seguindo as normas do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, para os parâmetros descritos abaixo:

Foi realizada a determinação de metais por ICP-AES para os elementos: Mg, Ca, Sr, Ba, Cr(t), Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Si, P(t) e Pb. Os ânions: F-, Cl-, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, PO<sub>4</sub>, SO<sub>4</sub>, ClO<sub>2</sub>-, acetato e oxalato mais os cátions Li, Na, NH<sub>4</sub> e K são determinados por cromatografia Iônica. Será realizada também a análise de pH, condutividade, alcalinidade total e carbonatos por titulação potenciométrica.

Poucos estudos abordam os valores de toxicidade dos detergentes biodegradáveis, segundo Roy (1988) a DL50 para diversos grupos de peixes varia entre 7ppm e 22,5ppm. Nesse sentido, o presente estudo utilizou uma diluição de 1ppm, pois visa detectar alterações histológicas já com níveis baixíssimos de agente poluentes, tendo em vista que a diluição de detergentes em rios, não deve exceder este valor.

Antes de serem sacrificados para a coleta dos órgãos a serem analisados, os animais foram anestesiados em solução de benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada), para amenizar sofrimento dos indivíduos durante o processo de dissecação (Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico - UNIARARAS nº 646/2009).

## **B) Análises histológicas**

Para a análise histológica, foram sacrificados 6 indivíduos, sendo três de cada casal reproduzido; o fígado e as brânquias foram retirados e um fragmento dos mesmos foi fixado em Bouin aquoso, desidratado em álcool, preparado para a técnica em historesina, com reações em Hematoxilina – Eosina, para a análise de possíveis alterações na morfologia do órgão, e em PAS, para identificar as modificações no acúmulo de glicogênio. Quanto às brânquias, elas foram fixadas em formol neutro, passaram pelo mesmo processo de desidratação e inclusão em resina para a reação de Von Kossa, para a visualização das células ricas em mitocôndrias segundo Pereira e Caetano (2009).

Segundo Melendi et. al. (2005) a lipofuscina pode ser observada nas técnicas de H-E e PAS, como pontuações intracitoplasmáticas de cor pardo-amarelada, com isso as técnicas de histologia também foram utilizadas para a análise de deposição deste pigmento. O material histológico foi analisado e fotografado com o auxílio de um microscópio Leica CM 2000. Os protocolos das técnicas de histologia estão descritos abaixo:

- Hematoxilina e Eosina: Segundo Paulete & Beçak (1976) esta técnica é composta dos reagentes Hematoxilina, que possui características basófilas e cora o núcleo celular de azul, e

Eosina, que possui características acidófilas e cora o citoplasma da célula de rosa. Para a realização desta técnica as lâminas foram deixadas em água destilada por 1 min., coradas com hematoxilina por 5min, reagirão com água por 4min, foram lavadas em água corrente, coradas com eosina por 5min e lavadas em água corrente.

- PAS (Ácido Periódico de Schiff): Segundo Paulete & Beçak (1976) o ácido periódico quando atua nos polissacarídeos, oxida-os, dando lugar à formação de aldeídos, os quais podem ser detectados pelo reativo de Schiff. Para a realização desta técnica as lâminas foram deixadas em ácido periódico 0,4% por 10min, lavadas em água destilada, reagiram com o reativo de Schiff por 1h no escuro, lavadas em água sulfurosa (3 banhos de 1min. cada), lavadas em água corrente por 10min.

- Von Kossa: Segundo Pereira & Caetano (2009) este método depende da presença de fosfato e carbonato. Em tecidos animais, entretanto fosfatos insolúveis e carbonatos estão sempre perto do cálcio, com isso este teste é bastante específico para este elemento. Para a realização desta técnica as lâminas foram coradas por 20min. com nitrato de prata, lavadas rapidamente em água, reveladas com D-72 por 1min, tratadas com tiosulfato 5% por 30min, lavadas em água destilada e contracoradas com hematoxilina por 2min.

### **C) Análises de ultraestrutura**

Para a análise de ultraestrutura, segundo Reynolds (1963), fragmentos do fígado e das brânquias foram fixados em glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante 2 horas em geladeira. A seguir, foram processadas duas lavagens em tampão cacodilato de sódio com duração de 15 minutos cada uma e, em seguida, foi realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% durante uma hora no escuro. O material foi, então, lavado por 15 minutos no mesmo tampão por duas vezes. Para a contrastação, o material foi colocado em acetato de uranila 1% dissolvido em álcool 10% por 8 horas, sendo em seguida desidratado em álcoois (de 70 a 100%) e, posteriormente, embebido em resina Epon mais acetona (1:1) por 24 horas sob agitação. O material foi, então, incluído em resina Epon pura e levado à estufa por 72 horas, a 60°C, para polimerização. O material foi cortado em ultramicrotomo Porter Blum, colocado em grades de cobre e em seguida contrastado em acetato de uranila (45 minutos) e citrato de chumbo (15 minutos) (REYNOLDS, 1963). O material foi analisado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100 do laboratório de microscopia eletrônica do departamento de Biologia, UNESP - Rio Claro.

**D) Análise da presença de lipofuscina nos tecidos**

Assim como descrito anteriormente a lipofuscina possui a propriedade de autofluorescência, com isso cortes sem coloração foram analisados ao microscópio de fluorescência Olympus – BX51 e analisados e fotografados no software DP – Controller, sob o filtro de luz de 450 – 490 nm, segundo Peixoto et. al. (2002).

## CAPÍTULO 1

Alterações hepáticas em *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus* expostos a detergentes biodegradáveis e poluentes urbanos

## 1.1 - Resumo

O despejo indiscriminado de substâncias de origem doméstica e/ou industrial em ecossistemas aquáticos, resultantes de atividades urbanas, gera preocupação quanto aos seus efeitos na fauna, direta e indiretamente ligadas ao ambiente contaminado. O fígado é o órgão responsável pela metabolização de substâncias absorvidas pelos animais, sendo o principal órgão alvo de diversos poluentes, além de exercer funções vitais básicas no organismo. Por este motivo, este órgão é utilizado como o principal e mais confiável biomarcador em estudos ambientais. Com isso, este trabalho visou identificar as alterações hepáticas oriundas da contaminação da água por detergentes biodegradáveis de marcas comerciais e seus efeitos quando presente juntamente com diversos outros contaminantes encontrados na natureza. Para tanto foram testadas as ações, no fígado, de detergentes biodegradáveis a 1ppm e da água de um lago urbano (2° 24' 39"S, 47° 33' 39"L), em duas espécies de peixes, nativas brasileiras de ampla distribuição geográfica (*Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus*). Diversas alterações foram encontradas, como vacuolização citoplasmática, deslocamento nuclear, recrutamento de macrófagos, diminuição de glicogênio hepático, entre outras, evidenciando um processo de degeneração do fígado destes peixes, devido a ação dos contaminantes.

## 1.2 – Introdução

De acordo com Langiado e Martinez (2006) a poluição ambiental tem sido uma questão cada vez mais preocupante, uma vez que tem comprometido a qualidade deste recurso. Segundo Sures et al. (1999) biotas aquáticas continuam sofrendo grande estresse químico devido a influencia antropogênica . A poluição aquática está comumente associada com a descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas. Estas práticas geram uma grande quantidade de resíduos, e os corpos d'água são um meio barato e eficiente para eliminar a maior parte destes contaminantes (LANGIADO & MARTINEZ, 2006 e MASON, 1996). Existem centenas de poluentes que atingem o ambiente aquático e cujos efeitos são preocupantes. Os principais tipos de poluentes são os metais, os compostos orgânicos (como pesticidas, hidrocarbonetos alifáticos, solventes, surfactantes, hidrocarbonetos de petróleo, compostos organometálicos, gases, como o cloro, ânions, como cianetos e sulfetos, ácidos e alcalóides (LANGIADO & MARTINEZ, 2006). Esse número cresce anualmente, considerando-se que novos compostos e novas formulações são sintetizados (LANGIADO & MARTINEZ, 2006 e MASON, 1996). Esta idéia é corroborada por Rodrigues & Fanta (1998), que descrevem que se por um lado a população humana prospera, por outro lado eleva

os riscos ambientais, devido à produção de novos elementos químicos que acompanham tal crescimento.

Sánchez-Fortún (2009) relatam que atividades humanas estão mudando a biosfera e causando uma crise na biodiversidade, tendo em vista que novas substâncias estão poluindo a água e causando catástrofes ambientais nos sistemas aquáticos. Este é um problema de grande importância, sendo que pesquisas básicas devem ser realizadas para que informações úteis sejam geradas para futuras previsões, e com isso estratégias de proteção destes ambientes sejam elaboradas (SÁNCHEZ-FORTÚN, 2009).

Segundo Gernhöfer et al. (2001) a proteção e restauração dos ambientes aquáticos tem obtido grande atenção no decorrer das últimas duas décadas, sendo que novas tecnologias de remediação e limpeza têm sido desenvolvidas e novas legislações foram criadas para reduzir a emissão de contaminantes. Em países industrializados, os problemas atuais relacionados ao meio ambiente, estão correlacionados a liberação de toxinas em concentrações subletais e seus efeitos em longo prazo, os quais são difíceis de serem detectados (GERNHÖFER et al., 2001).

Roy (1988) descreve que detergentes sintéticos são as substâncias mais utilizadas na civilização moderna, como na preparação de xampus, indústrias, produtos de limpeza de residências, pasta de dentes, entre outros, e são uma das maiores fontes de poluição aquática. Segundo Lal et al. (1983) dentre os contaminantes ambientais, os detergentes sintéticos liberados nos ecossistemas aquáticos, com potencial para afetar a fauna e flora, são de extrema importância. Onze espécies de peixes e invertebrados aquáticos expostos a misturas de alquilbenzeno sulfonato, base dos detergentes, em diversas condições ambientais e durante diferentes estágios de desenvolvimento, indicaram respostas variadas (LAL et al., 1983).

De acordo com Fernandes et al. (2008) o uso de biomarcadores tem se tornado atrativo e útil no monitoramento da qualidade ambiental e na saúde de peixes que habitam ecossistemas poluídos. Neste sentido espécies de peixes são amplamente utilizadas como monitores biológicos da variação dos níveis de poluentes ambientais (TEKIN-ÖZAN, 2008).

Fernandes et al. (2008) relatam que o fígado possui funções vitais para o metabolismo básico e é o órgão responsável pela acumulação, biotransformação e excreção de contaminantes em peixes. Muitos xenobióticos e metais se acumulam no fígado, de modo que suas células ficam expostas a um nível elevado de agentes químicos que podem estar presentes no meio ambiente ou em outros órgãos do peixe, sendo que devido a sua função no metabolismo e a sua sensibilidade a, este órgão tem se destacado em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de várias espécies de peixes por agentes químicos orgânicos e



inorgânicos (LANGIADO & MARTINEZ, 2006). Parâmetros hepáticos, como alterações histológicas nos hepatócitos e depleção de glicogênio, vêm sendo utilizados em estudos de efeitos de poluentes ambientais em peixes (LANGIADO & MARTINEZ, 2006). A histopatologia do fígado em peixes é a ferramenta de monitoramento que indica os efeitos de agentes estressores em populações de peixes e é proposto como um dos marcadores mais confiáveis a ser utilizado em estudos de impacto ambiental em animais aquáticos (FERNANDES et al. 2008).

Tendo em vista o atual contexto ambiental, este trabalho visou utilizar o fígado como biomarcador em peixes nativos da fauna brasileira, após a exposição a poluentes urbanos, dentre eles os detergentes biodegradáveis.

### **1.3 - Metodologia**

#### **1.3.1 – Espécimes**

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 120 indivíduos, sendo 60 da espécie *Prochilodus lineatus* e 60 de *Astyanax altiparanae*. Estes foram fornecidos pelo ICMBio/CEPTA – Pirassununga – SP – Brasil, após a reprodução de suas matrizes, sendo que o experimento foi iniciado com 3 meses após a eclosão, em *P. lineatus* e 4 meses para *A. altiparanae*. Estas espécies foram escolhidas por possuírem grande importância comercial, sendo utilizadas principalmente na alimentação e por estes gêneros estarem distribuídos em todo o território brasileiro.

#### **1.3.2 – Experimentação**

As espécies foram divididas em 3 tratamentos contendo 20 indivíduos cada. O primeiro, considerado o grupo controle foi exposto a água comprovadamente pura do poço artesiano da UNESP – Campus de Rio Claro – SP – Brasil; o segundo a diluição de 1ppm de detergentes biodegradáveis comerciais e o terceiro a água oriunda do chamado Lago Azul – Rio Claro – SP, este um lago urbano e destino final de esgoto de residências, pequenas indústrias e postos de gasolina. Todo o experimento foi replicado para a confirmação dos resultados (Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico - UNIARARAS nº 646/2009).

### **1.3.3 – Preparações para as análises histológicas**

Foram realizadas duas coletas, a primeira após 1 mês de exposição e a segunda após 5 meses. Antes de serem sacrificados os animais foram anestesiados em solução de benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada). Após a anestesia, em cada coleta foram sacrificados 6 indivíduos por grupo, os quais tiveram fragmentos do fígado retirados e fixados em solução de Bouin aquoso por 48 horas a 4°C. Posteriormente o material foi tamponado em solução de fosfato de sódio pH = 7,4, desidratado em concentrações crescentes de álcool, incluído em historesina Leica e seccionados no micrótomo Leica RM2245.

### **1.3.4 – Análise da morfologia dos hepatócitos**

Para esta análise foram obtidos 5 cortes de 6µm cada, de cada indivíduo em estudo. Estes foram submetidos à reação de Hematoxilina e Eosina segundo Paulete & Beçak (1976). Este material foi fotografado sob a objetiva de 40X no microscópio Leica DM2000 e os principais aspectos morfológicos dos hepatócitos foram analisados, como posição do núcleo, presença de esteatose e de vacuolização nuclear e citoplasmática. Além desta análise foi realizada a mensuração da área dos núcleos e citoplasma das células hepáticas. Para isto foram quantificadas 50 células, escolhidas aleatoriamente, de cada corte obtido a partir dos espécimes em análise, totalizando 250 células por indivíduo em cada tratamento. Estas medições foram realizadas com o auxílio do software ImageJ versão 1.46j. Neste foram traçados segmentos entorno dos núcleos e citoplasma e com isso suas áreas foram obtidas (Figura 1-A). Foram analisadas apenas as células cujas delimitações nucleares e citoplasmáticas estavam claras, para que não houvesse erros durante a quantificação. Os dados obtidos foram tabelados e foi obtida uma média de cada um dos parâmetros analisados para cada indivíduo dos 3 tratamentos, estas foram comparadas estatisticamente.

### **1.3.5 – Quantificação de glicogênio**

Para a análise do glicogênio, cinco cortes de cada indivíduo foram analisadas após a reação de PAS segundo Paulete & Beçak (1976), nos quais cinco campos foram fotografados e analisados em cada corte, sempre distantes de grandes vasos, para que o maior número de hepatócitos possíveis fosse analisado. O glicogênio foi isolado com o auxílio do programa ImageJ (Figura 1-B), e a área total ocupada por este elemento foi quantificada. Foram obtidas médias para cada indivíduo em cada tratamento, as quais foram comparadas estatisticamente.

### **1.3.6 – Identificações de macrófagos e lisossomos**

Para esta análise 5 cortes de 7µm, foram obtidos, de cada indivíduo e submetidos à técnica adaptada de Gomori (1949). Destes, cinco campos de cada corte foram fotografados e os macrófagos presentes foram contados, gerando ao final da análise uma média para cada indivíduo em cada tratamento, as quais foram comparadas estatisticamente.

### **1.3.7 – Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software BioEstat 5.0. Visando identificar variações entre os resultados, aplicou-se o teste de normalidade de Shapiro – Wilk, e posteriormente os testes de variância ANOVA/Tukey ou Kruskal-Wallis/Dunn, dependendo se os dados em questão eram paramétricos ou não paramétricos.

### **1.3.8 – Análise química da água**

Para um melhor entendimento dos resultados obtidos, amostras das águas utilizadas nos 3 tratamentos foram enviadas ao Laboratório de Análise de Águas do Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas – UNESP – Campus de Rio Claro - SP - Brasil. Estas análises foram realizadas, seguindo as normas do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, para os parâmetros descritos abaixo:

Foi realizada a determinação de metais por ICP-AES para os elementos: Mg, Ca, Sr, Ba, Cr(t), Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Si, P(t) e Pb. Os ânions: F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>, acetato e oxalato mais os cátions Li, Na, NH<sub>4</sub> e K foram determinados por cromatografia iônica. Foi realizada também a análise de pH, condutividade, alcalinidade total e carbonatos por titulação potenciométrica.

Apesar de termos utilizado uma concentração constante de detergente, mostrou-se necessária avaliação da real concentração do LAS – alquil benzeno sulfonato linear, principal componente dos detergentes domésticos. Para isso realizou-se análises cromatográficas no HPLC AgilentTechnologies 1200 series, com detector de Fluorescência, na empresa Global Análise & Consultoria – São Carlos – SP – Brasil. O mesmo teste foi realizado para a água do lago urbano para se identificar a existência desta substância.

## 1.4 – Resultados

### 1.4.1 – Sobrevivência

Não ocorreram mortes durante o experimento com a espécie *A. altiparanae*, entretanto com *P. lineatus*, durante a exposição ao lago urbano, 100% dos indivíduos morreram após 35 dias, ou seja, somente foi possível realizar uma coleta.

### 1.4.2 – *Astyanax altiparanae*

#### 1.4.2.1 – Morfologia dos hepatócitos

Os hepatócitos observados no grupo controle apresentaram citoplasma homogêneo, com núcleo central (Figura 2 – B). Após o primeiro mês de coleta, tanto o tratamento com a diluição de detergente, quanto o que continha a água do lago urbano, apresentaram hepatócitos com núcleos deslocados para a periferia, alguns com núcleos vacuolizados ou em início de vacuolização e citoplasmas com início de vacuolização, nos dois períodos de experimento, estes resultados estão resumidos na tabela 1 (Figura 2- D, e F). Pode-se observar apenas no grupo exposto ao detergente após 5 meses o aparecimento de vesículas redondas, características de lipídeos, com isso pudemos identificar, neste caso, a patologia chamada de esteatose moderada, segundo Mumford et al. (2007) (Figura 2-D).

Quanto às análises da área do núcleo e citoplasma, pudemos observar a diminuição da área do núcleo, apenas no tratamento com detergente após 1 mês de experimento com  $p < 0,01$  para o teste de ANOVA/Tukey, em comparação com o controle. Os dados obtidos para o citoplasma, demonstraram redução de área no grupo detergente nos dois períodos de experimento, sendo no primeiro mês com  $p < 0,01$  para o teste de ANOVA/Tukey e no quinto com  $p < 0,05$  para o teste de Kruskal-Wallis/Dunn (Tabela 2).

#### 1.4.2.2 – Quantificação de glicogênio

Os dados obtidos quanto à área ocupada pelo glicogênio, demonstramos que houve redução desta reserva energética nos dois tratamentos (Figura 3 – B, D e F), durante todo o experimento, com  $p < 0,01$  para o teste de ANOVA/Tukey no primeiro mês e  $p < 0,05$  para o teste de Kruskal-Wallis/Dunn no quinto mês (Tabela 2).

### **1.4.2.3 – Análise de macrófagos e lisossomos**

Os macrófagos foram identificados como grandes e fortes marcações de coloração marrom escura, enquanto os lisossomos eram pontuações citoplasmáticas pequenas e claras. Quanto à mobilização de macrófagos, identificamos significativo recrutamento deste tipo celular em ambos os tratamentos contaminados durante todo o experimento, com  $p < 0,01$  para o teste de ANOVA/Tukey (Tabela 2).

Os lisossomos apresentaram-se abundantes no grupo controle, entretanto suas marcações tornaram-se escassas nos grupos expostos aos tratamentos contaminados, indicando possivelmente inativação de suas enzimas, estas que são marcadas pela técnica de Gomori (Figura 4 A e C).

### **1.4.3 – *Prochilodus lineatus***

#### **1.4.3.1 – Morfologia dos hepatócitos**

A morfologia normal dos hepatócitos é idêntica a descrita anteriormente. Quanto às alterações, as mesmas encontradas para *A. altiparanae* foram encontradas, variando apenas em sua frequência (figura 2 – A, C e E), resumidas na tabela 1.

As áreas dos núcleos não apresentaram diferenças significativas entre nenhum dos tratamentos. Entretanto quando analisamos o citoplasma, pode-se identificar redução na sua área no grupo exposto ao detergente após 5 meses de experimento e o aumento deste mesmo parâmetro no grupo exposto ao lago urbano, com  $p < 0,01$  para o teste de ANOVA/Tukey (Tabela 3).

#### **1.4.3.2 – Quantificação de glicogênio**

O mesmo padrão de redução das reservas de glicogênio encontradas em *A. altiparanae* foram encontradas nesta espécie (Figura 3 – A, C e E), com  $p < 0,01$  para o teste de ANOVA/Tukey (Tabela 3).

#### **1.4.3.3 – Análise de macrófagos e lisossomos**

Em *P. lineatus* também ocorreu mobilização significativa de macrófagos nos tratamentos contaminados em todo o experimento, com  $p < 0,01$  para o teste de ANOVA/Tukey (Tabela 3). Entretanto quanto analisamos os lisossomos, estes também eram abundantes no controle, sendo que suas marcações ficaram escassas no grupo detergente,

somente após 5 meses de experimento, diferentemente do ocorrido em *A. altiparanae* (Figura 4).

#### 1.4.4 – Análise química da água

Os dois tratamentos analisados apresentaram pH com maior alcalinidade quando comparados com o controle ( controle: 5,39; detergente: 6,04; lago: 7,17). Esta modificação se deve a elevação na concentração de  $\text{HCO}_3^-$  presente nas amostras (controle: 1,2mg/L; detergente: 6,04mg/L; lago: 7,17mg/L). O grupo exposto ao detergente, ainda apresentou elevações consideradas significativas nos seguintes parâmetros:  $\text{NO}_2^-$  (controle: <0,04mg/L, detergente: 1,15mg/L) e Ni (controle: < 0,010mg/L, detergente: 0,066mg/L) , enquanto tais alterações no tratamento com a água do lago, ocorreram em relação ao Na (controle: <0,04mg/L, lago: 16,7mg/L);  $\text{F}^-$  (controle: 0,25mg/L, lago: 0,40mg/L);  $\text{Cl}^-$  (controle: 8,56mg/L, lago: 16,7mg/L);  $\text{NO}_2^-$  (controle: <0,04mg/L, lago: 0,86mg/L) e Fe (controle: 0,021mg/L, lago: 0,16mg/L).

Quanto a concentração de LAS na diluição de detergentes, foi encontrada 0,375 mg/L do surfactante na amostra. Na amostra do lago urbano encontramos 0,33 mg/L deste surfactante.

#### 1.5 – Discussão

Segundo Fernandes et al. (2008) a histopatologia do fígado tem sido utilizada como um indicador de estresse ambiental, pois é, em geral o ponto final dos poluentes e suas alterações dependem do contaminante, de sua concentração e do tempo de exposição. As lesões hepáticas foram classificadas em grupos e ranqueadas de acordo com sua importância como um indicador da contaminação ambiental; as lesões não-neoplásticas, como o polimorfismo nuclear, são consideradas reações iniciais da exposição a agentes tóxicos (FERNANDES et al. 2008). A necrose hepatocelular, é considerada uma resposta a ambientes severamente contaminados, principalmente por metais (SCHWAIGER et al., 1997 e OLOJO et al., 2005) . Em estudos realizados por Maduenho & Martinez (2007) na espécie *P. lineatus*, foi possível identificar estágios de degeneração do fígado após a exposição dos animais ao inseticida diflubenzuron (DFB), sendo que o estágio I foi caracterizado por apresentar agregados de melanomacrófagos, hipertrofia celular e nuclear e núcleos dos hepatócitos deslocados para a periferia; o segundo estágio apresenta vacuolização nuclear, degeneração citoplasmática e nuclear, estagnação biliar e núcleos picnóticos.

Este trabalho demonstrou a presença de alterações como hipertrofia celular, núcleos deslocados para a periferia, agregados de melanomacrófagos, entre outras, descritas pelos autores acima citados. Quando comparamos com o trabalho de Maduenho & Martinez (2007), apesar das modificações encontradas serem semelhantes, não é possível encaixar nossos dados em nenhum de seus dois estágios. Isto se deve por em ambas as espécies termos encontrado características dos dois estágios simultaneamente. Com isso podemos salientar que possivelmente esta classificação seja específica para o contaminante testado pelos autores supracitados, tendo em vista que uma das espécies de nosso experimento é a mesma utilizada por eles; ou que a transição entre estes estágios ainda deve ser definida e o tempo em que este processo ocorre, pode variar dependendo do poluente e da espécie em análise. Os resultados apresentados neste trabalho podem ser encaixados de forma mais clara na definição dada por Fernandes et al. (2008), sendo que as anomalias encontradas estão inseridas no grupo não-neoplásticas. Apesar das análises de água apresentarem a existência de metais em ambos os tratamentos contaminados, em concentrações mais elevadas do que no controle, hepatócitos necrosados não foram encontrados. Isto evidencia que estes poluentes encontram-se em diluições mais brandas, mas que sua presença, juntamente com outras substâncias geram danos ao tecido hepático.

Segundo Tekin-Özan (2008), metais traços são componentes naturais dos ambientes aquáticos, mas seus níveis se elevaram devido a despejos industriais, agricultura e mineração. Todas estas fontes de poluição afetam as características fisiológicas da água, dos sedimentos e dos componentes biológicos e conseqüentemente dos estoques de peixes sendo que para o metabolismo normal dos peixes, os metais essenciais são absorvidos pela água ou sedimentos, podendo produzir efeitos tóxicos, quando em excesso (TEKIN-ÖZAN, 2008). Gaiser et al. (2012) demonstraram que células hepáticas expostas a partículas alumínio in vitro por apenas duas horas, apresentaram grande parte do metal incorporado pelas células e estes estavam estocados em compartimentos endocíticos e secretores. Tekin-Özan & Kir (2008), em estudos realizados com carpas em um lago na Turquia, demonstraram que a contaminação deste corpo de água por metais gerou na bioacumulação destes elementos em diversos tecidos, sendo que o fígado apresentou os maiores níveis de ferro e cobre, esta concentração de metais no fígado de peixes também foi evidenciada por Amundsen et al. (2011) e Padmini et al. (2009). Estes dados evidenciam que grande parte dos estudos realizados com peixes, focam os metais traços, mas sua ação com outros poluentes ainda não foi bem estudada, entretanto mostram que grande parte dos efeitos encontrados em nosso trabalho são decorrentes da presença de metais dissolvidos.

De acordo com Maduenho et al. (2007), Figueiredo-Fernandes *et al.* (2007), que estudaram a exposição de tilápias *O. niloticus* ao cobre, foi observado aumento do tamanho dos núcleos dos hepatócitos destes indivíduos, assim como Paris-Palacios *et al.* (2000) em *Brachydanio rerio*, que também testaram a exposição ao cobre, sugerindo que esta alteração pode indicar aumento da atividade metabólica decorrente da detoxificação. Em nosso trabalho encontramos apenas a redução da área do núcleo, entretanto, estes não podem ser classificados como picnóticos, pois ainda apresentam sua forma definida e não existe condensação do material genético. Esta diminuição de área pode indicar o início do processo de formação destes núcleos inativos, que resultaram na morte celular. Estes mesmos trabalhos citados acima bem como Langiado e Martinez (2006), descrevem que em geral o aumento do tamanho do núcleo está acompanhado da dilatação citoplasmática, ambos indicando alta atividade metabólica. Em nosso trabalho foi possível identificar este tipo de alteração, entretanto acompanhado de núcleos menores do que o normal, indicando que possivelmente estas células estavam em alta atividade de desintoxicação ou estão em transição para o processo de morte celular.

Poucos estudos abordaram os efeitos de detergentes no fígado de peixes. Tovell et al. (1975) evidenciaram que em peixes da espécie *Carassius auratus* expostos a detergentes podem bioacumular surfactantes no fígado. Rejeki et al. (2006), demonstraram que em *Lates calcalifer* expostos a LAS, apresentaram vacuolização dos hepatócitos, o que está diretamente ligado ao retardamento no crescimento. Os resultados apresentados em nosso trabalho mostram alterações muito mais graves do que as observadas por Rejeki et al. (2006). Isto se deve ao fato de que os efeitos do detergente bem como dos outros contaminantes, principalmente os metais, foram potencializados, por estarem misturados, assim como descrito por Brown et al. (1968).

Lee et al. (2012) demonstraram que em *Acipenser medirostris* e *Acipenser transmontanus* submetidos a alimentação contendo metilmercúrio, apresentaram diminuição dos níveis de glicogênio e vacuolização citoplasmática, sendo que a vacuolização observada resulta da metabolização anormal de lipídeos, como a peroxidação (LEE et al., 2012). Esta variação metabólica pode estar relacionada com a falha das funções de metabolização e excreção de substâncias no fígado e a diminuição dos níveis de glicogênio está correlacionada com a elevação da glicogenólise, sugerindo uma maior demanda de energia para o reparo dos danos causados pelos poluentes (LEE et al., 2012). Isto revela que os dados referentes ao acúmulo de glicogênio obtidos por nós, evidenciam uma tentativa do organismo em eliminar os contaminantes, bem como reparar seus efeitos. Diversos trabalhos relatam a



diminuição de glicogênio hepático, mas este é o primeiro a quantificar numericamente este efeito.

Segundo Köhler et al. (2002) o lisossomo, o qual é ácido em seu interior, é o centro do sistema endossomal-lisossomal, que é contínuo com as vesículas derivadas do Golgi, contendo enzimas recém sintetizadas, também chamadas de lisossomos primários. Vacúolos autofágicos e heterofágicos fundem-se com os chamados lisossomos primários, formando os lisossomos secundários e posteriormente os chamados corpos residuais que acumulam o material que não pode ser digerido (KÖHLER et al., 2002). Estes autores evidenciaram em *Platichthys flesus*, coletados em ambientes perturbados, o fígado apresentava decréscimo de glicogênio, acúmulo de lipídeos citoplasmáticos, elevação no número de células apoptóticas e grandes agregados de macrófagos; quanto aos lisossomos, encontraram tanto elevação no número, quanto diminuição, devido à fusão lisossomal. Nossos dados evidenciaram que os grupos expostos a contaminantes, apresentaram mobilização de macrófagos, entretanto o número de lisossomos diminuiu. Isto se deve, provavelmente, não pela fusão lisossomal, mas sim pela não ativação de suas enzimas. Esta hipótese é corroborada por Couillard & Hodson (1996) que descrevem que o recrutamento de macrófagos está diretamente ligado a presença de radicais livres no órgão afetado, sendo estes produzidos principalmente durante a peroxidação lipídica. A presença de grande quantidade de macrófagos nos indica que existe elevada taxa de metabolização lipídica, cuja existência está relacionada ao excesso destas moléculas na célula. A presença de grande quantidade de lipídeos na célula pode acarretar na inativação da ATP-ase vacuolar, responsável pela acidificação de lisossomos, o que inibe a digestão celular, como observado em zebra fish por Bibliowicz et al (2011).

## 1.6 – Conclusões

Este trabalho evidenciou que a análise dos efeitos de surfactantes na fauna aquática deve ser levada em consideração por promoverem alterações nas células do fígado, entretanto seus estudos devem ser focados na ação destes poluentes em conjunto com outros contaminantes, assim como ocorre na natureza. Podemos ressaltar também que análises mais precisas como a quantificação do glicogênio e da área do núcleo e citoplasma devem ser adotadas em estudos de perturbações ambientais.

## 1.7 – Bibliografia

AMUNDSEN, P. A., et al. Heavy metal contents in whitefish (*Coregonus lavaretus*) along a pollution gradient in a subarctic watercourse. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 182, p. 301-316, 2011.

BIBLIOWICZ, J., TITTLE, GROSS, R. K., JEFFREY M.. Toward a Better Understanding of Human Eye Disease Insights From the Zebrafish, *Danio rerio*. **Prog Mol Biol Transl Sci**. v. 100, p. 287-330, 2011.

BROWN, V. M., MITROVIC, V. V., STARK, G. T. C.. Effects Of Chronic Exposure To Zinc On Toxicity Of A Mixture Of Detergent And Zinc. **Water Research**. v. 2, p. 255-263, 1968.

COUILLARD, C. M., HODSON, P. V.. Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent? **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 15, p. 1844–1854, 1996.

FERNANDES, C., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A., ROCHA, E., SALGADO, M. A.. Monitoring pollution in Esmoriz–Paramos lagoon, Portugal: Liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. **Environ Monit Assess**. v. 145, p. 315–322, 2008.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; et al. Histopathological changes in liver and gills epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesq Vet Bras.**, v. 27, n. 3, p. 103-109, 2007.

GERNHÖFER, M., et al. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**. v. 8, p. 241–260, 2001.

GOMORI, G.. An Improved Histochemical Technic For Acid Phosphatase. **Stain Technology**. v. 25, n. 2, p. 81-85, 1949.

KÖHLER, A., WAHL, E., SÖFFKER, K.. Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L.)). **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 21, n. 11, p. 2434–2444, 2002.

LAL, H., MISRA, V., VISWANATHAN, P. N., MURTI, C. R. K.. Comparative Studies on Ecotoxicology of Synthetic Detergents. **Ecotoxicology And Environmental Safety**. v. 7, p. 538-545, 1983.

LANGIANO, V. C., MARTINEZ, C. B. R.. **Toxicidade do Roundup® e seus efeitos para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus***. Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pósgraduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina. 71p., 2006.

LEE, J.W., et al. Histopathological alterations of juvenile green (*Acipenser medirostris*) and white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) exposed to graded levels of dietary methylmercury. **Aquatic Toxicology**. v. 109, p. 90-99, 2012.

MADUENHO, L.P.; MARTINEZ, C.B.R.. Acute Effects of Diflubenzuron on the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative biochemistry and physiology Toxicology pharmacology**. v. 148, n. 3, p. 265-272, 2008.

MASON, C.F. **Biology of freshwater pollution**. 3.edition. Longmann, Essex. 1996.

OLOJO, E. A. A., et al. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. **African Journal of Biotechnology**. v. 4, p.117–122, 2005.

PADMINI, E., USHA RANI, M., VIJAYA, B. G.. Studies on antioxidant status in *Mugil cephalus* in response to heavy metal pollution at Ennore estuary. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 155, p. 215-225, 2008.

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G..

Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbation of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulphate. **Aquatic Toxicology**, v. 55, p. 109-124, 2000.

PAULETE, J.; BEÇAK, W. **Técnicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, 2 Vols. 1976.

REJEKI, S., DESRINA; MULYANA, A. R.. Chronic Effects of Surfactant Detergent Linear Alkyl-Benzene Sulfonate (LAS) On the Growth and Survival Rate of Sea Bass (*Lates Calcalifer* Bloch) Larvae. **Journal of Coastal Development**. Published online. 2006.

RODRIGUES, E. L., FANTA, E.. Liver Histopathology Of The Fish *Brachydanio rerio*. (HAMILTON-BUCHMAN) After Acute Exposure To Sublethal Levels Of The Organophosphate Dimethoate 500. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 15, n. 2, p. 441 - 450, 1998.

ROY, D.. Toxicity of an Anionic Detergent, Dodecylbenzene Sodium Sulfonate, to a Freshwater Fish, *Rita rita*: Determination of L&, Values by Different Methods. **Ecotoxicology And Environmental Safety**. v. 15, p. 186-194, 1988.

SÁNCHEZ-FORTÚN, S., MARVÁ, F., ROUCO, M., COSTAS, E., LÓPEZ-RODAS, V.. Toxic effect and adaptation in *Scenedesmus intermedius* to anthropogenic chloramphenicol contamination: genetic versus physiological mechanisms to rapid acquisition of xenobiotic resistance. **Ecotoxicology**. v. 18, n. 5, p. 481-487, 2009.

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

SURES, B., STEINER, W., RYDLO, M., TARASCHEWSKI, H.. Concentrations Of 17 Elements In The Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*), In Different Tissues Of Perch (*Perca fluviatilis*), And In Perch Intestinal Parasites (*Acanthocephalus lucii*) From The Subalpine Lake Mondsee, Austria. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 18, n. 11, p. 2574–2579, 1999.

TEKIN-ÖZAN, S.. Determination of heavy metal levels in water, sediment and tissues of tench (*Tinca tinca L.*, 1758) from Beyşehir Lake (Turkey). **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 145, p. 295-302, 2007.

TEKIN-ÖZAN, S., KIR, İ.. Seasonal variations of heavy metals in some organs of carp (*Cyprinus carpio L.*, 1758) from Beyşehir Lake (Turkey). **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 138, p. 201-206, 2007.

TOVELL, P. W. A., HOWES, D., NEWSOME, C.S.. Absorption, Metabolism And Excretion By Goldfish Of The Anionic Detergent Sodium Lauryl Sulphate. **Toxicology** v. 4, p. 17-29, 1975.

## 1.8 – Tabelas

Tabela 1 : Incidência das alterações na morfologia dos hepatócitos para as espécies *Prochilodus lineatus* e *Astyanax altiparanae*.

	<i>P. lineatus</i>					<i>A. altiparanae</i>					
	Controle		Detergente		Lago	Controle		Detergente		Lago	
	1º mês	5º mês	1º mês	5º mês	1º mês	1º mês	5º mês	1º mês	5º mês	1º mês	5º mês
Vacuolização citoplasmática	0	0	++	+++	++++	0	0	+++	++++	+++	++++
Vacuolização Nuclear ou em início de vacuolização	0	0	++	++	+	0	0	+	+++	+++	++
Deslocamento nuclear	+	+	++	+++	++++	+	+	+++	++++	+++	++++

0 = ausente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente; ++++ = extremamente frequente.

	Controle		Detergente				Lago Azul			
	1º mês	5º mês	1º mês		5º mês		1º mês		5º mês	
			Média	p	Média	p	Média	p	Média	p
Glicogênio ( $\mu\text{m}^2$ )	40555.7302 (S-3731.1076)	49605.5152 (S-1370.8603)	27421.0391 (S-1972.9582)	< 0.01	16705.2130 (S-5828.0363)	< 0.05	21082.4595 (S-2120.4921)	< 0.01	28899.4829 (S-5832.5929)	< 0.05
Macrófagos	23.1667 (S-8.8638)	22.6667 (S-8.5713)	88.0000 (S-13.4759)	< 0.01	113.0000 (S-22.2711)	< 0.01	123.8333 (S-17.5090)	< 0.01	110.6667 (S-27.1269)	< 0.01
Área do núcleo ( $\mu\text{m}^2$ )	28.5039 (S-5.2742)	24.6425 (S-4.8689)	19.5232 (S-2.4367)	< 0.01	39.6102 (S-13.3834)	ns	26.5082 (S-5.2514)	ns	31.9745 (S-9.9700)	ns
Área do Citoplasma ( $\mu\text{m}^2$ )	231.1537 (S-58.5350)	108.9280 (S-11.2871)	116.9762 (S-35.1445)	< 0.01	289.5170 (S-55.9331)	< 0.05	250.6489 (S-50.7262)	ns	176.0768 (S-37.6191)	ns

Tabela2: Médias da área ocupada pelo glicogênio, número de macrófagos, e área do núcleo e citoplasma no fígado de peixes da espécie *Astyanax altiparanae*. Note a diminuição de glicogênio nos grupos expostos ao detergente e ao lago urbano, bem como o levado número de macrófagos nestes mesmos grupos, em comparação co o controle, durante todo o experimento. Pode-se observar também a redução nas áreas do núcleo e citoplasma no grupo exposto ao detergente após 1 mes de experimento e o aumento da área do citoplasma após o quinto mês de expeimento neste mesmo grupo

S – desvio padrão; ns – diferenças não significativas

	Controle		Detergente				Lago Azul			
	1º mês	5º mês	1º mês		5º mês		1º mês		5º mês	
			Média	p	Média	p	Média	p	Média	p
Glicogênio ( $\mu\text{m}^2$ )	53354.5903 (S-2730.8369)	52666.9137 (S-2642.6726)	22851.6008 (S-2514.8979)	< 0.01	18306.7575 (S-5808.3212)	< 0.01	14057.9496 (S-1484.0154)	< 0.01		
Macrófagos	34.7143 (S-8.0356)	20.1667 (S-6.6458)	92.1667 (S-13.0907)	< 0.01	124.6667 (S-15.8072)	< 0.01	115.6667 (S-19.0333)	< 0.01		
Área do núcleo ( $\mu\text{m}^2$ )	23.4899 (S-1.3556)	19.0027 (S-3.6779)	21.4796 (S-1.1278)	ns	17.1805 (S-5.6050)	ns	23.6953 (S-4.2401)	ns		
Área do Citoplasma ( $\mu\text{m}^2$ )	195.3388 (S-32.7083)	134.6878 (S-31.2936)	210.9942 (S-18.3051)	ns	89.3400 (S-25.1356)	< 0.01	273.0362 (S-48.9931)	< 0.01		

Tabela 3: Médias da área ocupada pelo glicogênio, número de macrófagos, e área do núcleo e citoplasma no fígado de peixes da espécie *Prochilodus lineatus*. Note a diminuição de glicogênio nos grupos expostos ao detergente e ao lago urbano, bem como o levado número de macrófagos nestes mesmos grupos, em comparação co o controle, durante todo o experimento. Pode-se observar também a redução na área do citoplasma no grupo exposto ao detergente após 5 meses de experimento e o aumento deste mesmo parâmetro após o primeiro mês no grupo exposto a água do lago.

S – desvio padrão; ns – diferenças não significativas



## 1.9 – Imagens

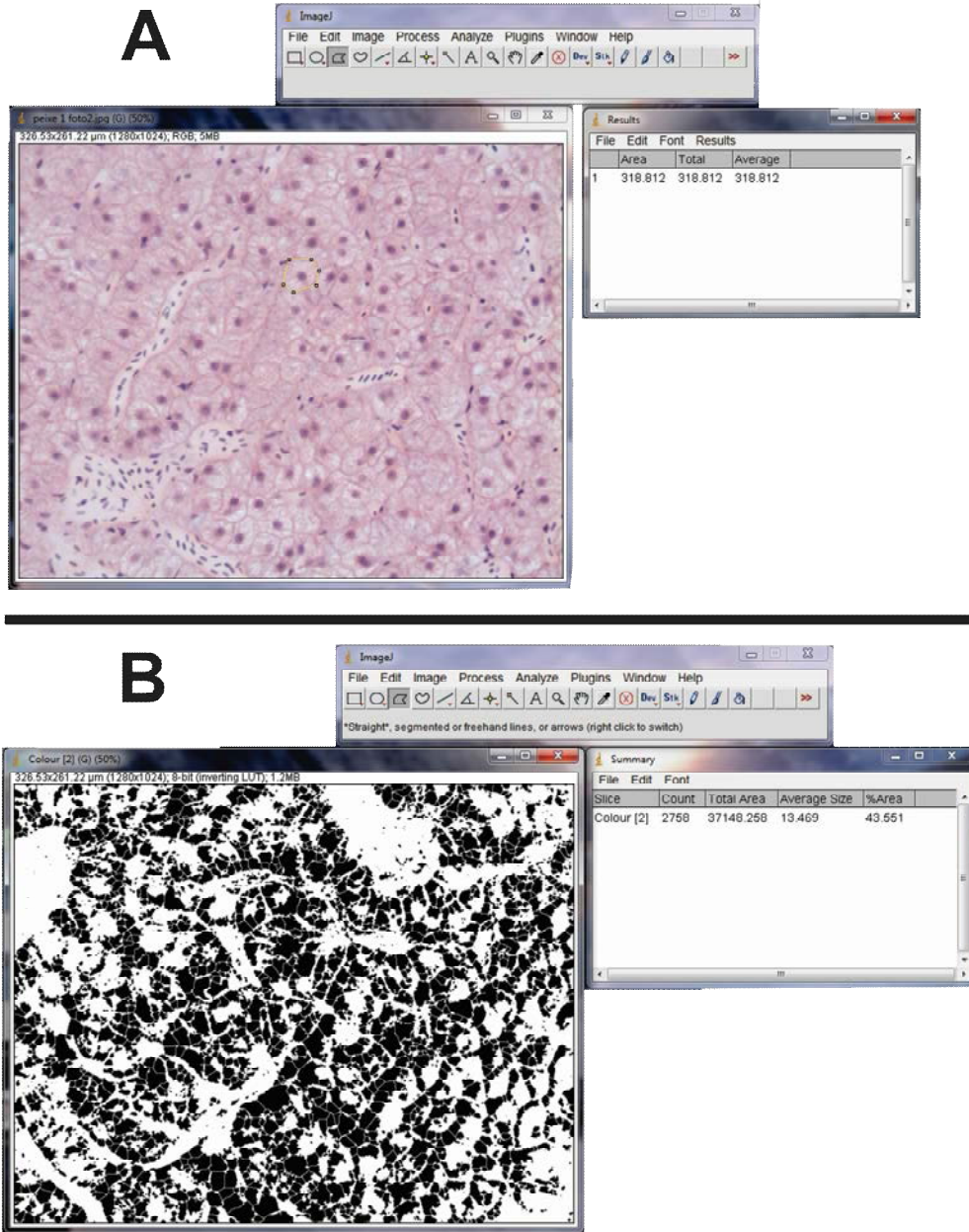


Figura 1: A - metodologia empregada para a quantificação da área do núcleo e citoplasma, no software ImageJ; B - metodologia empregada para a quantificação da área ocupada pelo glicogênio, no software ImageJ.



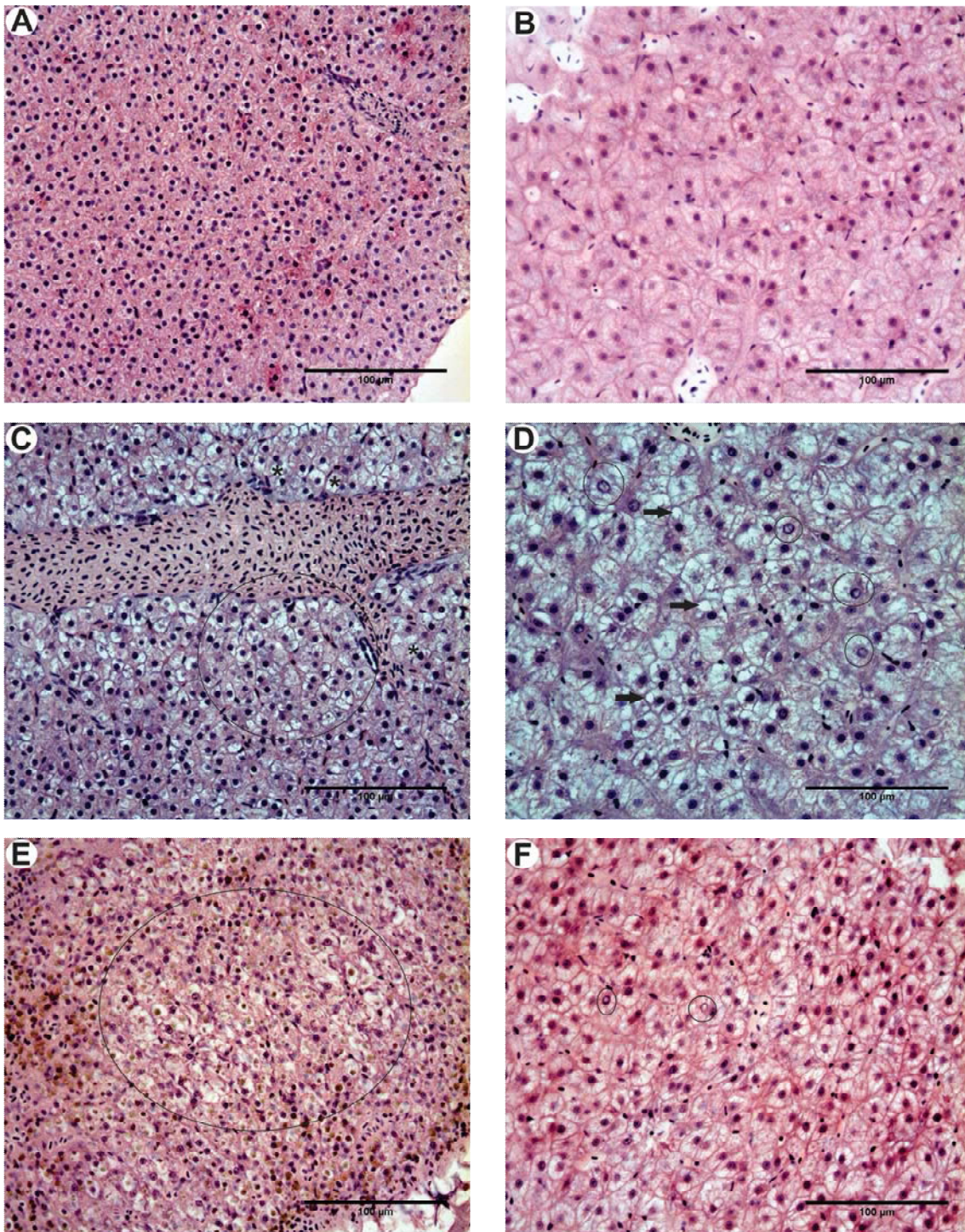


Figura 2: A e B - Morfologia normal do fígado de *P. lineatus* e *A. altiparanae*, respectivamente, note a homogeneidade do citoplasma bem como a disposição central dos núcleos; C - Fígado de *P. lineatus* após a exposição ao detergente, observe a degeneração citoplasmática (área destacada) e células com núcleo deslocado para a periferia (\*); D - Fígado de *A. altiparanae* após a exposição ao detergente, note a vacuolização do citoplasma presente em todo o tecido, bem como a presença de depósitos de lipídeos (seta) e a presença de núcleos vacuolizados (em destaque); E - Fígado de *P. lineatus* após a exposição a água do lago urbano, observe a degeneração citoplasmática (área destacada); F - Fígado de *A. altiparanae* após a exposição a água do lago urbano, note a vacuolização do citoplasma presente em todo o tecido e a presença de núcleos vacuolizados (em destaque). Técnica: H-E.



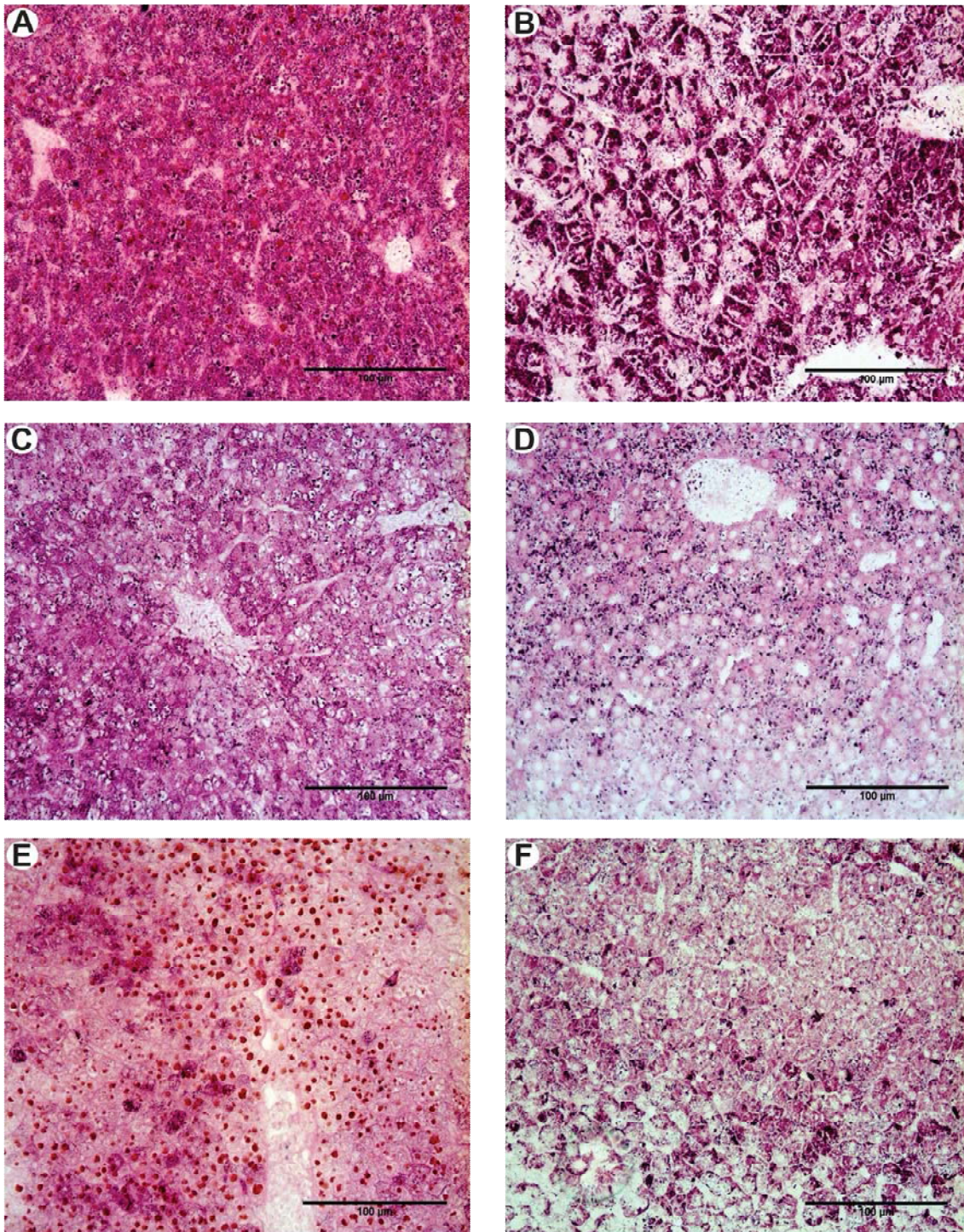


Figura 3: A e B - Distribuição normal de glicogênio no fígado de *P. lineatus* e *A. altiparanae*, respectivamente; C e D - Distribuição de glicogênio no fígado de *P. lineatus* e *A. altiparanae* respectivamente expostos a diluição de detergente; E e F - Distribuição de glicogênio no fígado de *P. lineatus* e *A. altiparanae*, respectivamente expostos a água do lago urbano. Note a diminuição de glicogênio nos grupos expostos a poluentes, em comparação com o grupo controle. Técnica: PAS



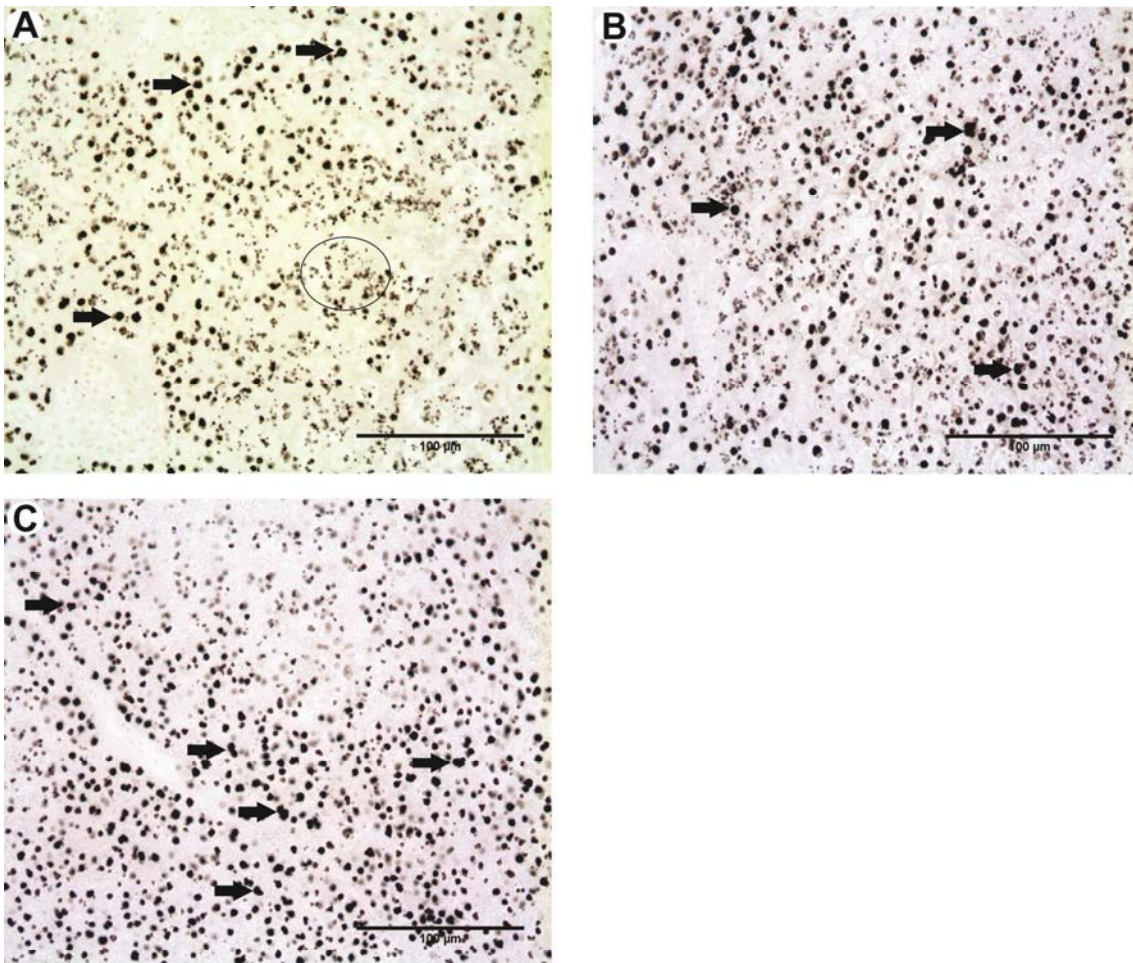


Figura 4: A - Fígado do grupo controle da espécie *P. lineatus*, note a existência de alguns macrófagos (seta) e de diversos lisossomos, que se apresentam como pequenas pontuações (área em destaque). Este mesmo padrão ocorre nos indivíduos controle em *A. altiparanae*. B - Fígado do grupo exposto ao detergente da espécie *P. lineatus*, após 1 mês de experimento, note o grande número de macrófagos (seta) e a manutenção do número de lisossomos. C - Fígado do grupo exposto a água do lago urbano da espécie *P. lineatus*, note o grande número de macrófagos (seta). Este padrão se manteve para o segundo mês de exposição ao detergente, nesta espécie e para os indivíduos expostos aos contaminantes em *A. altiparanae*. As setas indicam apenas alguns macrófagos em B e C, para efeito de identificação. Técnica: Gomori

## CAPÍTULO 2

Efeitos da exposição a detergente e outros poluentes aquáticos em brânquias de *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus*

## 2.1 – Resumo

A ação antrópica em rios e lagos urbanos é evidentemente alarmante em nossa sociedade. Os efeitos das substâncias despejadas na fauna e flora tornaram-se foco da atenção dos pesquisadores em todo o mundo. Os detergentes biodegradáveis são amplamente utilizados em residências e pequenas indústrias, entretanto pouco se sabe sobre sua ação na fauna ictiológica. Este trabalho visou identificar as modificações na estrutura da brânquia de duas espécies de peixes *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus* após a exposição à diluição de 1ppm de detergentes biodegradáveis e a água de um lago urbano. Pode-se identificar que tais contaminantes geraram diversas alterações como fusões lamelares, aneurismas, proliferação de células de muco e de cloro, não só pela presença do detergente, como também devido a sua ação sinérgica com outros poluentes.

## 2.2 – Introdução

De acordo com Amundsen et al. (2011) ambientes de água doce são os principais focos de poluição pois constituem o ponto final da deposição dos poluentes ambientais, podendo transferir estes contaminantes para peixes e até para humanos que os venham consumir. Segundo Domingos et al. (2006) e Abel (1989) a atividade industrial de mineração, processamento de metais e geração de despejos industriais e domésticos vem contribuindo para o aumento da concentração de diversos metais pesados nos ambientes naturais. Assim como descrito por Domingos et al. (2006) e Baraj et al. (2011) os organismos vivos podem bioacumular metais traços, incorporando-os na cadeia trófica e atingindo grande parte dos diferentes estratos que constituem os ecossistemas aquáticos, sendo os peixes os principais biomarcadores para tais contaminantes.

No estudo realizados por Alberto et al. (2005) observou-se que esgotos não tratados são constituídos por um complexo de substâncias tóxicas que podem intervir na saúde de peixes e podem ser considerados como um importante fator na redução da diversidade de espécies em todo o mundo. Ainda segundo estes mesmos autores, os limites de tolerância às toxinas encontradas em resíduos domésticos variam nas espécies de peixes, podendo gerar, naquelas mais sensíveis, reduções nas taxas de reprodução, sobrevivência e crescimento.

Segundo Reis et al. (2009) os recursos hídricos sempre determinaram a existência da vida, estando a saúde diretamente relacionada com a sua qualidade. Os mesmos autores descrevem que os órgãos como a pele, tubo digestivo e as brânquias estão em contato direto com a água e com as alterações físico químicas ambientais, com isso podem sofrer alterações

morfológicas, o que poderá refletir como perturbações reversíveis ou irreversíveis a fisiologia destes órgãos.

De acordo com Ogeleka et al. (2011) surfactantes são componentes usados em processos industriais e também em residências, estes, possuindo uma das maiores taxas de produção industrial dentre todos os produtos químicos orgânicos. Sua molécula apresenta sítios, hidrofóbicos e hidrofílicos, em sua estrutura o que resulta em um arranjo pseudomicelar que adsorvem outros poluentes orgânicos, sendo que sua liberação no ambiente resulta em efeitos biológicos adversos (OGELEKA et al. 2011). Ainda segundo estes mesmos autores, o alquilbenzeno sulfonato linear (LAS), um dos surfactantes mais comuns, demonstrou em estudos realizados em peixes, indução de alterações na morfologia das brânquias

Leonardo et al. (2001), descreveram em seu trabalho que as brânquias são estruturas vitais para a saúde dos peixes, pois, além de serem o principal local de trocas gasosas, também estão envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-básico, excreção de compostos nitrogenados. Portanto qualquer alteração nessa estrutura certamente comprometerá a sobrevivência dos peixes. Os teleósteos possuem cinco pares de arcos branquiais constituídos de numerosos filamentos branquiais os quais possuem lamelas secundárias (LEONARDO et al. 2001). Ainda segundo estes autores e (JOBILING, 1995) as lamelas estão situadas a um ângulo reto do eixo do filamento e representam a superfície funcional respiratória, por onde o oxigênio é absorvido e difundido aos tecidos e ao sangue. As lamelas são recobertas por células epiteliais, tendo em seu interior células pilares, células mucosas e células de cloro, sendo que muitos agentes patológicos e químicos podem produzir alterações histológicas, como edema e hiperplasia epitelial das lamelas secundárias, infiltração de células epiteliais, fusão lamelar e em alguns casos morte das células secretoras de muco devido a hipersecreção (LEONARDO et al., 2001 e TAKASHIMA & HIBIYA, 1995). Monteiro et al. (2008) relatam que modificações morfológicas branquiais, são comumente reconhecidas como resposta a alterações ambientais, estando estas ligadas a disfunções fisiológicas e do sistema endócrino, podendo variar devido a concentração iônica em que vivem (FERNANDES & PERNA-MARTINS 2001)

Segundo Arellano et al. (2001) os graus de alteração nos organismos/tecidos, como fígado e brânquias, estão diretamente relacionados com o tipo de poluente, bem como com sua concentração e rota de incorporação. Estes autores ainda relatam que muitos xenobiontes podem ser metabolizados, em taxas significantes, durante sua passagem pelo epitélio branquial.

Segundo Paulino e Fernandes (2011) alterações morfológicas nas brânquias podem representar estratégias adaptativas para a conservação de algumas funções biológicas, quando o animal está frente a mudanças de qualidade de água, entretanto qualquer alteração na estrutura da brânquia afeta, diretamente ou indiretamente, as trocas gasosas e o balanço hidromineral. Alterações histopatológicas têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores na avaliação da saúde de peixes frente à exposição a contaminantes, tanto em estudos de laboratório, quanto no campo (PAULINO & FERNANDES 2011). Segundo estes mesmos autores, sabe-se que a proliferação e a hipersecreção das células mucosas envolvidas com o sistema de defesa dos peixes frente ao agente exposto podem comprometer a função branquial. Dependendo da severidade do processo, a quantificação deste tipo celular pode ser considerada como indicadores de qualidade de água.

Segundo Camargo et al. (2009) as células de cloro são grandes e possuem como principal característica a presença de diversas mitocôndrias que atuam de forma a manter a homeostase corpórea nos teleósteos de água doce, que compensam sua perda iônica e o ganho de água por osmose, absorvendo de forma ativa  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^+$  através destas células. Segundo Silva et al. (2003) as células de cloro são responsáveis pelo balanço iônico entre a água e o plasma sanguíneo em peixes, sendo que alterações físico-químicas na água podem estimular a hipertrofia e hiperplasia deste tipo celular.

Atualmente observa-se a preocupação com os impactos gerados pelo despejo de poluentes em rios e lagos, principalmente de contaminantes oriundos do ambiente urbano. Com isso este trabalho objetivou identificar as alterações na morfologia das brânquias de duas espécies nativas de peixes brasileiras *Prochilodus lineatus* e *Astyanax altiparanae*, bem como no número de células de muco, de cloro e na presença de lisossomos, após a exposição a poluentes urbanos, estando em foco a contaminação por detergentes. Estas espécies foram escolhidas devido à grande distribuição dos gêneros no território sul-americano e por sua importância comercial.

## **2.3 – Metodologia**

### **2.3.1 - Experimentação**

Para a realização deste experimento 60 espécimes de cada uma das espécies testadas (*Prochilodus lineatus* e *Astyanax altiparanae*) foram obtidos no laboratório de reprodução de peixes do ICMBio/CEPTA – Pirassununga – SP – Brasil. Estes, foram padronizados quanto a idade, para que não houvessem diferenças relacionadas ao estágio de desenvolvimento, sendo



que o experimento foi iniciado com *P. lineatus* com 3 meses de vida e *A. altiparanae* com 4 meses de vida.

Estes indivíduos foram divididos em 3 tratamentos, sendo o primeiro o controle, tratado com água comprovadamente pura do poço artesiano da UNESP – Campus de Rio Claro; o segundo exposto a diluição de 1ppm de 10 marcas comerciais de detergentes biodegradáveis e o terceiro a água do Lago Azul – Rio Claro – SP – Brasil, este urbano e destino final de resíduos de casas, postos de gasolina e pequenas indústrias.

Foram efetuadas duas coletas, após 1 e 5 meses do início do experimento. Toda a experimentação foi realizada em duplicata para confirmação dos dados obtidos (Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico - UNIARARAS nº 646/2009).

### **2.3.2 – Coleta do material para as análises morfológicas**

Antes de se iniciar a coleta do material, os animais foram anestesiados em solução de benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada). Após a anestesia, em cada coleta foram sacrificados 6 indivíduos por grupo, os quais tiveram seus arcos branquiais retirados e fixados em solução de Bouin aquoso por 48 horas a 4°C. Posteriormente o material foi tamponado em solução de fosfato de sódio pH = 7,4, desidratado em concentrações crescentes de álcool, incluído em historesina Leica e seccionados no micrótomo Leica RM2245.

### **2.3.3 – Análises das alterações na morfologia braquial**

Para esta análise foram obtidos 5 cortes de 6µm cada, de cada indivíduo em estudo. Estes foram submetidos à reação de Hematoxilina e Eosina segundo Paulete & Beçak (1976). Em cada corte foram analisados 6 filamentos branquiais, em toda a sua extensão, identificando as alterações morfológicas observadas nas lamelas secundárias. Estas foram quantificadas e uma média para cada tratamento, nos dois períodos experimentais, foi obtida e os resultados analisados estatisticamente. Após a aplicação dos testes estatísticos, foram elaborados gráficos de porcentagem, para cada grupo em cada período de experimento, visando demonstrar qual tipo de modificação morfológica mostrou-se mais freqüente.

### **2.3.4 – Contagem das células de muco**

Quanto às células de muco, cortes de 6 µm foram obtidas, as quais foram submetidas à técnica de PAS segundo Paulete & Beçak (1976). Para cada indivíduo foram considerados 5 cortes, nos quais as células de muco presentes entre as lamelas secundárias de 6 filamentos

branquiais foram computadas. A partir dos resultados obtidos, obteve-se uma média para cada grupo, nos dois períodos de experimento, as quais foram comparadas estatisticamente.

### **2.3.5 – Contagem das células ricas em mitocôndrias**

As células ricas em mitocôndrias foram analisadas segundo Pereira & Caetano (2009), sendo que cortes de 7 $\mu$ m de espessura foram obtidos de cada espécime, os quais foram submetidos à técnica de Von Kossa. A análise de fragmentos mais espessos mostrou-se necessária, pois esta técnica exige a existência de mais substrato para reação. Foram analisados 6 filamentos de 5 cortes de cada indivíduo, enumerando as células de cloro presentes, no intervalo de 10 lamelas secundárias em cada filamento. Os dados obtidos foram convertidos em médias para cada grupo e analisadas estatisticamente.

### **2.3.6 – Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software BioEstat 5.0. Visando identificar variações entre os resultados, aplicou-se o teste de normalidade de Shapiro – Wilk, e posteriormente os testes de variância ANOVA/Tukey ou Kruskal-Wallis/Dunn, dependendo se os dados em questão eram paramétricos ou não paramétricos.

### **2.3.7 – Identificação de lisossomos**

Para esta análise 5 cortes de 7 $\mu$ m, foram obtidos, de cada indivíduo e submetidos à técnica adaptada de Gomori (1949).

### **2.3.8 – Análise química da água**

Para um melhor entendimento dos resultados obtidos, amostras das águas utilizadas nos 3 tratamentos foram enviadas ao Laboratório de Análise de Águas do Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas – UNESP – Campus de Rio Claro. Estas análises foram realizadas, seguindo as normas do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, para os parâmetros descritos abaixo:

Foi realizada a determinação de metais por ICP-AES para os elementos: Mg, Ca, Sr, Ba, Cr(t), Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Si, P(t) e Pb. Os ânions: F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>, acetato e oxalato mais os cátions Li, Na, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e K foram determinados por cromatografia Iônica. Foi realizada também a análise de pH, condutividade, alcalinidade total e carbonatos por titulação potenciométrica.

Apesar de termos utilizado uma concentração constante de detergente, mostrou-se necessária avaliação da real concentração do LAS – alquil benzeno sulfonato linear, principal componente dos detergentes domésticos. Para isso realizou-se análises cromatográficas no HPLC Agilent Technologies 1200 series, com detector de Fluorescência, na empresa Global Análise & Consultoria – São Carlos – SP – Brasil. O mesmo teste foi realizado para a água do lago urbano para se identificar a existência desta substância.

## **2.4 – Resultados**

### **2.4.1 – *Astyanax altiparanae***

#### **2.4.1.1 – Sobrevivência**

A mortalidade para esta espécie foi de zero para os 3 tratamentos durante todo o experimento.

#### **2.4.1.2 – Alterações morfológicas**

Foram encontradas basicamente 4 modalidades de modificações morfológicas: fusões lamelares, hipertrofia das células pavimentosas das lamelas secundárias, aneurismas e hiperplasia das células do epitélio do filamento branquial (Figura 1). Tanto os grupos tratados com a diluição de detergentes, quanto o exposto a água do lago, apresentaram maior incidência de fusões lamelares e aneurismas, para os dois períodos de experimento (Gráfico 1). Após a quantificação das alterações encontradas, observou-se diferenças significativas com  $p < 0,05$  para o teste de Kruskal-Wallis/Dunn, entre os dois grupos mantidos em contaminantes e o grupo controle (Tabela 1), pois estes apresentaram um número muito elevado de mudanças estruturais.

#### **2.4.1.3 – Análise das células de muco**

Ambos os grupos expostos a poluentes apresentaram grande quantidade de células de muco, com diferenças significativas sendo  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis/Dunn), em comparação ao controle em todo o período experimental (Tabela 1). Estas células foram encontradas tanto entre as lamelas secundárias quanto ao longo delas (Figura 2).

Além do aumento no número destas células, observou-se que algumas fusões entre lamelas de um mesmo filamento foram iniciadas pela junção de duas células de muco (Figura 2). Quando foram observadas fusões entre lamelas de dois filamentos adjacentes, um grande número deste tipo celular também foi encontrado.

#### **2.4.1.4 - Análise das ricas em mitocôndrias**

Em *A. altiparanae* as ricas em mitocôndrias apresentaram-se como células fortemente reativas a técnica de Von Kossa, com a presença de diversas granulações citoplasmáticas e em alguns casos com intensa reação perinuclear, o que conferiu ao núcleo uma reação intensa (Figura 3).

Quando quantificadas, estas células apresentaram reações antagônicas nos grupos expostos aos poluentes, comparados ao grupo controle. A diluição de detergentes gerou diminuição no número destas células, durante todo o experimento, enquanto a água do lago urbano elevou o número destas (tabela 1), ambas as análises com  $p < 0,05$  para o teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

#### **2.4.1.5 – Análise da presença de lisossomos**

Observou-se a presença de células epiteliais tanto no filamento branquial quanto nas lamelas secundárias com a presença de lisossomos no grupo controle, entretanto quanto analisados os grupos expostos, estas mesmas marcações não puderam ser observadas (Figura 4).

### **2.4.2 – *Prochilodus lineatus***

#### **2.4.2.1 – Sobrevivência**

Os indivíduos do grupo controle e os expostos a detergente, apresentaram taxa de mortalidade zero em todo o experimento, entretanto quando expostos a água do lago urbano, foi possível a realização de apenas uma coleta, pois após 35 dias, todos os indivíduos entraram em óbito.

#### **2.4.2.2 – Alterações morfológicas**

As mesmas alterações encontradas para *A. altiparanae* foram encontradas em *P. lineatus*, sendo que quando consideramos o número total de modificações estruturais o padrão encontrado para *A. altiparanae* que também se manteve (Figura 5), com  $p < 0,05$  para o teste de Kruskal-Wallis/Dunn (Tabela 2). Quando observadas separadamente, observou-se que os indivíduos expostos ao detergente, assim como ocorrido em *A. altiparanae*, apresentaram maior incidência de fusões lamelares e aneurismas (Gráfico 2). Entretanto, o grupo exposto à água do lago urbano, teve como modificações mais frequentes as fusões lamelares e a

hiperplasia das células epiteliais do filamento branquial, as quais em alguns casos cobriam todo o espaço entre as lamelas secundárias.

#### **2.4.2.3 – Análise das células de muco**

Os mesmos resultados encontrados para *A. altiparanae* foram encontrados em *P. lineatus* (Figura 2) com  $p < 0,05$  para o teste de Kruskal-Wallis/Dunn (Tabela 2).

#### **2.4.2.4 - Análise das ricas em mitocôndrias**

No caso das ricas em mitocôndrias ambos os grupos expostos aos poluentes apresentaram redução significativa em relação ao grupo controle com  $p < 0,01$  para o teste de ANOVA/Tukey (Tabela 2). Além de ocorrerem em menor número, estas células apresentaram-se hipertrofiadas nos tratamentos contaminados (Figura 3).

#### **2.4.2.5 – Análise da presença de lisossomos**

Os mesmos resultados descritos para *A. altiparanae* foram encontrados em *P. lineatus* (Figura 4).

#### **2.4.2.6 – Análise química da água**

Nossas análises químicas das águas em questão, evidenciaram que a concentração de LAS, na diluição de detergentes foi muito semelhante à encontrada no lago urbano, sendo estes valores 0,375 mg/L e 0,33 mg/L respectivamente. Quando comparadas com a água do grupo controle, pudemos observar níveis elevados de  $\text{NO}_2^-$ , Ni na diluição de detergentes e de Na, Fe,  $\text{F}^-$ , Cl<sup>-</sup> e  $\text{NO}_2^-$  na água do lago urbano.

### **2.5 – Discussão**

De acordo com Reis et al. (2009) antes de se observar uma lesão macroscopicamente, alterações na biologia das células e tecidos acontecem a fim de manter a homeostasia do animal e/ou prepará-lo, para se defender de uma situação que o ameace. Ainda segundo estes autores e Leonardo et al. (2001) as lamelas presentes nos filamentos branquiais são os locais onde ocorre a troca efetiva entre elementos químicos do sangue e da água, sobretudo, promovendo a hematose.

Diversos estudos, semelhantes a este, foram realizados identificando-se alterações morfológicas nas brânquias de peixes, após a exposição a poluentes e estes corroboram os

autores supracitados, evidenciando que tais modificações visam à manutenção da homeostasia do animal.

Nosso trabalho demonstrou que ambas as águas testadas são um complexo de contaminantes, sendo estes causadores de remodelagens morfológicas como fusões lamelares, hipertrofia e hiperplasia de células epiteliais, de muco e de cloro, em alguns casos de aneurismas. Estes resultados são corroborados por diversos autores como Arellano et al. (2001), após a exposição de *Sparus aurata* a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina, encontraram hiperplasia, hipertrofia e fusão lamelar, além de hiperplasia das células ricas em mitocôndrias; Cerqueira & Fernandes (2000), cujos testes com cobre em *Prochilodus scrofa*, pode-se identificar hipertrofia das células pavimentosas e das ricas em mitocôndrias, descolamento epitelial, fusão lamelar e aneurismas; Ortiz-Ordoñez et al. (2011), após a exposição de *Goodea atripinnis* a concentrações baixas de herbicidas, foram encontrados principalmente hemorragias e hipertrofia nas brânquias; Monteiro et al. (2008) em estudos com *Oreochromis niloticus* com diversas concentrações de cobre, evidenciaram a formação de aneurismas e hipertrofia celular; Mazon et al. (2002), demonstraram que a exposição de *P. scrofa* ao cobre levou a hipertrofia de células pavimentosas e de cloro, bem como a fusão lamelar.

Assim como nos trabalhos descritos acima, podemos também evidenciar que dependendo do contaminante e da espécie em estudo, as alterações morfológicas podem variar em incidência. Em nosso estudo identificamos que em ambos os tratamentos contaminados tanto a fusão lamelar quanto o aneurisma são mais frequentes, com exceção da exposição de *P. lineatus* a água do lago urbano, que levou a índices mais elevados de fusão lamelar e hipertrofia. Este último resultado é corroborado por Haaparanta et al. (1997), em peixes de quatro lagos na Alemanha.

De acordo com Amundsen et al. (2011), metais traços presentes na água podem entrar no corpo destes animais pelas brânquias ou pelo trato digestivo, sendo que a retenção de metais como o cobre, níquel e zinco são maiores no tecido branquial do que no fígado em peixes. Segundo Baraj et al. (2011), a presença de uma mistura de metais, mesmo estes sendo competidores, resultam em uma maior concentração destes elementos nas brânquias. Domingos et al. (2006) relataram que alguns metais pesados como ferro, cobre, zinco e cobalto, são considerados elementos essenciais aos processos biológicos, mas podem ser tóxicos quando em concentrações mais elevadas, sendo que a atividade industrial de mineração, processamento de metais e geração de despejos industriais e domésticos vem contribuindo para o aumento da concentração de diversos metais pesados nos ambientes

naturais. Esta idéia é corroborada por Todd et al. (2010), que mostram que o impacto de poluentes na fauna marinha, apesar de já termos o conhecimento dos efeitos de poluentes isolados na fauna, a mistura de contaminantes é uma preocupação mundial e seus resultados devem ser levados em consideração.

As análises químicas das águas aqui testadas demonstraram a presença de metais pesados, nos tratamentos contaminados, sendo estes o ferro e o níquel, no lago e no detergente sucessivamente. Estes elementos por si só, nas concentrações encontradas já poderiam gerar as alterações evidenciadas; entretanto seus efeitos foram combinados com os de outros elementos como cloro, flúor, nitrito e o surfactante LAS. Diversos estudos referentes a ação de metais em peixes já foram realizados, como Pane et al. (2004), os quais realizaram testes com alumínio; Camargo et al. (2009), também com este elemento; Franchini et al. (1999), em testes com chumbo, entretanto seus efeitos combinados com outros elementos ainda são raros na literatura.

Quanto aos efeitos do LAS em brânquias, poucos estudos foram realizados, sendo que em sua grande maioria concentrados entre as décadas de 60 e 80. De acordo com Misra et al. (1985), a exposição ao LAS de peixes da espécie *Cirrhina mrigala* evidenciaram fusão lamelar e proliferação de células de muco; Abel & Skidmore (1975), demonstraram que em trutas expostas a detergente, apresentaram proliferação das células ricas em mitocôndrias, bem como hipertrofia celular e Roy (1988) também encontrou variação na quantidade de células de muco em *Rita rifa* após a exposição a este mesmo poluente. Nossos resultados também evidenciaram a proliferação das células de muco, entretanto identificamos a grande incidência de aneurismas, que não foram demonstrados em trabalhos anteriores. Isto se deve a presença do níquel, que potencializou os danos gerados, tendo em vista que Brown et al. (1968), demonstraram que em trutas quanto expostas a uma mistura de metais com detergentes, os efeitos eram potencializados, quando comparados com os mesmos dos poluentes separados. Apesar da presença de LAS, em concentrações muito semelhantes, tanto na diluição como na água do lago urbano, algumas diferenças nos resultados foram encontradas, isto se deve a diversidade de contaminantes presentes em cada amostra que em associação com o LAS podem produzir efeitos diversos.

Segundo Paulino & Fernandes (2011) a hipertrofia do epitélio lamelar, assim como a proliferação de células ricas em mitocôndrias ou mucosas, são exemplos de mecanismos de defesa contra o agente tóxico, impedindo que o agente entre no organismo, entretanto, esses mecanismos aumentam a distância água-sangue e podem dificultar a efetividade das trocas gasosas. Este trabalho, bem como os descritos anteriormente, concordam que as fusões

lamelares, são formadas para isolar mecanicamente o sangue da água, aumentando a distância entre eles. Entretanto, nossos resultados indicam que em alguns casos estas fusões também podem exercer um papel de proteção química, tendo em vista a formação destas modificações, por fusão e proliferação de células de muco.

De acordo com Reis et al. (2009) a superfície das brânquias de peixes é coberta por um muco, que contribui para proteção do animal quanto às flutuações dos parâmetros físicos, químicos e biológicos do ambiente aquático. Esta forma de proteção pode ser avaliada através do número das células produtoras das glicoproteínas (mucinas) que compõem este muco, assim como, pela análise das características químicas de seus componentes (REIS et al. 2009). Para estes autores a proliferação e hipersecreção das células mucosas nas brânquias frente a situações de estresse, podem ser compreendidas como um mecanismo de defesa em função de uma resposta defensiva crônica, entretanto, pode comprometer a função branquial dependendo da severidade do processo (REIS et al. 2009), afirmação corroborada por Domingos et al. (2006). A proliferação de células de muco encontrada no presente trabalho indica que ambos os complexos de contaminantes, geraram hipersecreção nas brânquias das espécies testadas. Este evento foi gerado para a defesa química, juntamente com as modificações estruturais ocorridas no filamento e nas lamelas e que acabam por não só isolar o agente contaminante, como também dificulta a passagem de oxigênio para o sangue.

Segundo Perry (1997), vários estudos sugerem que as células ricas em mitocôndrias são os sítios ativos da regulação do transporte de íons em peixes marinhos e de água doce. Esta regulação, sobretudo em peixes marinhos pode representar uma parcela substancial do orçamento energético, devido à hidrólise de ATP pelos vários transportadores íon-ATPases. Estes incluem  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPase de alta afinidade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e, talvez, o mal-definido  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$  - ATPase. Em condições iônicas desfavoráveis ou em contato com agentes tóxicos, ocorre a proliferação das células ricas em mitocôndrias nos filamentos e na superfície lamelar da brânquia (PERRY, 1997). De acordo com Perry & Walsh (1989), as células ricas em mitocôndrias possuem taxa metabólica mais elevada do que a encontrada nas outras células da brânquia e ainda que a taxa metabólica do restante da brânquia afeta diretamente na população de células de cloro, podendo gerar a proliferação das mesmas. Alberto et al. (2005) demonstraram que em peixes da espécie *Astyanax fasciatus*, coletados em rios com despejo de esgoto, apresentavam elevação na densidade de células de cloro, visando a otimização da ionregulação, entretanto tais variações diminuem a capacidade de absorção de oxigênio, pois elevam a distância entre o sangue e a água. Nossos resultados demonstraram que no caso da diluição de detergente independentemente da espécie o número de células



ricas em mitocôndrias sempre diminuía, e no caso da exposição à água do lago, em *A. altiparanae* elas proliferaram e em *P. lineatus*, reduziram em número. Estes dados evidenciam que os contaminantes afetam diretamente a regulação iônica, e quando geram proliferação celular, dificultam a absorção de oxigênio.

Christine et al. (2012), descreveram que os lisossomos responsáveis pela digestão e metabolização, principalmente de componentes intracelulares, ou seja atuam na reciclagem celular. Entretanto atuam também na metabolização de componentes externos absorvidos pela célula. Gernhöfer et al. (2001), em estudos realizados em rios da Alemanha, encontraram fusão lamelar, proliferação de células de muco e das ricas em mitocôndrias e proliferação lisossomal em brânquias. Tendo em vista a ação de digestão de materiais estranhos absorvidos pela célula, deveríamos encontrar a proliferação de lisossomos em nosso experimento, assim como descrito pelo autor supracitado. Entretanto o que foi evidenciado é que os poluentes testados inibem a formação destas estruturas. Isto acarreta em uma disfunção metabólica grave, pois impede que organelas e estruturas defeituosas sejam recicladas e com isso, estes elementos se acumulam no citoplasma e podem gerar não só problemas fisiológicos, como também acarretar na morte celular.

Apesar de termos encontrado variações de pH, entre as amostras, todos os resultados descritos podem ser atribuídos aos poluentes, tendo em vista que de acordo com Camargo et al. (2009) pHs entre 5 e 9 não são letais para peixes neotropias, sendo que valores entre 6 e 9 são considerados ideais.

## **2.6 – Conclusões**

Este estudo mostra claramente que os detergentes biodegradáveis são poluentes que podem gerar diversas alterações morfológicas nas brânquias de peixes, e que quando combinados a outras substâncias, como ocorre na natureza, otimizam seus efeitos, agravando ainda mais os danos na fauna de rios e lagos urbanos.

## **2.7 – Bibliografia**

ABEL, P. D. **Water pollution biology**. Chichester: Ellis Howood. 328p. 1989.

ABEL, P. D., et al. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 61, n. 2, p. 247-255, 2005.

AMUNDSEN, P. A., et al. Heavy metal contents in whitefish (*Coregonus lavaretus*) along a pollution gradient in a subarctic watercourse. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 182, p. 301-316, 2011.

ARELLANO, J. M., et al. Histopathological alterations and induction of cytochrome P-450 1A in the liver and gills of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. **The Histochemical Journal**. v. 33, p. 663-674, 2001.

BARAJ, B., et al. Assessing the effects of Cu, Cd, and exposure period on metallothionein production in gills of the Brazilian brown mussel *Perna perna* by using factorial design." **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 179, p. 155-162, 2011.

BROWN, V. M., MITROVLC, V. V., STARK, G. T. C.. Effects of chronic exposure to zinc on toxicity of a mixture of detergent and zinc. **Water Research**. v. 2, p. 255-263, 1968.

CAMARGO, M. M., FERNANDES, M. N., MARTINEZ, C. B.. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**. v. 94, n. 1, p. 40-46, 2009.

CERQUEIRA, C. C., FERNANDES, M. N.. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 52, n. 2, p. 83-91, 2000.

DOMINGOS, F. X. V., ASSIS, H. C. S., RIBEIRO, C. A. O.. **Biomarcadores De Contaminação Ambiental Em Peixes E Ostras De Três Estuários Brasileiros E Cinética De Derivados Solúveis Do Petróleo Em Peixes**. Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. 130p. 2006.

FERNANDES, M. N., PERNA-MARTINS, S. A.. Epithelial Gill Cells In The Armored Catfish, *Hypostomus* CF. plecostomus (LORICARIIDAE). **Revista Brasileira de Biologia**. v. 61, n. 1, p. 69-78, 2001.

FRANCHINI, A., REBECCHI, B., FANTIN, A. M. B.. Gill endocrine cells in the goldfish *Carassius carassius* var. *auratus* and their impairment following experimental lead intoxication. **The Histochemical Journal**. v. 31, p. 559– 564, 1999.

GERNHÖFER, M., et al. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**. v. 8, p.241–260, 2001.

GOMORI, G.. An Improved Histochemical Technic For Acid Phosphatase. **Stain Technology**. v. 25, n. 2, p. 81-85, 1949.

HAAPARANTA , A., VALTONEN, E. T., HOFFMANN, R. W.. Gill anomalies of perch and roach from four lakes differing in water quality. **Journal of Fish Biology**. v. 50, p. 575–591, 1997.

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. London: Chapman & Hall, p. 124-125. (Fish and fisheries series, 16). 1995.

LEONARDO, J. M. L. O., et al. Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum**. v. 23, n. 4, p. 863-870, 2001.

MALICDAN, C. M. V., NISHINO, I. Autophagy in Lysosomal Myopathies. **Brain Pathology**. v. 22. p. 82–88, 2012.

MAZON, A. F., CERQUEIRA, C. C., FERNANDES, M. N.. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research**. v. 88, n. 1, p. 52-63, 2002.

MISRA, V., LAL, H., CHAWLA, G., VISWANATHAN, P. N.. Pathomorphological Changes in Gills of Fish Fingerlings (*Cirrhina mrigala*) by Linear Alkyl Benzene Sulfonate. **ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY**. v. 10, p. 302-308, 1985.

MONTEIRO, S. M., et al. Quantitative histopathology of *Oreochromis niloticus* gills after copper exposure. **Journal of Fish Biology**. v. 73, n. 6, p. 1376-1392, 2008.

OGELEKA, D. F., EZEMONYE, L. I., OKIEIMEN, F. E.. The toxicity of a synthetic industrial detergent and a corrosion inhibitor to brackish water fish (*Tilapia guineensis*). **Turk Journal of Biology**. v. 35, p. 161-166, 2011.

ORTIZ-ORDONEZ, E., et al. Effect of Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 61, n. 3, p. 443-452, 2011.

PANE, E.F., HAQUE, A., WOOD, C.M.. Mechanistic analysis of acute, Ninduced respiratory toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an exclusively branchial phenomenon. **Aquat. Toxicol.** v. 69, p. 11-24, 2004.

PAULINO, M.G., FERNANDES, M. N.. **Efeito da exposição a atrazina nas brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus*, (Teleósteo, Prochilodontidae)**. Dissertação de mestrado entregue ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos. 118p. 2011.

PAULETE, J.; BEÇAK, W. **Técnicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, 2 Vols. 1976.

PEREIRA, B. F., CAETANO, F. H.. Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish. **Micron**. v. 40, n. 8, p. 783-786, 2009.

PERRY, S. F. The Chloride Cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. **Annual Review of Physiology**. v. 59, p. 325-347, 1997.

PERRY, S.F.; WALSH, P.J.. Metabolism of isolated fish gill cells: Contribution of epithelial chloride cells. **The Journal of Experimental Biology**. n.144, p.507-520, 1989 .

REIS, A. B., et al. Alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) causadas por mudanças do ambiente aquático em tanques de cultivo intensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n. 4, p. 303-311, 2009.

ROY, D.. Statistical Analysis of Anionic Detergent-Induced Changes in the Goblet Mucous Cells of Opercular Epidermis and Gill Epithelium of *Rita rifa* (Ham.) (Bagridae: Pisces). **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 15, p. 260-271, 1988.

SILVA, L. D., et al. Análise morfométrica das células de cloro de *Poecilia vivipara* expostas a frações da folha e da casca do caule de *Caryocar brasiliensis*. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**. v. 25, n. 1, p. 195-201, 2003.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. (Ed.). **An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features**. 2.ed. Tokio: Kodanska, 1995.

TODD, P. A., ONG, X., CHOU, L. M.. Impacts of pollution on marine life in Southeast Asia. **Biodivers Conserv**. v. 19, p. 1063–108, 2010.

## 2.8 – Tabelas

	Controle		Detergente				Lago Azul			
	1º mês	5º mês	1º mês		5º mês		1º mês		5º mês	
			Média	p	Média	p	Média	p	Média	p
Células de Muco	0.6600 (S-1.3940)	0.9200 (S-1.5097)	14.8800 (S-6.0496)	< 0.05	8.7200 (S-9.9715)	< 0.05	24.7800 (S-7.0285)	< 0.05	32.9400 (S-10.2189)	< 0.05
Células Ricas em Mitocôndrias	11.7000 (S-3.1200)	11.4667 (S-2.5962)	1.7333 (S-1.4840)	< 0.05	2.1333 (S-2.1613)	< 0.05	23.4839 (S-7.5448)	< 0.05	25.5667 (S-7.0500)	< 0.05
Alterações morfológicas	1.0000 (S-1.1952)	1.2500 (S-1.5811)	22.5000 (S-6.3920)	< 0.05	16.7500 (S-5.1478)	< 0.05	45.5000 (S-7.7644)	< 0.05	27.8750 (S-5.5918)	< 0.05

Tabela 1: Médias das células de muco, ricas em mitocôndrias e das alterações totais encontradas nas brânquias da espécie *Astyanax altiparanae*. Note a elevação no número de células de muco e das alterações morfológicas nos grupos expostos ao detergente e a água do lago urbano, em comparação com o controle, bem como a diminuição das células ricas em mitocôndrias no grupo exposto o detergente e a elevação deste parâmetro no exposto a água do lago, durante todo o experimento.

S – desvio padrão

	Controle		Detergente				Lago Azul			
	1º mês	5º mês	1º mês		5º mês		1º mês		5º mês	
			Média	p	Média	p	Média	p	Média	p
Células de Muco	1.2600 (S-2.0184)	1.1800 (S-1.3656)	16.4400 (S-12.4968)	< 0.05	18.5400 (S-16.8186)	< 0.05	30.6800 (S-9.4187)	< 0.05		
Células Ricas em Mitocôndrias	9.2667 (S-1.3629)	9.6667 (S-1.6678)	1.6667 (S-1.2910)	< 0.01	1.2667 (S-1.3113)	< 0.01	3.5333 (S-0.5074)	< 0.01		
Alterações morfológicas	1.0000 (S-1.0000)	1.5000 (S-1.4142)	28.1250 (S-7.0394)	< 0.05	22.7500 (S-7.6298)	< 0.05	36.7500 (S-11.3232)	< 0.05		

Tabela 2: Médias das células de muco, ricas em mitocôndrias e das alterações totais encontradas nas brânquias da espécie *Prochilodus lineatus*. Note a elevação no número de células de muco e das alterações morfológicas nos grupos expostos ao detergente e a água do lago urbano, em comparação com o controle, bem como a diminuição das células ricas em mitocôndrias nestes mesmos grupos.

S – desvio padrão

	Controle	Detergente	Lago Azul
<b>pH</b>	<b>5,39</b>	<b>6,04</b>	<b>7,17</b>
<b>Condutividade</b> ( $\mu\text{S/cm}$ )	<b>282</b>	<b>237</b>	<b>179</b>
<b>Na (mg/L)</b>	<b>8,56</b>	<b>5,56</b>	<b>16,7</b>
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg/L)</b>	<b>&lt;0,04</b>	<b>1,15</b>	<b>0,86</b>
<b>Ni (mg/L)</b>	<b>&lt; 0,010</b>	<b>0,066</b>	<b>&lt; 0,010</b>
<b>F<sup>-</sup> (mg/L)</b>	<b>0,25</b>	<b>0,23</b>	<b>0,40</b>
<b>Cl<sup>-</sup> (mg/L)</b>	<b>8,56</b>	<b>5,56</b>	<b>16,7</b>
<b>Fe (mg/L)</b>	<b>0,021</b>	<b>0,029</b>	<b>0,16</b>

Tabela 3: principais alterações nas águas com diluição de detergente e do Lago Azul. Note que as principais diferenças em comparação com o grupo controle encontram-se destacadas em negrito.



## 2.9 – Imagens

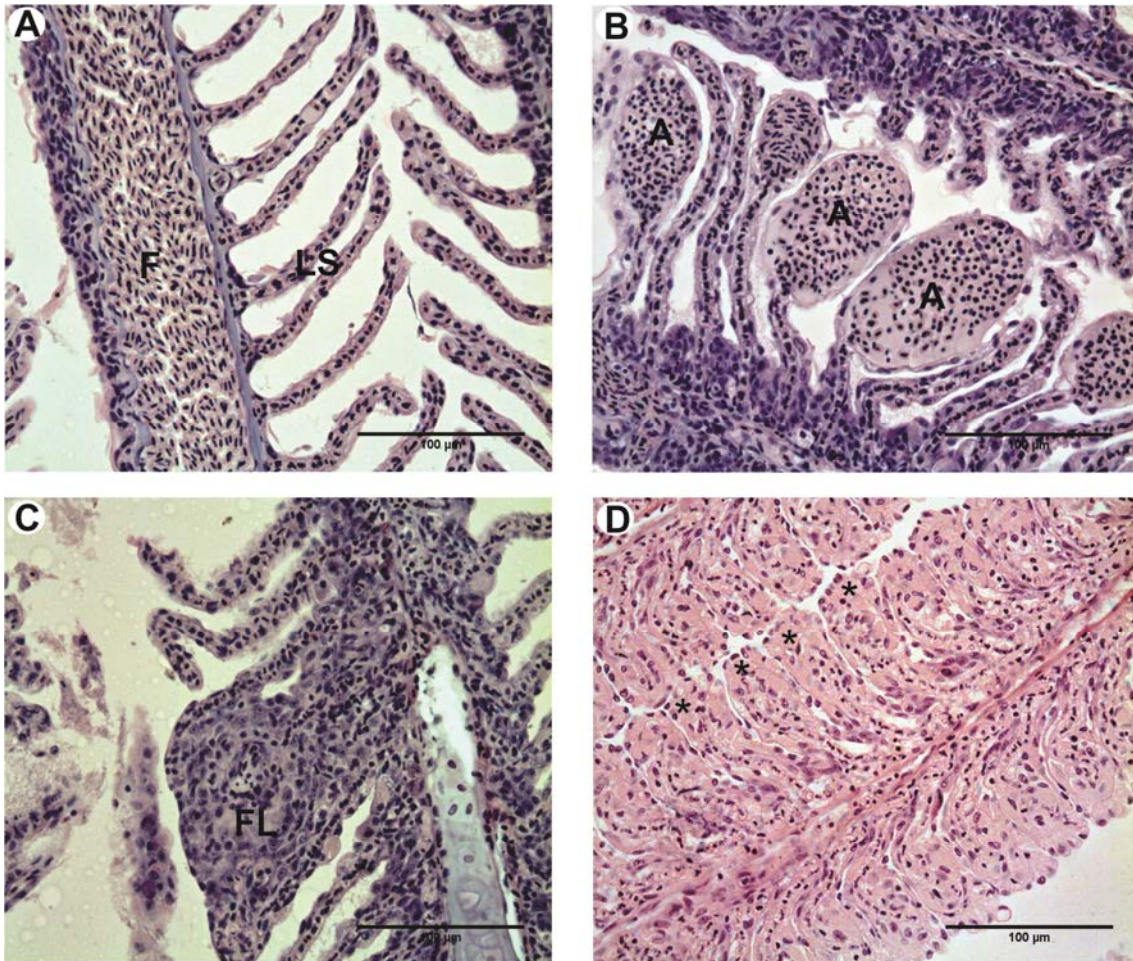


Figura 1: A - Morfologia normal da brânquia de *A. altiparanae*, evidenciando o filamento branquial (F) e as lamelas secundárias (LS), sem qualquer modificação morfológica; B - Brânquia de *A. altiparanae*, apresentando aneurismas (A) nas lamelas secundárias; C - Brânquia de *A. altiparanae*, apresentando fusão lamelar (FL); D - Brânquia de *A. altiparanae*, apresentando hipertrofia nas células pavimentosas das lamelas secundárias, note a dilatação citoplasmática (\*). Técnica: H-E.

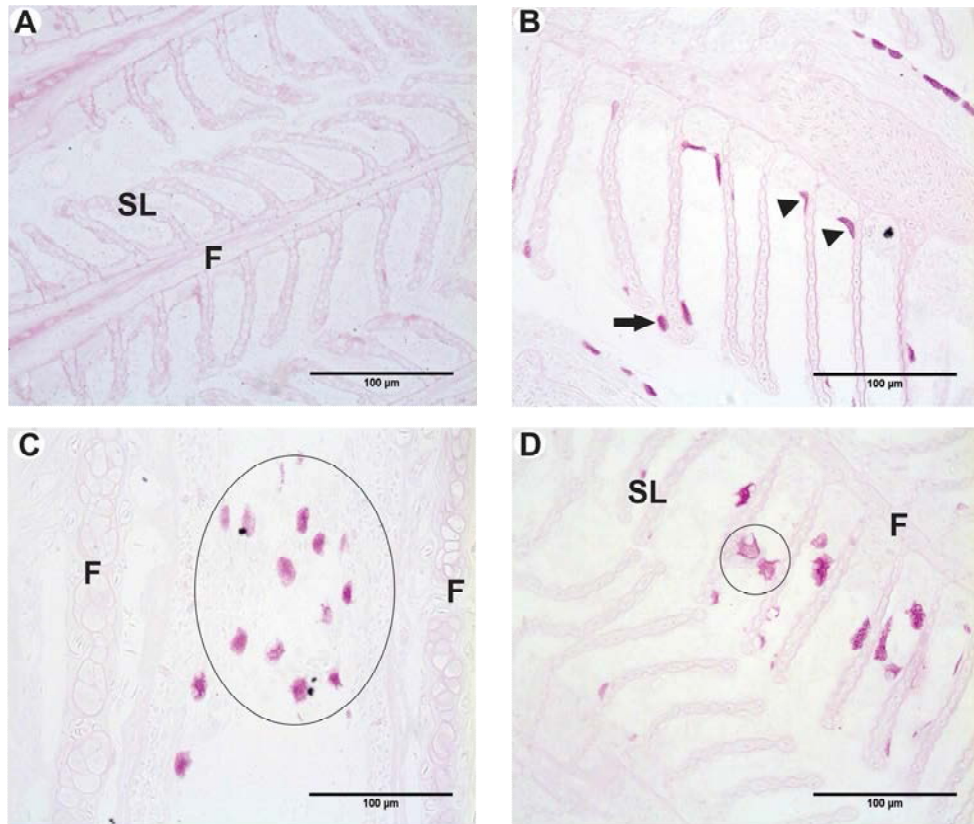


Figura 2: A - Aspecto normal da brânquia de *A. altiparanae*, note a ausência de marcações nas lamelas secundárias ; B - Aspecto da brânquia de *A. altiparanae*, após a exposição a poluentes note a presença de células de muco nas lamelas secundárias (seta) e entre elas (cabeça de seta); C - Fusão entre lamelas de dois filamentos branquiais (área em destaque), de indivíduos expostos a contaminantes, note a presença de diversas células de muco; D - Início da fusão entre duas lamelas adjacentes, note que o processo se inicia com duas células de muco. F - filamento branquial; LS - lamela secundária  
Obs: este mesmo padrão é encontrado para *P. lineatus*.



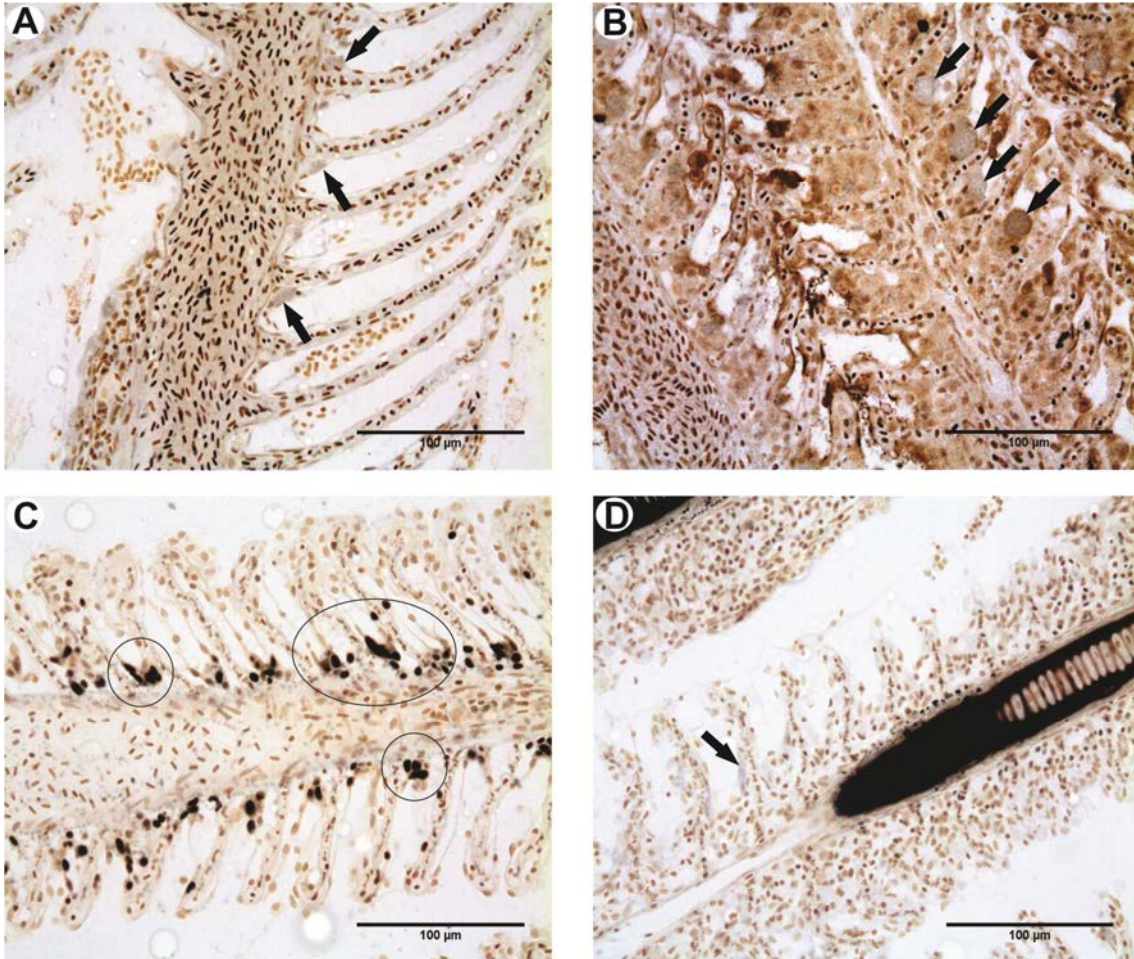


Figura 3: A - Aspecto geral da brânquia de *A. altiparanae*, note as ricas em mitocôndrias (seta). Este mesmo padrão foi encontrado no controle de *P. lineatus*; B - Brânqui de *P. lineatus* exposto aos poluentes, note as células ricas em mitocôndrias hipertrofiadas (seta); C - Brânquia de *A. altiparanae* exposto a água do lago urbano, note a grande proliferação de células ricas em mitocôndrias (áreas marcadas); D - Brânquia de *A. altiparanae* exposto a diluição de detergente, note o baixo número de marcações para células ricas em mitocôndrias (seta). Técnica: Von kossa.

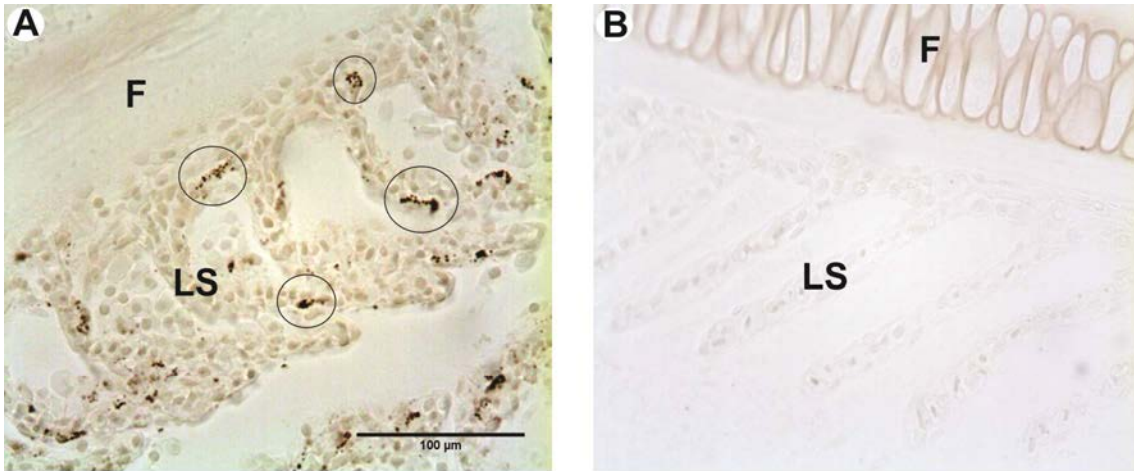


Figura 4: A - Aspecto geral da brânquia de *A. altiparanae*, note as marcações para lisossomo em destaque. Este mesmo padrão foi encontrado no controle de *P. lineatus*; B - Brânqui de *A. altiparanae* após a exposição a diluição de detergente, note a ausência de marcações, mesmo padrão encontrado para a exposição a água do lago e para os mesmos tratamentos em *P. lineatus*. Técnica: Gomori.



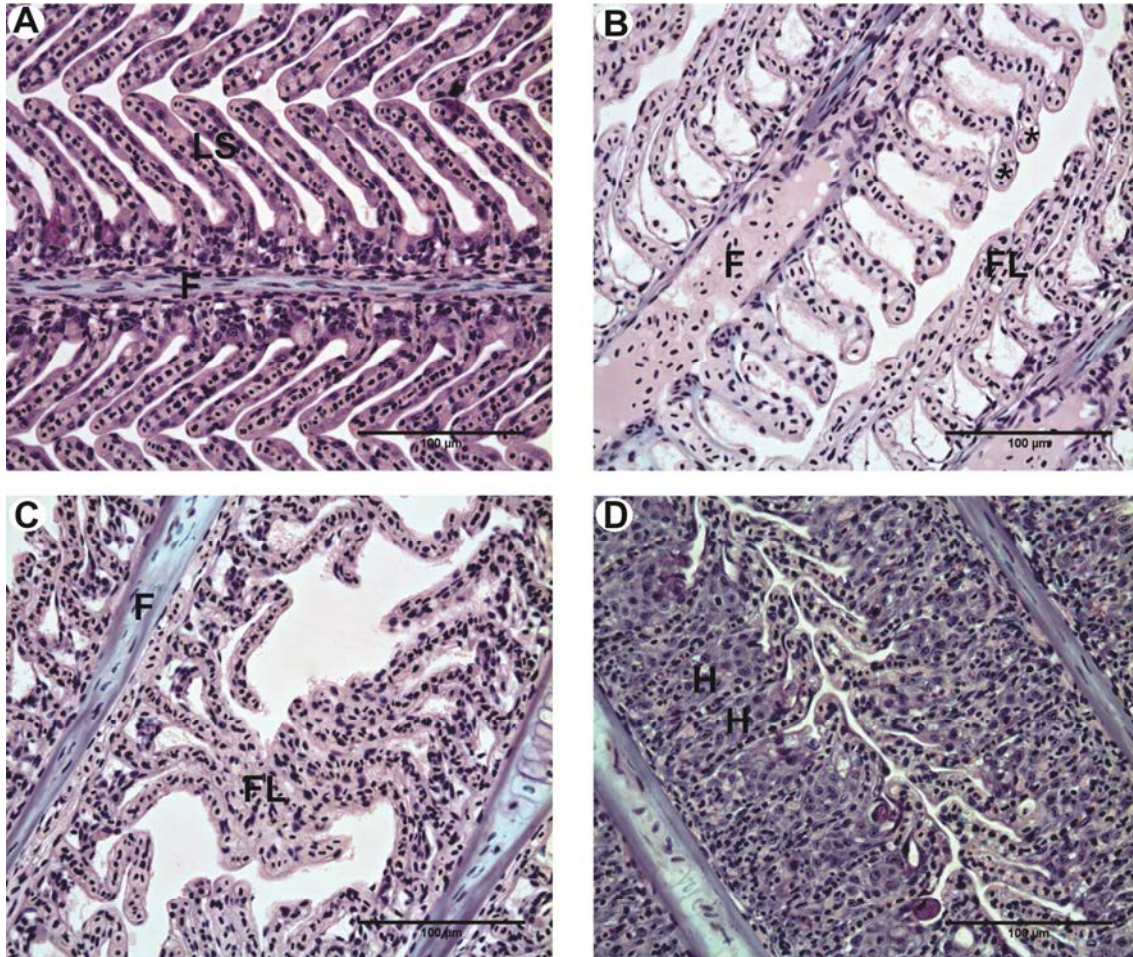


Figura 5: A - Morfologia normal da brânquia de *P. lineatus*, evidenciando o filamento branquial (F) e as lamelas secundárias (LS), sem qualquer modificação morfológica; B - Brânquia de *P. lineatus*, apresentando aneurismas (\*) nas lamelas secundárias e fusões lamelares de lamelas adjacentes (FL); C - Brânquia de *P. lineatus*, apresentando fusão lamelar entre lamelas de filamentos diferentes (FL); D - Brânquia de *P. lineatus*, apresentando hiperplasia das células pavimentosas (H). Técnica: H-E.

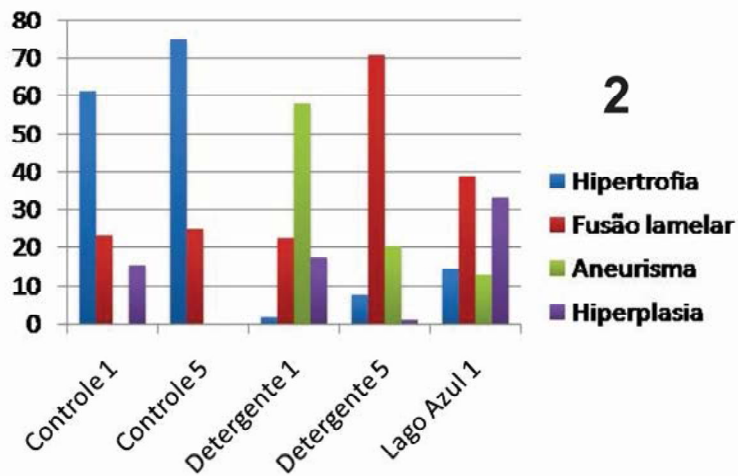
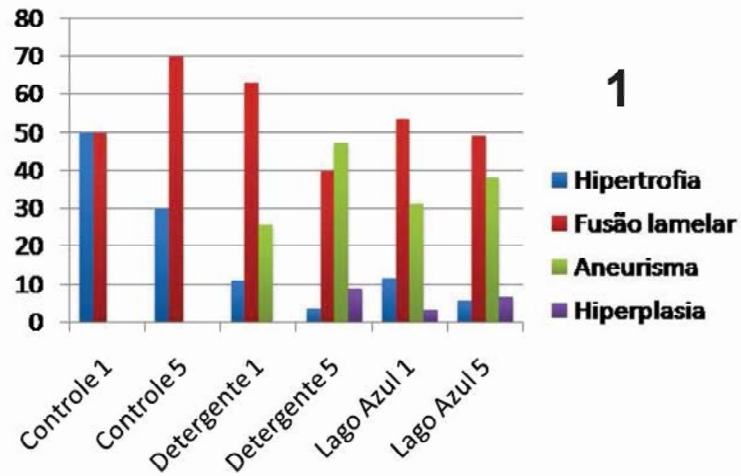


Gráfico 1: Frequência das alterações morfológicas, em porcentagem, na espécie *Astyanax altiparanae*. Gráfico 2: Frequência das alterações morfológicas, em porcentagem, na espécie *Prochilodus lineatus*. Os números 1 e 5 presentes juntamente aos nomes de cada grupo, representam os meses de coleta.

### CAPÍTULO 3

Acúmulo de lipofuscina em resposta à exposição a detergentes biodegradáveis e poluentes aquáticos nas brânquias e fígado de *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus*

### 3.1 – Resumo

Atualmente podemos identificar a crescente preocupação tanto da população como de governos em identificar os efeitos de substâncias usualmente despejadas em rios e lagos na fauna e flora aquática. Deste modo, este trabalho visou testar os efeitos de detergentes biodegradáveis e da água de um lago urbano, nas brânquias e fígado de duas espécies de peixes neotropicais de grande importância econômica *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus*. Para isto foi utilizado como bioindicador a lipofuscina, também chamada de pigmento do envelhecimento. Observou-se com 1 e 5 meses de experimento o acúmulo deste pigmento em ambos os tecidos. Discute-se estes dados sob o ponto de vista fisiológico relacionado com a peroxidação lipídica e danos mitocondriais.

### 3.2 – Introdução

Segundo Arking (2008), a teoria do acúmulo de resíduos propõe que o envelhecimento celular é causado pela aglomeração de produtos residuais intracelulares que não podem ser destruídos ou eliminados exceto por meio do processo de divisão celular. Já é de conhecimento geral que as células pós-mitóticas, tal como os neurônios e as células do músculo cardíaco, durante o envelhecimento acumulam grânulos citoplasmáticos de cor marrom amarelada, ricos em lipídios e com forma irregular. De acordo com o autor supracitado esses grânulos de lipofuscina foram observados pela primeira vez em 1842, da possibilidade de uma relação entre o envelhecimento e o seu acúmulo foi discutido já em 1886. Numerosos estudos foram realizados desde então em um esforço para compreender os mecanismos responsáveis pela formação da lipofuscina e esclarecer seu papel no processo de envelhecimento.

Segundo Silva & Silva (2005), Scbutt et al (2003), Kishi et. al. (2008) a lipofuscina, é um produto da peroxidação lipídica e uma evidência de lesão oxidativa. Ela é o produto final resultante da glicosilação não-enzimática celular e por degradação incompleta de mitocôndrias danificadas, que não podem ser degradados pelas hidrolases lisossomais nem ser exocitadas. Acumulando-se ao longo do tempo nas células pós-mitóticas, estes resíduos não são degradados durante a divisão celular e podem resultar no aparecimento de doenças. Segundo Terman & Brunk (1998) os materiais formadores dos grânulos de lipofuscina são inicialmente seqüestrados por um autofagossomo. De acordo com Terman & Brunk (1998) e Kodama et al (2005) estas estruturas geralmente são circundadas por duas membranas e não possuem enzimas lisossomais, porém de acordo com Peixoto et al (2002) estes,



posteriormente, fundem-se a um lisossomo primário ou secundário. Tanto os precursores da lipofuscina quanto suas formas finais, englobadas por vesículas lisossomais, assim como descrito por Terzibazi et al (2008), podem ser encontrados em diversos organismos e possuem uma característica marcante que é a autofluorescência.

De acordo com Pinto et al (2010), o aumento da quantidade de poluentes despejados em ambientes aquáticos, reforçam a importância do monitoramento químico e biológico desses ecossistemas. Ainda segundo este mesmo autor o uso de biomarcadores tornou-se uma ferramenta para tal avaliação. Assim como descrito por Viarengo et al (2007) uma gama de testes baseados em biomarcadores de estresse tem sido utilizados para identificar os efeitos de poluentes em organismos aquáticos. Segundo estes mesmos autores, estes marcadores revelaram alterações em diversos parâmetros, como por exemplo a estabilidade da membrana lisossomal, conteúdo lipídico e a presença de lipofuscina nas células.

Grande parte dos poluentes despejados em ambientes aquáticos são comprovadamente formadores de radicais livres nas células. Estes radicais são geralmente combatidos e eliminados por elementos antioxidantes produzidos pela própria célula. De acordo com Cajaraville et al (2003) diversos estudos confirmam que peixes e moluscos são sensíveis a tais contaminantes. Alguns destes poluentes podem causar proliferação de peroxissomos, os quais carregam enzimas antioxidantes, responsáveis pela limpeza de diversos radicais livres.

Os peixes dos gêneros *Astyanax* e *Prochilodus*, encontram-se amplamente distribuídos nas bacias sul-americanas e possuem grande valor não só ecológico como financeiro, tendo em vista seu uso alimentício para diversas populações. Por serem encontrados em quase todo o território brasileiro, estes gêneros tem sido utilizados como bioindicadores de rios e lagos.

Considerando a atual preocupação com os impactos antropogênicos na fauna aquática, este estudo objetivou utilizar a lipofuscina como marcador de estresse ambiental. Para isso foi analisado os efeitos de ambientes perturbados no acúmulo desta substância em peixes nativos para com isso entender melhor a extensão dos danos causados por contaminantes aos peixes neotropicais.

### **3.3 – Metodologia**

#### **3.3.1 – Experimentação**

De acordo com Couillard & Hodson (1996) a proliferação de macrófagos está associada a eventos naturais como envelhecimento, jejum, mas também pode ser induzida pela exposição a poluentes. Diversos estudos relataram não só a proliferação de tais células,

como também o acúmulo de pigmentos, entretanto não levaram em consideração a idade dos espécimes em estudo. Grande parte dos estudos encontrados na literatura abordam o acúmulo de lipofuscina relacionado com o envelhecimento. Entretanto, quando se trata da exposição a poluentes, quando este parâmetro é levado em consideração, o fator idade em geral é negligenciado. Com isso, para que não ocorressem erros relacionados com a variação etária dos espécimes, a idade dos foi padronizada, iniciando-se o experimento após 4 meses de vida para a espécie *Astyanax altiparanae* e 2 meses para *Prochilodus lineatus*, idade na qual as espécies já apresentam tamanho corpóreo ideal, 12 cm, para coleta dos dados.

Para isso realizou-se a reprodução de matrizes de *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus* no laboratório de reprodução de peixes do ICMBio/CEPTA – Pirassununga – SP – Brasil. Desta, foram coletados 60 indivíduos, de cada espécie, os quais foram divididos em 3 grupos. O primeiro, utilizado como controle, foi exposto à água do poço artesiano da UNESP – Campus de Rio Claro; o segundo a uma diluição de 10 diferentes marcas comerciais de detergentes biodegradáveis a uma concentração de 1ppm; o terceiro grupo foi mantido na água do Lago Azul (lago urbano) – Rio Claro – SP – Brasil, comprovadamente poluído por resíduos de residências, postos de gasolina e pequenas indústrias. Este lago foi utilizado como caracterização de um ambiente extremamente antropomorfizado, podendo, portanto ser extrapolado para outros se situação semelhante.

O experimento teve duração de 5 meses, sendo realizadas duas coletas, a primeira após 1 mês e a última ao final do experimento. Durante toda a experimentação a oxigenação e a temperatura de 24°C foram controladas e mantidas idênticas para todos os grupos.

Todo o experimento foi replicado para garantir a validade dos resultados obtidos (Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico - UNIARARAS nº646/2009).

### **3.3.2 – Identificação histológica da lipofuscina**

De acordo com Kodama et al (2006) diversos métodos para a quantificação de lipofuscina já foram utilizados, entretanto o método mais confiável é o da microscopia baseada em fluorescência. Isto se deve ao fato de apesar da lipofuscina apresentar coloração marrom - amarelada, em técnicas de histologia e histoquímica como Hematoxilina – Eosina e a técnica do Ácido Periódico de Schiff (PAS), diversas outras substâncias presentes nos tecidos podem ser marcadas de forma semelhante. Segundo Couillard & Hodson (1996) e Jordanova et al (2008), acúmulos de macrófagos pigmentados são comuns no fígado, baço, rim e ocasionalmente em outros órgãos de peixes, sendo uma das variações mais comuns que ocorre no fígado destes animais, inclusive durante seu ciclo reprodutivo. Estes contêm basicamente

quatro tipos de pigmentos: a melanina, a lipofuscina, ceroides, e hemociderina, os quais também podem ser encontrados em hepatócitos e outras células e formam agregados de coloração semelhante à lipofuscina, o que impede sua precisa identificação por técnicas histoquímicas. Por ser o único pigmento dentre os citados que apresenta autofluorescência, sua precisa identificação só pode ser realizada através de análises usando este princípio.

Com isso em cada coleta foram sacrificados 6 indivíduos de cada grupo e de cada espécie. Os animais foram anestesiados em solução de benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada) antes do sacrifício. Fragmentos de brânquia e fígado de cada espécime foram retirados, fixados em formalina 10% segundo Junqueira & Junqueira (1983), desidratados em álcool e incluídos em Paraplast Sigma. Foram obtidos cortes de 7  $\mu$ m, no micrótomo Leica RM2245, os quais foram montados em Entellan e observados sob o microscópio de fluorescência Olympus – BX51. Analisados e fotografados no software DP – Controller, sob o filtro de luz de 450 – 490 nm, segundo Peixoto et. al. (2002).

### **3.3.3 – Quantificação da Lipofuscina**

Para a análise da variação de lipofuscina nos tecidos estudados, foram obtidas 10 fotos de 5 cortes de brânquia e fígado, de cada indivíduo. As imagens obtidas foram analisadas no programa ImageJ versão 1.46e, no qual os grânulos de lipofuscina foram isolados e sua área total foi quantificada. Com isso foi possível identificar a quantidade de lipofuscina presente em cada fragmento de tecido observado.

### **3.3.4 – Análise estatística**

Os dados de área gerados pelo programa ImageJ, foram tabelados e com estes, calculou-se a média de lipofuscina encontrada no fígado e brânquia de cada indivíduo. Para identificar a existência de variação entre estes dados, aplicou-se o teste de normalidade de Shapiro – Wilk, e posteriormente os testes de variância ANOVA/Tukey ou Kruskal-Wallis/Dunn, dependendo dos resultados de normalidade.

### **3.3.5 – Análise química da água**

Para uma melhor análise dos resultados obtidos, amostras das águas do grupo controle e dos dois tratamentos, foram analisadas no Laboratório de Análise de Águas do Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas – UNESP

– Campus de Rio Claro. Estas análises foram realizadas, seguindo as normas do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, para os parâmetros descritos abaixo:

Foi realizada a determinação de metais por ICP-AES para os elementos: Mg, Ca, Sr, Ba, Cr(t), Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Si, P(t) e Pb. Os ânions: F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, PO<sub>4</sub>, SO<sub>4</sub>, ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>, acetato e oxalato mais os cátions Li, Na, NH<sub>4</sub> e K foram determinados por cromatografia Iônica. Foi realizada também a análise de pH, condutividade, alcalinidade total e carbonatos por titulação potenciométrica.

Também foi realizada a determinação da concentração do surfactante alquil benzeno sulfonato linear, principal componente dos detergentes biodegradáveis, através de análises cromatográficas no HPLC Agilent Technologies 1200 series, com detector de Fluorescência, na empresa Global Análise & Consultoria – São Carlos – SP – Brasil.

### **3.4 – Resultados**

#### **3.4.1 – Identificação da lipofuscina**

Os grânulos de lipofuscina foram identificados como pontuações citoplasmáticas fluorescentes geralmente perinucleares. Pode-se observar também, intensa reação nos vasos sanguíneos, devido à autofluorescência dos eritrócitos. Tais marcações foram desconsideradas nas análises.

#### **3.4.2 – *Astyanax altiparanae***

Os grupos controle apresentaram marcações para lipofuscina nos dois órgãos, durante todo o experimento. Entretanto, quando expostos aos contaminantes, os espécimes demonstraram aumento no número destas marcações nas duas coletas (1 e 5 meses).

No fígado, as alterações quanto à quantidade de grânulos foi marcante nos dois tratamentos de exposição a poluentes, tendo em vista o grande número de grânulos citoplasmáticos encontrados em comparação com o controle (Figura 1). Tais observações foram confirmadas estatisticamente, pois encontrou-se diferenças significativas entre os indivíduos mantidos na água do lago e na diluição de detergentes em comparação ao grupo controle após 1 mês de experimento com  $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis/Dunn) e após o quinto mês com  $p < 0.01$  (ANOVA/Tukey) (Tabela 1).

Nas brânquias, os grânulos estavam presentes principalmente nas células das lamelas secundárias, nos 3 grupos. O mesmo padrão de alteração encontrado no fígado observou-se nas brânquias (Figura 2). Este também foi confirmado pelo teste Kruskal-Wallis/Dunn, com  $p$

< 0.05, em todo o experimento (Tabela 1), evidenciando o maior acúmulo de lipofuscina nos tecidos expostos aos poluentes.

#### **3.4.3 – *Prochilodus lineatus***

O número de grânulos observados no fígado, dos dois grupos expostos, foi significativamente maior do que aqueles encontrados no controle (Figura 2), com  $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis/Dunn) (Tabela 2).

Quanto às brânquias (Figura 4), pode-se observar que após o primeiro mês de experimento, ocorreu aumento nos grânulos de lipofuscina encontrados em ambos os tratamentos com contaminantes com  $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis/Dunn). Entretanto, ao observar os dados obtidos após 5 meses, no grupo exposto ao detergente, pode-se identificar a redução na quantidade destes grânulos em relação ao grupo controle (Tabela 2) com  $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis/Dunn).

Os valores de área para lipofuscina referentes à segunda coleta no grupo exposto ao Lago Azul, não foram apresentados, pois neste tratamento a sobrevivência máxima dos espécimes foi de 35 dias, portanto logo após a primeira coleta.

#### **3.4.4 - Resultados das Análises Químicas da Água**

A partir da análise das águas, pudemos identificar modificações significativas em diversos parâmetros, nos dois tratamentos contaminados, estas encontram-se destacadas na Tabela 3.

Quanto a concentração de LAS na diluição de detergentes, foi encontrada 0,375 mg/L do surfactante na amostra. Na amostra do lago urbano encontramos 0,33 mg/L deste surfactante.

### **3.5 – Discussão**

De acordo com Au et al (2004), alterações citológicas e histológicas no fígado de peixes são consideradas como indícios iniciais de efeitos tóxicos, sendo, portanto, amplamente utilizados como indicadores de danos de xenobiontes em concentrações subletais. Segundo estes mesmos autores, contaminantes podem gerar a produção de radicais livres, principalmente espécies reativas de oxigênio, os quais atacam lipídeos poliinsaturados, levando a peroxidação lipídica e conseqüente produção de lipopigmentos. Segundo Couillard & Hodson (1996) a lipofuscina é composta por polímeros lipídicos complexados com proteínas e que podem ser utilizados como marcadores da peroxidação lipídica. Estudos

demonstram que quanto maior a concentração de radicais livres maior é a taxa de peroxidação lipídica, e esta acaba por recrutar macrófagos para a região afetada.

Couillard & Hodson (1996), em estudos realizados em efluentes de indústrias de celulose, demonstraram que o aumento do catabolismo celular e da peroxidação lipídica em diversos tecidos, se elevam após o contato de peixes com estes contaminantes. Este tipo de resposta pode gerar redução na eficiência do metabolismo de alimentos e afetar o crescimento ou mesmo a sobrevivência de espécies sensíveis em ambientes com baixa disponibilidade de alimento. Estudos realizados por Au et al (2004), demonstraram que a exposição de peixes a benzopireno elevava a concentração de lipofuscina nos hepatócitos. Estes autores corroboram os dados obtidos em nosso estudo, tendo em vista que foi encontrada elevação na concentração de lipofuscina tanto no fígado quanto nas brânquias das duas espécies após a exposição aos poluentes. Assim como descrito, a formação deste composto está ligada diretamente a peroxidação lipídica, que por sua vez é causada pela elevação dos níveis de radicais livres na célula.

As alterações foram encontradas por Vaschenko et al (2011) que demonstraram que em moluscos, poluentes e ambientes anóxicos afetam no acúmulo de lipofuscina. De acordo com Banni et al. (2009), em moluscos a lipofuscina acumula-se com a idade, mas este processo pode ser acelerado, quando em contato com poluentes. Resultados semelhantes podem ser encontrados nos estudos de Radwan et al (2010), Borucinska et al (2009), Han & Fang (2010), Machella et al (2005) e Teh et al (1997), para *Theba pisana*, *Prionacae glauca*, *Xiphophorus helleri*, *Anguilla Anguilla* e *Lepomis auritu*, respectivamente.

Segundo Banni et al (2009) o estresse oxidativo ocorre quando as defesas antioxidantes são sobrepujadas por forças pró-oxidativas e espécies reativas de oxigênio não são corretamente liberadas. Metais como cobre, chumbo, estimulam a peroxidação lipídica assim como alguns compostos orgânicos. Segundo Banni et al (2009) e Moore (1991), os grânulos de lipofuscina contribuem na desintoxicação por metais, pois podem formar corpos residuais com estes elementos, isolando-os do citoplasma. De acordo com Vaschenko et al (2011) existe relação direta entre a presença de metais como ferro, e o acúmulo de lipofuscina nas gônadas de *Strongylocentrotus intermedius*, sendo que o decréscimo da capacidade antioxidante celular é responsável pela maior incidência deste pigmento. Resultado semelhante foi também obtido por Hödl et al (2010), em *Helix pomatia*, após a exposição ao cobre.

As análises das águas de nosso experimento, nas quais os peixes foram expostos, demonstraram a presença de metais como o níquel, no caso do detergente, e ferro, no Lago

Azul. Isto nos leva a crer que tais elementos estão diretamente ligados a formação de lipofuscina. Isto se deve ao fato, de além dos metais serem comprovadamente geradores de radicais livres, este devem estar sendo isolados no citoplasma pelos grânulos de lipofuscina.

Em estudo realizado por Zhao et al (2011), além de conter membranas não digeridas e proteínas mal formadas, a lipofuscina pode acumular substâncias que se solúveis no citoplasma seriam altamente tóxicas. Entretanto este armazenamento pode gerar, em longo prazo, inibição de funções lisossomais e acelerar a deposição de lipofuscina. Este dado pode estar diretamente correlacionado as alterações encontradas nas brânquias, por estar em contato direto com o meio e realizar trocas com o mesmo. Isto se deve ao fato de principalmente o surfactante (LAS) encontrado nos detergentes, ser solúvel em água. Esta característica deve acarretar a alta solubilidade citoplasmática deste composto, forçando a célula a isolá-lo.

Au et al (2004) descreveram que em humanos, o acúmulo de lipopigmentos elevam a suscetibilidade ao estresse oxidativo, levando a danos e distúrbios ao sistema lisossomal, diminuindo a adaptabilidade e o aumentando as taxas de morte celular. Nos peixes estes pigmentos, afetam funções vitais da célula, o que pode gerar um decréscimo na adaptabilidade destes ao ambiente. Ding et al (2010), demonstraram que o crescente acúmulo de lipofuscina é acompanhado pela elevação no número de células apoptóticas em diversos tecidos de peixes da espécie *Oryzias latipes*. Agius & Roberts (2003) evidenciaram também a correlação entre a formação do pigmento e a degradação mitocondrial. Outro fato que pode ser acarretado por este lipopigmento é a inibição de enzimas como a ATP-ase vacuolar, responsável pela acidificação de lisossomos, o que inibe a digestão celular, como observado em zebra fish por Bibliowicz et al (2011).

Todos estes dados evidenciam que a correlação entre o acúmulo de lipofuscina e danos celulares já está amplamente difundido e fundamentado. Com isso pode-se considerar, que os resultados obtidos neste trabalho estão diretamente ligados a deleção de funções celulares básicas. Isto nos revela que os contaminantes testados desencadearam diversas reações, as quais devem acarretar em problemas na adaptação dos espécimes a variações ambientais, ou em casos mais extremos a morte celular e conseqüente perda de massa tecidual em órgãos vitais como o fígado e a brânquia.

Alguns dados curiosos, referentes às brânquias, foram obtidos em nosso experimento. Por exemplo, a presença de mais lipofuscina no primeiro mês de experimento em *A. altiparanae*, e a presença de mais pigmento no controle do que no grupo exposto ao detergente após 5 meses em *P. lineatus*. De acordo com Au et al (2004) a reversibilidade do acúmulo de lipopigmentos, ainda não é bem compreendida e comprovada, entretanto estudos

recentes demonstraram que em peixes até 45% de do quadro de acúmulo de lipopigmentos pode ser revertido devido a recuperação da estabilidade lisossomal, sendo que quanto mais poluída a área, mais eficiente é a regeneração tecidual. Segundo Cunha et al (1998), não se pode descartar a possibilidade da oxidação e o consumo de componentes lipídicos e protéicos da lipofuscina.

Com relação ao nosso experimento, não se acredita que as diferenças citadas acima, estejam relacionadas à reversibilidade lisossomal, mas sim a renovação tecidual. Isto se deve ao fato das brânquias realizarem trocas diretas com o meio, e possuir em suas lamelas secundárias apenas uma camada de células epiteliais. Esta estruturação acarreta em um desgaste rápido do mecanismo celular, gerando a renovação constante deste epitélio. No caso da exposição aos poluentes esta troca deve ser ainda mais eficiente. Esta hipótese é corroborada pelo fato de que encontrou-se em um dos casos maior concentração de pigmento ao início do experimento (1 mês) do que após 5 meses. Isto nos leva a crer que mesmo em condições normais, o envelhecimento e a degradação celular nas brânquias ocorrem rapidamente. No caso de ter-se identificado menor concentração em indivíduos expostos, indicam que se coletou logo após a renovação celular no grupo exposto ao detergente em *P. lineatus*.

A utilização de pelo menos duas espécies para a identificação dos efeitos de poluentes se faz necessária, tendo em vista que no estudo de Viarengo et al (2007), no mar de Ligúria na Itália, pode-se observar que algumas espécies de peixes acumulam lipofuscina com a exposição a poluentes enquanto outras não.

### **3.6 – Conclusões**

A lipofuscina pode ser utilizada como biomarcador ambiental, sendo que os poluentes testados comprovadamente alteram fisiologicamente os peixes. Tanto a diluição de detergentes, quanto à água do lago urbano, geram tal desequilíbrio celular, levando a elevação deste pigmento nos tecidos analisados.

### **3.7 – Bibliografia**

AGIUS, C., ROBERTS, R. J.. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**. v. 26, p.499–509, 2003



ARKING, R. **Biologia do Envelhecimento**. Segunda Edição. Riberão Preto – SP. Editora FUNPEC, 2008.

AU, D. W. T.. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p.817-834, 2004

AU, D. W. T. C., P.; POLLINO, C. A.. Cytological Changes In Association With Ethoxyresorufin O-Deethylase Induction In Fish Upon Dietary Exposure To Benzo[A]Pyrene. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.23, n. 4, p. 1043–1050, 2004.

BANNI, M., et al. Seasonal variation of oxidative stress biomarkers in clams *Ruditapes decussatus* sampled from Tunisian coastal areas. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 155, p.119-128, 2009.

BIBLIOWICZ, J., TITTLE, R. K., GROSS, J.M.. Toward a Better Understanding of Human Eye Disease Insights From the Zebrafish, *Danio rerio*. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 100, p.287-330, 2011

BORUCINSKA, J. D., et al. Melanomacrophages in three species of free-ranging sharks from the northwestern Atlantic, the blue shark *Prionace glauca*(L.), the shortfin mako, *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque), and the thresher, *Alopias vulpinus*(Bonnaterre). **Journal of Fish Diseases**. v. 32, n. 10, p. 883-891, 2009.

CAJARAVILLE, M. P., et al. Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. **Microscopy Research and Technique**. v. 61, n. 2, p. 191-202, 2003.

COUILLARD, C. M., HODSON, P. V.. Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent? **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 15, n. 10, p. 1844–1854, 1996.

CUNHA, D. F. P., et al. Estudo Morfométrico do Miocárdio em Adultos com Subnutrição Protéico-Energética. **Arq Bras Cardiol**. v. 71, n. 5, p. 677-680, 1998.

DING, L., et al. Quantifiable Biomarkers of Normal Aging in the Japanese Medaka Fish (*Oryzias latipes*). **PLoS ONE**. v. 5, n. 10, p. 1-11, 2010.

HAN, J. AND FANG, Z.. Estrogenic effects, reproductive impairment and developmental toxicity in ovoviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS). **Aquatic Toxicology**. v. 99, n. 2, p. 281-290, 2010.

HÖDL, E., FELDER, E., Chabicovsky, M., Dallinger, R.. Cadmium stress stimulates tissue turnover in *Helix pomatia*: increasing cell proliferation from metal tolerance to exhaustion in molluscan midgut gland. **Cell and Tissue Research**. v. 341, n. , p. 159-171, 2010.

JORDANOVA, M., MITEVA, N., ROCHA, E.. A qualitative and quantitative study of the hepatic pigmented macrophage aggregates during the breeding cycle of ohrid trout, *Salmo letnica* (Kar). (Teloestei, Salmonidae). **Microscopy Research and Technique**. v. 71, n. 11, p. 822-830, 2008

JUNQUEIRA, L.C.U., JUNQUEIRA, L.M.M.S.. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Volume Único. São Paulo: Livraria e Editora Santos. 123 p. 1983.

KISHI, S.; et al. The Identification of Zebrafish Mutants Showing Alterations in Senescence-Associated Biomarkers. **PLOS Genetics**. v. 4, n.8, 2008.

KODAMA, K., et al. Verification of lipofuscin-based crustacean ageing: seasonality of lipofuscin accumulation in the stomatopod *Oratosquilla oratoria* in relation to water temperature. **Marine Biology**. v. 150, n. 1, p. 131-140, 2006.

KODAMA, K., et al. Age estimation of the wild population of Japanese mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* (Crustacea: Stomatopoda) in Tokyo Bay, Japan, using lipofuscin as an age marker. **Fisheries science**. v. 71, p. 141–150, 2005.

MACHELLA, N., REGOLI, F., SANTELLA, R. M.. Immunofluorescent detection of 8-oxo-dG and PAH bulky adducts in fish liver and mussel digestive gland. **Aquatic Toxicology**. v. 71, n. 4, p. 335-343, 2005.

MOORE, M. N. Environmental stress signals: Cellular reactions to marine pollution. In **W. Graumann, & J. Drukker (Eds.), Histo- and cytochemistry as a tool in environmental toxicology.** pp. 1–19. 1991.

PEIXOTO, S. A., N.; D'INCAO, F.; WASIELESKY, W.; COUSIN, J. C.. Preliminary Identification And Quantification Of The Age-Pigment Lipofuscin In The Brain Of *Farfantepenaeus paulensis* (CRUSTACEA: DECAPODA). **Brazilian Journal Biology.** v. 62, n. 4B, p. 871-876, 2002.

PINTO, A.L., et al. Mullet and gudgeon liver histopathology and macroinvertebrate indexes and metrics upstream and downstream from a wastewater treatment plant (Febros River—Portugal). **Environ Monit Assess.** v. 169, p. 569–585, 2010.

RADWAN, M. A., EL-GENDY, K. S., GAD, A. F. Oxidative stress biomarkers in the digestive gland of theba pisana exposed to heavy metals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology.** v. 58, n. 3, p. 828-835, 2010.

SCBUTT, F., et al. Proteins Modified By Malondialdehyde, 4-Hydroxynonenal, Or Advanced Glycation End Products In Lipofuscin Of Human Retinal Pigment Epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science.** v. 44, n. 8, p. 3663 – 3668, 2003.

SILVA, M. M., SILVA, V. H. Ageing: major risk factor for cancer. **Arq. Med. ABC.** v. 30, n. 1, p. 11-18, 2005.

TEH, S. J., ADAMSB, S.M., HINTON, D. E.. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology.** v. 37, p. 51-70, 1997.

TERZIBASI, E., et al. Large Differences in Aging Phenotype between Strains of the Short-Lived Annual Fish *Nothobranchius furzeri*. **PLoS ONE.** vol. 3, n. 12, e3866. doi:10.1371/journal.pone.0003866. 2008.

TERMAN, A.; BRUNK, U.. Lipofuscin: Mechanisms of formation and increase with age. **APMS.** 1998.

VASCHENKO, M.A., et al. Lipofuscin-Like Pigment in Gonads of Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius* as a Potential Biomarker of Marine Pollution: A Field Study. **Arch Environ Contam Toxicol**. Publicado online em 03 de dezembro de 2011.

VIARENGO, A., et al. A Biomonitoring Study Assessing the Residual Biological Effects of Pollution Caused by the HAVEN Wreck on Marine Organisms in the Ligurian Sea (Italy). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 4, p. 607-616, 2007.

ZHAO, L., et al. A Deficiency of Ceramide Biosynthesis Causes Cerebellar Purkinje Cell Neurodegeneration and Lipofuscin Accumulation. **PLoS Genet**. v. 7, n. 5, e1002063. doi:10.1371/journal.pgen.1002063. 2011.



### 3.8 – Tabelas

	Controle		Detergente				Lago Azul			
	1º mês	5º mês	1º mês		5º mês		1º mês		5º mês	
			Média	p	Média	p	Média	p	Média	p
Fígado	137.4144 (S-151.1365)	297.0132 (S- 314.2338)	1767.5487 (S- 979.4983)	< 0.05	1587.8464 (S- 580.1645)	< 0.01	1508.2791 (S- 409.8643)	< 0.05	1752.4691 (S- 794.0181)	< 0.01
Brânquia	202.7983 (S-87.1535)	130.3987 (S- 80.9229)	758.3885 (S-246.2784)	< 0.05	657.3583 (S-290.2835)	< 0.05	1332.9657 (S- 468.2816)	< 0.05	794.1505 (S-247.3788)	< 0.05

Tabela 1: Média em  $\mu^2$  da área ocupada pela lipofuscina no fígado e brânquia na espécie *Astyanax altiparanae*. Note a maior presença de lipofuscina nos grupos expostos ao detergente e a água do Lago Azul em todo o experimento.

S – desvio padrão

	Controle		Detergente				Lago Azul			
	1º mês	5º mês	1º mês		5º mês		1º mês		5º mês	
			Média	p	Média	p	Média	p	Média	p
Fígado	106.3340 (S-45.5812)	190.1636 (S- 92.9867)	2066.1662 (S- 797.9907)	< 0.05	2093.9485 (S-1159.0389)	< 0.05	2139.9121 (S- 916.2812)	< 0.05		
Brânquia	70.9588 (S-21.6329)	474.1587 (S- 181.7553)	280.7777 (S-155.7682)	< 0.05	225.8983 (S-96.0977)	< 0.05	220.2683 (S- 79.1638)	< 0.05		

Tabela 2: Média em  $\mu^2$  da área ocupada pela lipofuscina no fígado e brânquia na espécie *Prochilodus lineatus*. Note a maior presença de lipofuscina nos grupos expostos ao detergente e a água do Lago Azul durante o primeiro mês de experimento. Após o quinto mês podemos observar que o padrão de concentração de lipofuscina se mantém, com exceção da brânquia no grupo exposto ao detergente.

S – Desvio padrão

## 3.9 – Imagens

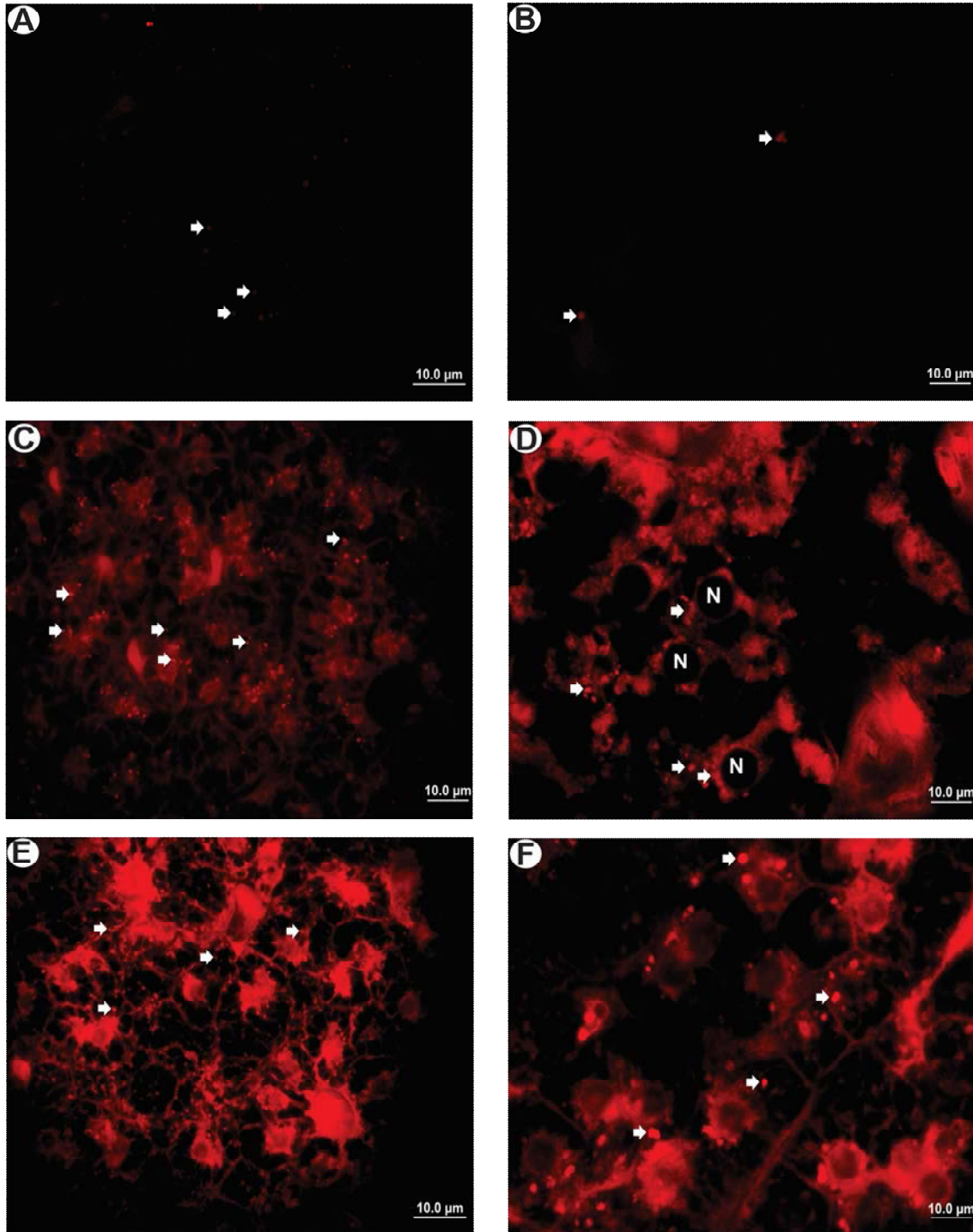


Figura 1: A e B aspecto geral do fígado da espécie *A. altiparanae*, no grupo controle, observados sob microscopia de fluorescência (1 e 5 meses respectivamente). C e D fígado de *A. altiparanae* após a exposição ao detergente (1 e 5 meses respectivamente). E e F. fígado de *A. altiparanae* após a exposição a água do lago urbano (1 e 5 meses respectivamente). Note a elevada concentração de grânulos de lipofuscina (seta) nos grupos expostos a poluentes. N - núcleo dos hepatócitos.



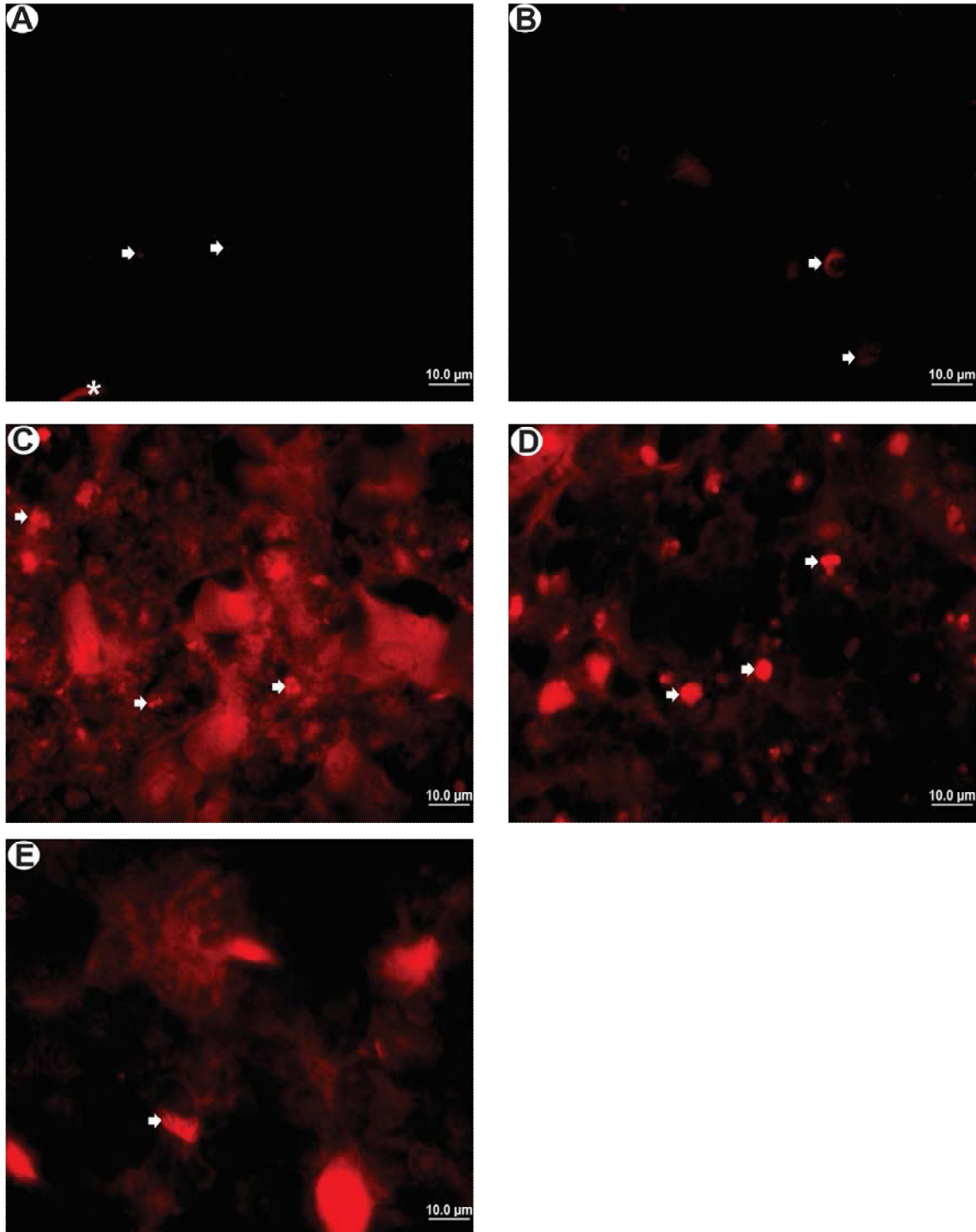


Figura 2: A e B aspecto geral do fígado da espécie *P. lineatus*, no grupo controle, observados sob microscopia de fulorescência (1 e 5 meses respectivamente). C e D fígado de *P. lineatus* após a exposição ao detergente (1 e 5 meses respectivamente). E fígado de *P. lineatus* após a exposição a água do lago urbano (1 mês de experimento). Note a elevada concentração de grânulos de lipofuscina (seta) nos grupos expostos a poluentes.

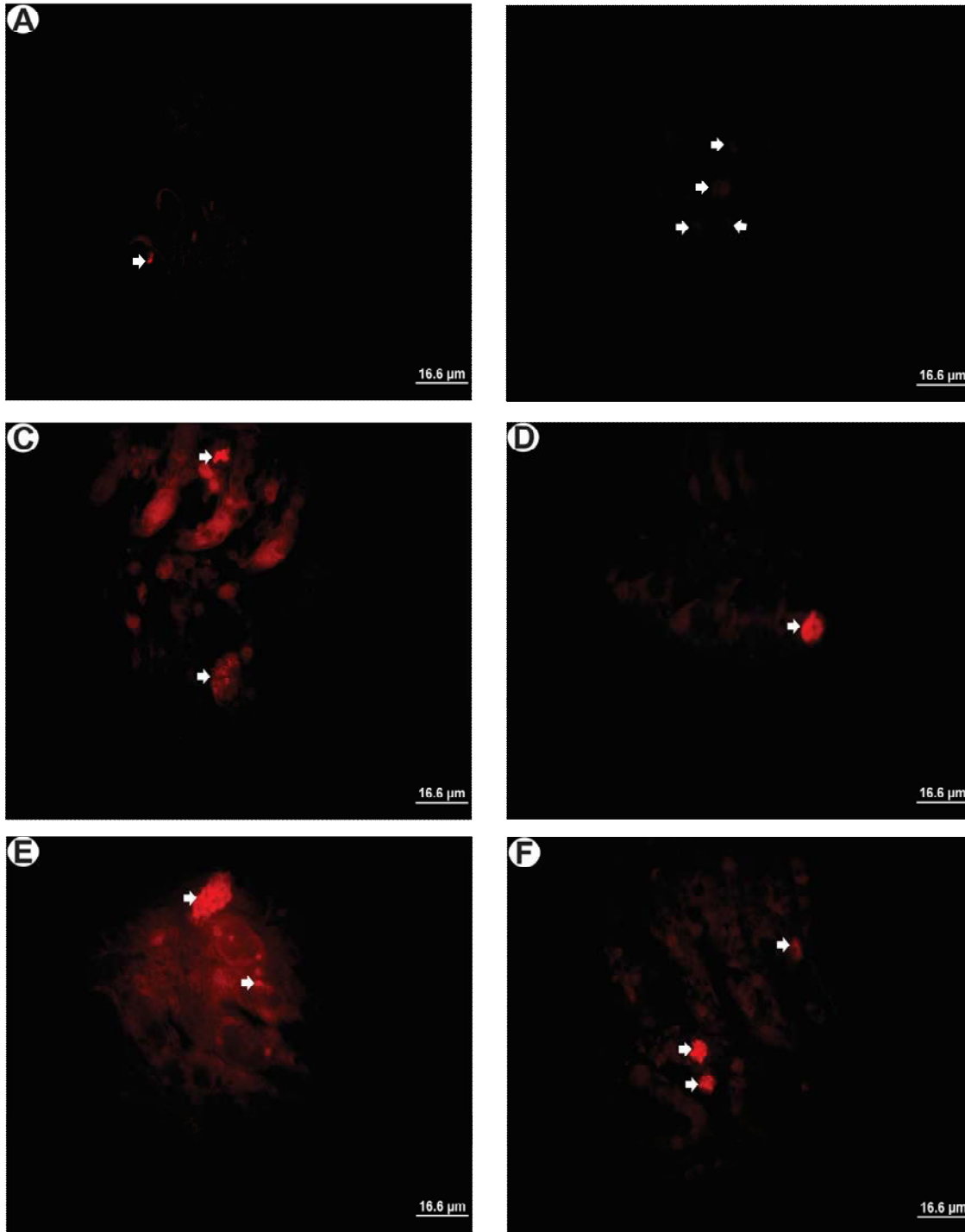


Figura 3: A e B aspecto geral da brânquia da espécie *A. altiparanae*, no grupo controle observados sob microscopia de fluorescência (1 e 5 meses respectivamente). C e D brânquia de *A. altiparanae* após a exposição ao detergente (1 e 5 meses respectivamente). E e F. brânquia de *A. altiparanae* após a exposição a água do lago urbano (1 e 5 meses respectivamente). Note a elevada concentração de grânulos de lipofuscina (seta) nos grupos expostos a poluente, com exceção do grupo detergente após 5 meses, em que encontramos menor número de grânulos, quando comparado com o grupo controle.

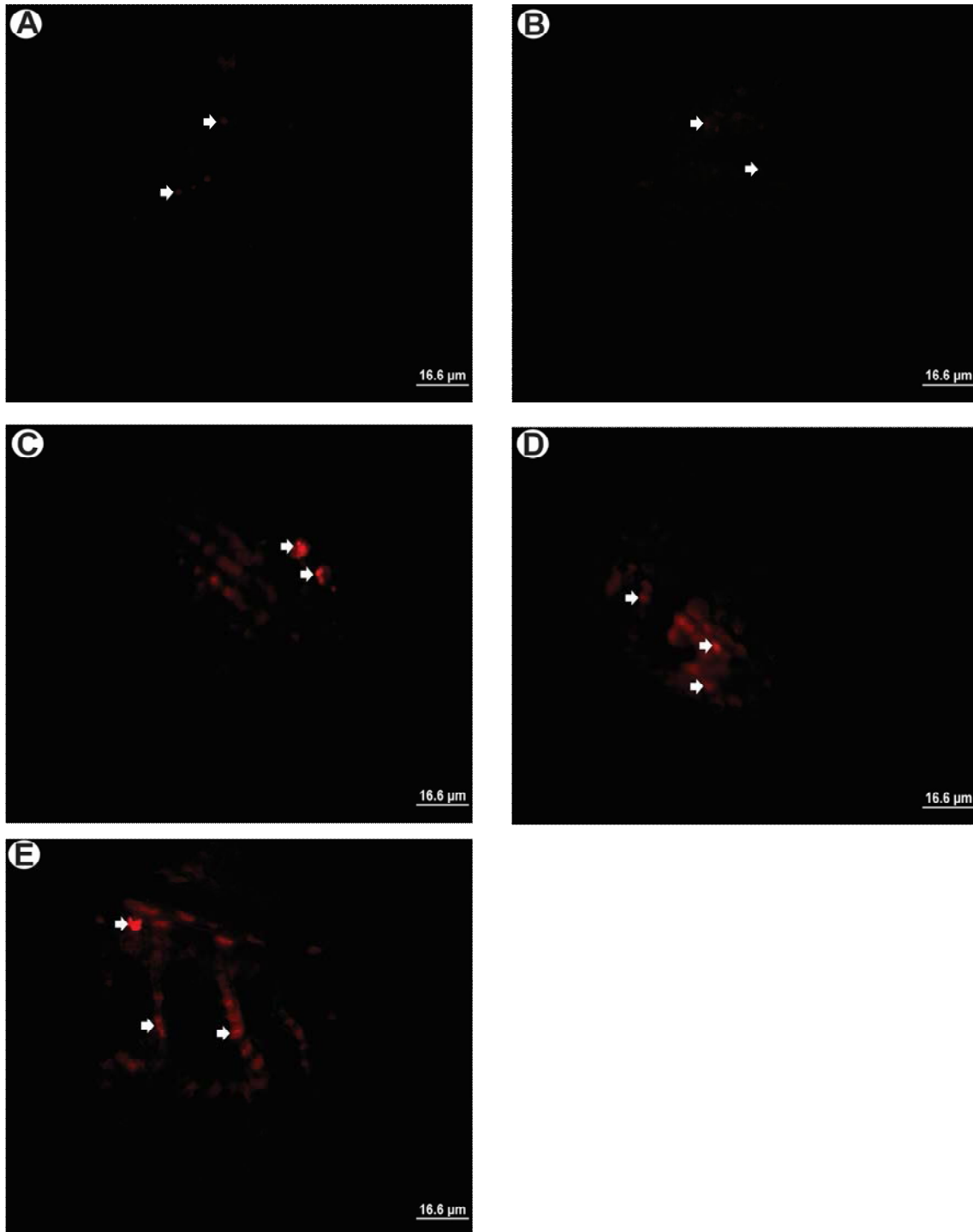


Figura 4: A e B aspecto geral da brânquia da espécie *P. lineatus*, no grupo controle observados sob microscopia de fluorescência (1 e 5 meses respectivamente). C e D brânquia de *P. lineatus* após a exposição ao detergente (1 e 5 meses respectivamente). E brânquia de *P. lineatus* após a exposição a água do lago urbano após um mês de experimento. Note a elevada concentração de grânulos de lipofuscina nos grupos expostos aos poluentes (seta).

## CAPÍTULO 4

Análise ultraestrutural das brânquias de *Astyanax altiparane* e *Prochilodus lineatus* expostos a detergentes biodegradáveis e poluentes urbanos

#### 4.1 – Resumo

Diversos estudos abordando os efeitos tóxicos de poluentes na morfologia de diversos tecidos de peixes já foram realizados, entretanto abordagens ultra-estruturais ainda necessitam de um aprofundamento maior. Este trabalho visou identificar os efeitos de detergentes biodegradáveis, tanto de forma isolada, quanto na presença de outros contaminantes, nos diferentes tipos celulares das brânquias das espécies *Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus*. Nossos resultados evidenciaram que, mesmo em concentrações baixas dos poluentes, os efeitos graves na estrutura celular das brânquias, como degradação citoplasmática, fusão e lesões mitocondriais, desaparecimento ou desorganização do retículo endoplasmático, entre outras. Com isso evidenciamos que grande parte das modificações naturais das brânquias para evitar a absorção de poluentes, como fusões lamelares e proliferação de células ricas em mitocôndrias, pode não ser eficiente devido aos danos celulares causados pelos contaminantes, utilizados neste trabalho.

#### 4.2 – Introdução

A água é um dos fatores essenciais para a manutenção das funções vitais dos seres humanos e com o aumento do crescimento populacional e conseqüente aumento do consumo de água, a economia deste recurso e a conservação de sua qualidade tornaram-se de extrema importância (BIAGINI et al., 2009). Ecossistemas aquáticos são os destinos finais de efluentes industriais, residenciais e agrícolas que podem afetar a qualidade da água que os recebe (SOUZA & FONTANETTI, 2012). Resíduos domésticos e industriais são, de fato, os principais responsáveis pela contaminação hídrica (CALXTON et al., 1998 apud RAMESH & AGARAJAN, 2013; WHITE & RASMUSSEN, 1998 apud RAMESH & AGARAJAN, 2013), onde o esgoto é um dos principais responsáveis pela deterioração da qualidade de água em países em desenvolvimento (BIAGINI et al., 2009).

Além disso, dentre os principais compostos despejados pelas diversas formas já citadas, estão os chamados detergentes biodegradáveis, os quais foram introduzidos no mercado como um produto menos danoso ao ambiente (ALLINGER et al., 1978). Entretanto seus reais efeitos na biota ainda são pouco conhecidos

Esta contaminação dos recursos aquáticos é, atualmente, de grande interesse do setor de saúde pública (MARIA et al., 2003 apud BIAGINI et al., 2009), uma vez que o consumo direto ou indireto de água pode causar danos sérios aos organismos (BIAGINI et al., 2009). Uma das formas de uso indireto dessas águas é a utilização de peixes na alimentação, que por

desempenharem papéis importantes na cadeia alimentar e bioacumulação direta e indireta de substâncias tóxicas por meio da ingestão de compostos dissolvidos na água ou da ingestão de organismos previamente contaminados que servem de presa, são comumente utilizados como bioindicadores de ecossistemas aquáticos (RAMESH & AGARAJAN, 2013).

De acordo com Harshbarger & Clark (1990), os peixes constituem ótimos organismos-teste para monitorar a qualidade da água, especialmente peixes de aquário de pequeno porte, que podem facilmente ser mantidos em laboratório e expostos a substâncias tóxicas de maneira similar a outros vertebrados superiores. Assim, estes organismos podem ser utilizados para avaliar o potencial tóxico das substâncias até mesmo para humanos (BIAGINI et al., 2009).

A brânquia é o primeiro órgão a entrar em contato com os contaminantes presentes na água. Devido a sua grande superfície, pequena distância de difusão entre água e sangue (FERNANDES et al., 2013) e localização externa, sendo por isso, bastante vulnerável a poluentes aquáticos e é considerada um eficiente indicador de qualidade de água e nível de poluição (BARJA-FERNÁNDEZ et al., 2013).

Em geral, as brânquias respondem rapidamente a vários agentes químicos como forma de superar danos fisiológicos ou injúrias ao tecido, que podem provocar efeitos negativos na função geral das brânquias, aumentando a susceptibilidade do peixe a compostos tóxicos e até mesmo levando-os à morte (FERNANDES et al., 2013). Hiperplasia, fusão lamelar e hipertrofia das células pavimentosas são modificações que auxiliam no impedimento destes agentes químicos alcançarem a corrente sanguínea (FERNANDES et al., 2013).

Além disto, as brânquias realizam numerosas funções como respiração, osmorregulação, excreção de resíduos nitrogenados e balanço ácido-base, de forma que o comprometimento funcional deste órgão pode danificar a saúde do peixe (BARJA-FERNÁNDEZ et al., 2013).

Com isso este trabalho visou identificar as alterações ultra-estruturais, nos diferentes tipos celulares das brânquias de duas espécies de peixes neotropicais (*Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus*), após a exposição a uma diluição de detergentes biodegradáveis e a água de um lago urbano, comprovadamente contaminado.

### **4.3 – Metodologia**

Para este experimento foram utilizados 60 indivíduos de cada espécie em análise (*Astyanax altiparanae* e *Prochilodus lineatus*), cedidos pelo CEPTA – Instituto Chico

Mendes (Pirassununga, SP). Estes foram divididos em 3 grupos contendo 20 indivíduos cada. O primeiro grupo (controle) foi exposto à água do poço artesiano da UNESP – Campus de Rio Claro; o segundo à diluição de 1ppm de 10 diferentes marcas de detergentes biodegradáveis, esta realizada na mesma água do grupo controle, e o terceiro foi submetido à água de um lago urbano de Rio Claro, chamado de Lago Azul, o qual reconhecidamente recebe resíduos de residências e pequenas indústrias.

Foram realizadas duas coletas para cada espécie, após 1 e 5 meses de exposição, sendo sacrificados 4 indivíduos de cada espécie em cada período. Antes de serem sacrificados para a coleta dos órgãos a serem analisados, os animais foram anestesiados em solução de benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada).

Para a análise de ultraestrutura, segundo Reynolds (1963), fragmentos das brânquias foram fixados em glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante 2 horas em geladeira. A seguir, o material foi lavado duas vezes em tampão cacodilato de sódio com duração de 15 minutos cada uma e, em seguida, foi realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% durante uma hora no escuro. O material foi, então, lavado por 15 minutos no mesmo tampão, duas vezes. Para a contrastação, o material foi submerso em acetato de uranila 1% dissolvido em etanol 10% por 8 horas, sendo em seguida desidratado em diferentes concentrações de etanol (de 70 a 100%) e, posteriormente, embebido em resina Epon Araldite e acetona (1:1) por 24 horas. O material foi, então, incluído em resina Epon Araldite pura e levado à estufa por 72 horas, a 60°C, para polimerização. O material foi seccionado em ultra-micrótomo Porter Blum, montado em grades de cobre e contrastado em acetato de uranila (45 minutos) e citrato de chumbo (15 minutos) (Reynolds, 1963). O material foi analisado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100 do laboratório de microscopia eletrônica do departamento de Biologia, UNESP - Rio Claro.

Para um melhor entendimento dos resultados obtidos, amostras das águas utilizadas nos 3 tratamentos foram enviadas ao Laboratório de Análise de Águas do Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas – UNESP – Campus de Rio Claro. Estas análises foram realizadas, seguindo as normas do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, para os parâmetros descritos abaixo:

Foi realizada a determinação de metais por ICP-AES para os elementos: Mg, Ca, Sr, Ba, Cr(t), Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Si, P(t) e Pb. Os ânions: F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>, acetato e oxalato e os cátions Li, Na, NH<sub>4</sub> e K foram determinados por cromatografia

iônica. Foi realizada também a análise de pH, condutividade, alcalinidade total e carbonatos por titulação potenciométrica.

Apesar do fato de utilizarmos uma concentração constante de detergente, mostrou-se necessária avaliação da real concentração do LAS – alquil benzeno sulfonato linear, principal componente dos detergentes domésticos – nas amostras de água. Para isso realizou-se análises cromatográficas no HPLC Agilent Technologies 1200 series, com detector de fluorescência, na empresa Global Análise & Consultoria – São Carlos – SP – Brasil. O mesmo teste foi realizado para a água do lago urbano para identificar a existência desta substância.

Todo o experimento foi realizado em duplicata para a confirmação dos dados obtidos.

#### 4.4 – Resultados

Durante o período experimental, os indivíduos da espécie *P. lineatus*, apresentaram mortalidade de 100% após 35 dias de exposição à água do lago urbano, o que não ocorreu em *A. altiparanae*.

Foram identificados basicamente 4 tipos celulares constituindo as brânquias das duas espécies.

1- As células pavimentosas, que possuem núcleo geralmente alongado (Figura 1A) e nas quais podem ser observadas as chamadas microrridges, principalmente nas células que constituem o epitélio da lamela primária (Figura 1C). Suas mitocôndrias são alongadas e possuem poucas cristas e também foi comum a observação de complexos de Golgi e grande quantidade de retículo endoplasmático liso, ribossomos e polirribossomos livres (Figura 1B).

2- Células pilares, encontradas entre as células epiteliais na lamela secundária, cuja função é delimitar e manter o espaço para que os eritrócitos possam transitar (Figura 1A). Estas apresentam núcleos irregulares, mitocôndrias semelhantes às encontradas nas células pavimentosas, entretanto raramente se observou retículo endoplasmático ou complexo de Golgi.

3- Células de muco, as quais possuem núcleo redondo e basal, e o restante do citoplasma repleto de vesículas de secreção (Figura 1D).

4- Células ricas em mitocôndrias (células de cloro) (Figura 1E). Estas possuem núcleos irregulares, com citoplasma repleto de mitocôndrias alongadas, portam diversas cristas, citoplasma com grande quantidade de vesículas e complexa rede de retículo endoplasmático (Figuras 1F e 2B). Estas, quando encontradas no epitélio da lamela primária, são envoltas por células pavimentosas, onde apenas uma pequena região de sua membrana



plasmática é exposta ao meio. Esta porção, diferentemente da membrana plasmática das células pavimentosas, apresenta glicocálix (Figura 2A).

As alterações observadas nas células acima descritas resultaram da exposição tanto ao detergente, quanto à água do lago urbano e, os mesmos tipos de alterações surgiram nos dois tempos de exposição, ou seja, manteve-se um mesmo padrão. Entretanto as alterações foram mais frequentes nos indivíduos expostos à água do lago urbano.

As células de muco não apresentaram diferenças morfológicas, com relação ao padrão encontrado no grupo controle.

Em geral, observa-se aumento do volume de células sanguíneas nas lamelas secundárias, caracterizando o padrão conhecido por aneurisma. Neste, além da dilatação da lamela secundária, também observa-se que as células pilares, as quais antes ficavam aderidas entre as células pavimentosas, formando o canal, encontram-se livres juntamente com as células sanguíneas e em geral, apresentando tamanho menor que aquele do grupo controle (Figura 2C).

Nas células ricas em mitocôndrias, pode-se observar a degradação citoplasmática, com o desaparecimento ou desorganização da rede de retículo endoplasmático, bem como degradação mitocondrial, evidenciada pela degeneração das cristas mitocondriais e dilatação do espaço intermembrana (Figura 2D e E). Outro aspecto importante a ser ressaltado é que estas células em geral perdem o glicocálix após a exposição aos poluentes, mas em contrapartida, a área de contato da membrana plasmática com o meio aumenta consideravelmente (Figura 2F). Este evento deve-se, aparentemente, à perda ou desarranjo coordenado dos complexos juncionais, que anteriormente uniam estas células às pavimentosas.

As células pavimentosas tanto nas lamelas primárias quanto nas secundárias, apresentam fusões de mitocôndrias, gerando algumas extremamente longas, tomando quase toda a extensão longitudinal da célula (Figura 3A). Mesmo fundidas, os mesmos padrões de dilatação do espaço intermembrana e degradação das cristas também são identificados (Figura 3B). Na lamela primária dos grupos expostos aos poluentes, encontramos as chamadas células rodlet. Estas células apresentavam, em alguns casos, citoplasma degenerado, bem como suas organelas: em alguns casos pudemos observar fragmentação nuclear e citoplasmática para a formação dos chamados corpos apoptóticos (Figuras 3C e D). Uma particularidade encontrada na lamela secundária foi a redução de volume citoplasmático de algumas células pavimentosas, nas quais não é possível identificar organelas, e ainda células com regiões descoladas da lamela; em alguns casos mais extremos, observou-se células totalmente soltas

do restante do tecido (Figura 3E). Em alguns casos também foi observado acúmulo de peroxissomos nas células pavimentosas, após a exposição aos poluentes (Figura 3F)

Com relação às análises da concentração de LAS na diluição de detergentes e na água do lago urbano, valores muito semelhantes foram revelados: 0,375 mg/L e 0,33 mg/L respectivamente. Quando comparados com as concentrações de íons e metais da água do grupo controle, foram observados níveis elevados de  $\text{NO}_2^-$ , Ni na diluição de detergentes e de Na, Fe,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{NO}_2^-$  na água do lago urbano.

#### 4.5 – Discussão

Os aspectos morfológicos normais das brânquias de *Prochilodus scrofa* mostram-se com epitélio estratificado nos filamentos entre lamelas, onde existem células ricas em mitocôndrias e células mucosas (FERNANDES, 1998). O epitélio lamelar consiste de duas camadas de células, pavimentosas na superfície e indiferenciadas abaixo, alinhadas sobre a lâmina basal que recobre as células pilares e cujos prolongamentos formam os canais vasculares (FERNANDES, 1998). Nossos dados obtidos no grupo controle, corroboram os acima citados, tanto para a espécie *A. altiparanae*, quanto para *P. lineatus*. As descrições da morfologia ultraestrutural dos 4 tipos celulares descritos em nosso trabalho, quanto a forma das estruturas celulares, bem como a frequência de organelas são as mesmas descritas por Wilson & Laurent (2002), para peixes de água doce.

As brânquias são consideradas o primeiro órgão-alvo de todos os poluentes aquáticos devido à sua extensa superfície em contato com o meio externo e a distância reduzida entre o meio interno e externo (CERQUEIRA & FERNANDES, 2002). Os efeitos tóxicos de metais e outros tipos de contaminantes nas brânquias têm sido investigados por diversos autores durante a exposição aguda ou crônica por meio de análise histopatológica ou parâmetros fisiológicos (CERQUEIRA & FERNANDES, 2002).

Quanto às modificações morfológicas, até mesmo concentrações baixas de metais geram tais alterações que podem levar a mudanças funcionais e interferir em processos tão fundamentais como a manutenção da osmorregulação e a defesa antioxidante das brânquias (PUERTO et al., 2010). É importante lembrar que, apesar de a maior parte das lesões branquiais causadas por doses experimentais de contaminantes ocorrerem no epitélio, os efeitos tóxicos em potencial podem afetar indiretamente outros órgãos uma vez que o agente pode possuir toxicidade sistêmica (BARJA-FERNÁNDEZ, 2013).

Abdel-Moneim et al. (2012) classificaram as principais alterações histológicas observadas nas brânquias de peixes capturados em rios egípcios contaminados por metais em 3 padrões de reação: (1) distúrbios circulatórios, que incluem aneurismas, congestão lamelar de sangue e hemorragia; (2) respostas celulares proliferativas, que incluem hiperplasia, hipertrofia e fusão; (3) alterações osmorregulatórias, que incluem descolamento epitelial, dilatação e edema intersticial. Nossos resultados indicam que ambos os contaminantes ocasionaram os 3 tipos de alterações descritas acima, tendo em vista que na maioria das vezes, encontramos diversos destes distúrbios ocorrendo simultaneamente na mesma porção do tecido, como aneurisma e descolamento epitelial.

Em relação ao distúrbios circulatórios, diversos autores observaram alterações no sistema vascular branquial: Fernandes, 1998 e Martinez, 2004 mostraram congestão de eritrócitos, aneurismas e necrose em peixes expostos a chumbo. Em alguns casos, a frequência de alterações morfológicas cresce concomitantemente ao aumento na concentração de chumbo (FERNANDES, 1998). Contaminantes de natureza não-metálica, como o 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE-47) também afetam o sistema vascular branquial de rodovalhos, induzindo congestão sanguínea, indicada por alargamento do canal vascular das lamelas e acúmulo de células sanguíneas (BARJA-FERNÁNDEZ, 2013). De acordo com a literatura, estas alterações podem se relacionar à ruptura das células pilares, que induz a perda de integridade vascular e aumenta o fluxo sanguíneo dentro da lamela (BARJA-FERNÁNDEZ, 2013).

Misra et al. (1985), Abel & Skidmore (1975) e Roy (1988) realizaram estudos em brânquias com o princípio ativo dos detergentes biodegradáveis o alquil-benzeno-sulfato-linear (LAS). Entretanto estes autores não encontraram modificações tão severas, quanto as descritas por nós neste trabalho e nos trabalhos supracitados. Nossas análises tinham concentrações semelhante de LAS, nos dois tratamentos e a presença de metais em ambos, porém em baixas concentrações, o que também não justificaria os resultados aqui obtidos. Acreditamos que este evento se deve a interação entre os compostos presentes nas águas examinadas, sendo que o LAS, por ser um surfactante, deve estar agindo na permeabilidade da membrana plasmática, ocasionando a bioacumulação destes metais, mesmo em baixas concentrações.

A congestão sanguínea detectada em peixes vivendo em ambientes contaminados (BARJA-FERNÁNDEZ, 2013) e em peixes expostos a organofosforados (FANTA et al., 2003), é considerada uma injúria severa e de mais difícil recuperação do que as alterações

epiteliais (BARJA-FERNÁNDEZ, 2013). Também é provável que esses distúrbios vasculares causem danos às funções associadas ao tecido branquial (BARJA-FERNÁNDEZ, 2013).

As respostas celulares como proliferação de células epiteliais do filamento, hipertrofia das células pavimentosas lamelares foram observadas por vários autores (BARJA-FERNÁNDEZ et al., 2013; FISHELSON, 1980; FERNANDES, 1998; MARTINEZ et al., 2004) em peixes expostos a contaminantes metálicos e não-metálicos. Essas lesões podem ser unilaterais (afetam o epitélio de apenas uma face da lamela) ou bilaterais (afetam ambas as faces) (BARJA-FERNÁNDEZ et al., 2013) e a frequência dessas alterações variou conforme o tipo de contaminante (FERNANDES, 1998) e dose administrada. Em alguns casos, alterações como hiperplasia só foi observada em altas doses de agente tóxico - por exemplo, indivíduos de *P. lineatus* expostos a chumbo - e ocasionalmente levou à fusão de lamelas adjacentes e até de filamentos adjacentes (MARTINEZ et al., 2004).

Em nossos experimentos observou-se modificações bilaterais independente do contaminante, entretanto consideramos que as modificações a nível ultraestrutural foram mais graves do que a proliferação ou hiperplasia celular. Neste caso observou-se a degeneração mitocondrial destas células epiteliais, bem como de outras organelas citoplasmáticas, além da proliferação de peroxissomos, organela envolvida em processos de desintoxicação. Isto evidencia que mesmo com a proliferação celular, estas células, que serviriam como uma barreira contra os poluentes são afetadas de forma drástica pela combinação de poluentes, e serão rapidamente eliminadas, tendo em vista que danos mitocondriais desencadeiam o processo apoptótico.

As células ricas em mitocôndrias, que são sítio de absorção de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$  em peixes de água doce (FERNANDES et al., 2013) também podem sofrer alterações proliferativas e são caracterizadas por numerosas mitocôndrias a um sistema tubular de membranas com alta densidade de unidades enzimáticas de ATPases  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (DANG et al., 2000 apud FERNANDES et al., 2013). A morfologia apical das células ricas em mitocôndrias varia entre as espécies de água doce e sua área superficial é correlata ao sistema de troca de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e a área fracional de células ricas em mitocôndrias (FERNANDES et al., 2013).

Apesar de a hiperplasia se classificar como alteração proliferativa, mudanças na densidade das células ricas em mitocôndrias e em sua superfície apical indicam distúrbios iônicos (FERNANDES et al., 2013; MORON et al., 2003). Contaminantes aquáticos podem causar um desequilíbrio iônico ao aumentar a perda de íons de difusão e/ou por reduzir a atividade de células ricas em mitocôndrias devido à sua ação tóxica (FERNANDES et al., 2013).

Além disso, estas respostas proliferativas de células ricas em mitocôndrias causadas pela exposição a metais são consideradas respostas compensatórias para manter o balanço iônico, mas seu turnover resulta em subpopulações recém emergidas aumentadas, células necróticas e apoptóticas exibindo baixa atividade de ATPases  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e baixa densidade e desequilíbrio iônico (CERQUEIRA & FERNANDES, 2002).

O presente estudo demonstrou que, a hiperplasia das células de cloro, foi acompanhada da degeneração mitocondrial e da trama de retículo endoplasmático, além do aumento da área de contato com o meio. Estas modificações internas indicam que mesmo na tentativa de regular o desequilíbrio iônico gerado pelos poluentes, estas células não devem ser mais capazes de efetuar suas ações. Além disso, identificamos a perda do glicocálix destas células, este é reconhecidamente um filtro seletivo e seu desaparecimento pode acarretar na entrada indevida de substâncias no organismo.

Ainda sobre alterações osmorregulatórias, baixas concentrações de chumbo provocaram entre outras alterações, o descolamento epitelial nas brânquias de corimba (*P. lineatus*), que é caracterizado pelo descolamento da camada mais externa do epitélio lamelar (MARTINEZ et al., 2004) o qual provavelmente foi consequência da formação de um edema entre o canal lamelar vascular e o local de descolamento (BARJA-FERNÁNDEZ et al., 2013).

Outras alterações observadas são verificadas também na literatura, como alterações nas cristas da membrana plasmática (FERNANDES, et al., 1998). Normalmente, na periferia da membrana plasmática, essas cristas ocorrem paralelas às junções celulares das células vizinhas, enquanto que, próximo do centro, as primeiras divergem e formam uma estrutura semelhante a labirinto, que é específica para várias espécies (FISHELSON, 1980). Algumas das cristas das células superficiais projetam-se sobre as aberturas das células ricas em mitocôndrias e baseando-se em imagem de microscopia eletrônica, são descritas como “microvili” (FISHELSON, 1980). Em indivíduos de *P. scrofa* expostos a cobre, as microcristas das células pavimentosas do epitélio do filamento mudam de forma, as microcristas se reduzem e o padrão que antes era composto de desenhos de formas alongadas passa a ser uma superfície celular quase lisa (FERNANDES, et al. 1998). Também, a superfície de células ricas em mitocôndrias aumenta após a exposição a cobre (FERNANDES, et al. 1998).

Em relação às junções celulares, normalmente as células vizinhas da camada pavimentosa do epitélio branquial são conectadas às células mais basais e entre si por junções oclusivas e os desmossomos parecem se comportar de forma diferente em brânquias de peixes

de água doce e marinhos (FISHELSON, 1980). As brânquias dos peixes adaptados ao ambiente marinho apresentam junções mais frouxas, muitas abertas, e formam-se espaços entre as células epiteliais das brânquias (FISHELSON, 1980).

Observou-se estes eventos descritos acima no presente trabalho, sendo que o descolamento do epitélio, bem como a perda das microcristas, isto se deve, provavelmente a danos ao citoesqueleto, tendo em vista que a degeneração citoplasmática observada foi acompanhada da deformação celular e do desaparecimento de junções, estas ligadas diretamente ao filamentos do citoesqueleto.

Um tipo especial de célula mucosa, as células rodlet possuem ultraestrutura similar em várias espécies de teleósteos e os estágios de desenvolvimento são identificados com base em diferenças na espessura da cápsula e na cromatina (PROCÓPIO, et al. 2011). Elas possuem uma cápsula espessa de origem fibrilar, grânulos citoplasmáticos descritos como bolsas claviformes que contêm um centro de material altamente elétron-denso e periferia mais elétron-lúcida (PROCÓPIO, et al. 2011). Diversos trabalhos avaliaram a ocorrência das células rodlet como biomarcadores de impacto ambiental em peixes teleósteos expostos a contaminantes (PROCÓPIO, et al. 2011).

Observou-se este tipo celular em nosso estudo apenas nos grupos expostos aos contaminantes, sendo que em alguns casos estas células apresentavam-se em processo de apoptose. Este resultado indica que estas realmente podem ser consideradas como biomarcadores.

#### **4.6 – Conclusões**

Ultra - estruturalmente os danos observados devem ser extremamente graves a fisiologia da brânquia, pois acarretam em alterações celulares que inviabilizam seu metabolismo. A proliferação de células de cloro, pode não ser eficiente para o controle iônico em ambientes poluídos, tendo em vista que mesmos com várias células estas podem estar comprometidas estrutural e funcionalmente.

#### **4.7 – Bibliografia**

ABDEL-MONEIM, A.M.; et al. Gill oxidative stress and histopathological biomarkers of pollution impacts in Nile tilapia from Lake Mariut and Lake Edku, Egypt. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 24, 148-160, 2012.

AKAISHI, F.M.; et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, 244-253, 2004.

ALLINGER, N. L.; et al. (1978). **Química orgânica**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, 1978. 961p.

BARJA-FERNÁNDEZ, S.; MÍGUEZ, J.M.; ÁLVAREZ-OTERO, R. Histopathological effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in the gills, intestine and liver of turbot (*Psetta maxima*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 95, 60-68, 2013.

BIAGINI, F.R.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**, v. 40, 839-844, 2009.

CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, 83-91, 2002.

EIRAS-STOFELLA, D.R.; CHARVET-ALMEIDA, P. Ultrastructure (SEM) of the gills of *Prochilodus scrofa* steindachner (Pisces, Teleostei). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 2; 279-287, 1998.

FERNANDES, M. N., S. A. PERNA; S. E. MORON. Chloride cells apical surface changes in gill epithelia of the armoured catfish, *Hypostomus plecostomus* L. during exposure to distilled water. **Journal of Fish Biology**, 52: 844-849. 1998.

FERNANDES, M.N.; et al. Organochlorines and metals induce changes in the mitochondria-rich cells of fish gills: Na integrative Field study involving chemical, biochemical and morphological analyses. **Aquatic Toxicology**, v. 126, 180-190, 2013.

FISHELSON, L. Scanning and transmission electron microscopy of the squamose gill-filament epithelium from fresh- and seawater adapted tilapia. **Environmental Biology of Fishes**, v. 5, n. 2, 161-165, 1980.

KENNEDY, C.; MCKINLAY, D. Fish response to toxic environments. **In: 6<sup>th</sup> International Congress on the Biology of Fish**, 1998, Baltimore MD. Symposium Proceedings, Baltimore: Towson University, 1998, 1-168.

MARTINEZ, C.B.R.; et al. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 4, 797-807, 2004.

MONTEIRO, E.T. **Avaliação de biomarcadores em vertebrados aquáticos face à exposição aguda de cobre no meio**. 2012, 60f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2012.

PREVORCNIK, S.; JUGOVIC, J.; SKET, B. Geography of morphological differentiation in *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae) **Journal of Systematics and Evolutionary Research**, v. 47, n.2 124-131, 2009.

PROCÓPIO, M.S.; et al. **Gill epithelium structure and cellular composition of *Prochilodus argenteus* (Pisces: Prochilodontidae) as an environmental biomarker**. **In: XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise**, 2009, Belo Horizonte. Anais do XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2009.

PROCÓPIO, M.S.; et al. **Rodlet cell as environmental biomarker in Gill of curimba (*Prochilodus argenteus*): Assessment of gender influence by light and electron microscopy**. **In: XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise**, 2011, Búzios. Anais do XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Búzios: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2011.



PUERTO, M.; et al. Dietary N-acetylcysteine (NAC) prevents histopathological changes in tilápias (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. **Aquaculture**, v. 306, 35-18, 2010.

RAMESH, F.; NAGARAJAN, K. Evaluation of DNA damage of the fish *Clarias batrachus* exposed to sago effluent using the comet assay. **European International Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 3, 12-16, 2013.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. DNA damage of erythrocytes of fish *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), after acute exposure to river water receiving affluent from an oil refinery. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 7, n. 2, 17-22, 2012.

TORRES, G.A.R.; GONZÁLEZ, S.P.; PEÑA, E.S. Descripción anatómica, histológica y ultraestructural de La brânquia e hígado de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Morphology**, v. 28, n. 3, 703-712, 2010.

WILSON, J.M.; LAURENTI, P. Fish gill morphology: Inside out. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, 192-213, 2002.

## 4.8 – Imagens

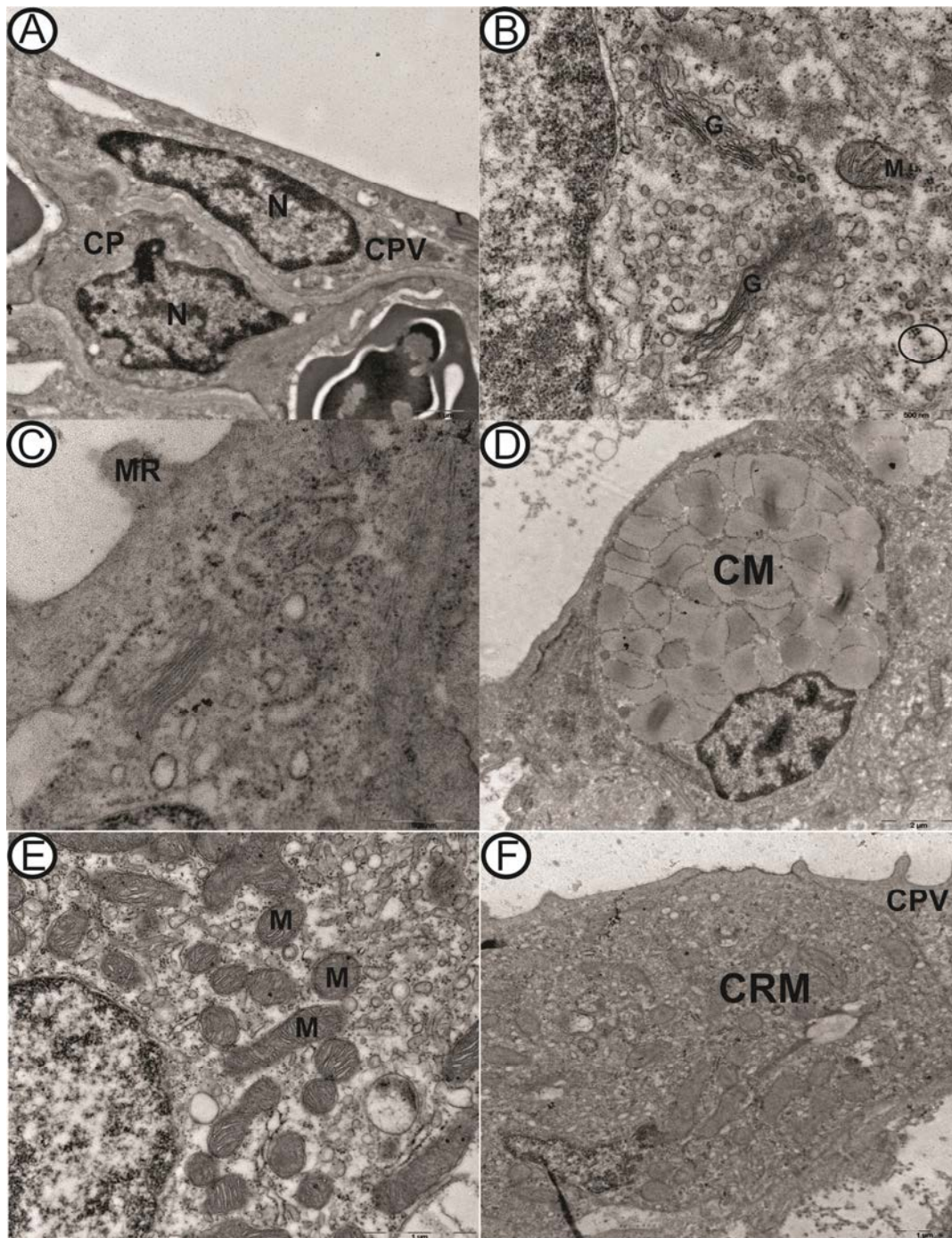


Figura 1: A: Micrografia do grupo controle, exemplificando uma célula pavimentosa (CPV), com núcleo alongado (N) e uma célula pilar (CP), com núcleo irregular, e posicionada entre células pavimentosas, para delimitar o espaço para a passagem de eritrócitos. B: Citoplasma de uma célula pavimentosa do controle, evidenciando complexos de Golgi (G), mitocôndrias arredondadas (M) e ribossomos livres (área em destaque). C: Microridge (MR) de uma células pavimentosa do grupo controle. D: Célula de Muco do grupo controle (CM), observe o núcleo basal, e toda a região apical repleta de vesículas de secreção. E: Mitocôndrias alongadas características de uma célula rica em mitocôndrias do grupo controle. F: Célula rica em mitocôndrias (CRM) do grupo controle, observe que apenas uma pequena região de sua membrana plasmática está exposta ao meio.

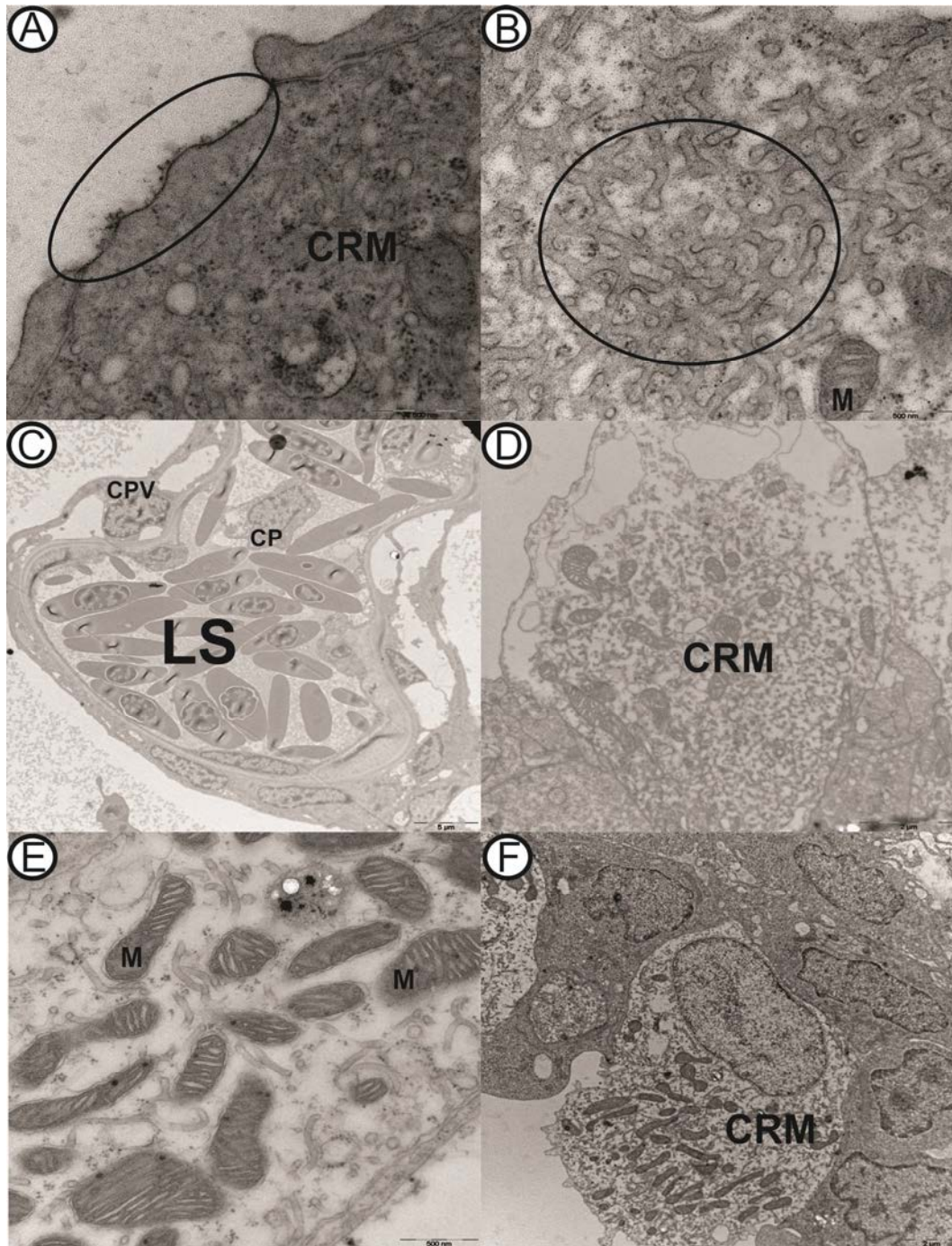


Figura 2: A: Célula rica em mitocôndrias (CRM), observe na área em destaque, a região da membrana plasmática exposta ao meio externo, coberta por uma camada de glicocálix. B: Citoplasma de uma célula rica em mitocôndrias, observe na área em destaque a complexa rede formada pelo retículo endoplasmático. C: Aneurisma na lamela secundária (LS) característico da exposição a ambos os poluentes, Observe as células pilares (CP) desprendidas, e células pavimentosas, com parte de seu citoplasma descolado. D: Célula rica em mitocôndrias após a exposição aos poluentes, observe a degradação e vacuolização citoplasmática. E: Célula rica em mitocôndrias após a exposição aos poluentes, observe a dilatação das cristas e o aumento do espaço intermembrana nas mitocôndrias (M). F: Célula rica em mitocôndrias após a exposição aos poluentes, observe o aumento da área da membrana plasmática exposta ao meio.



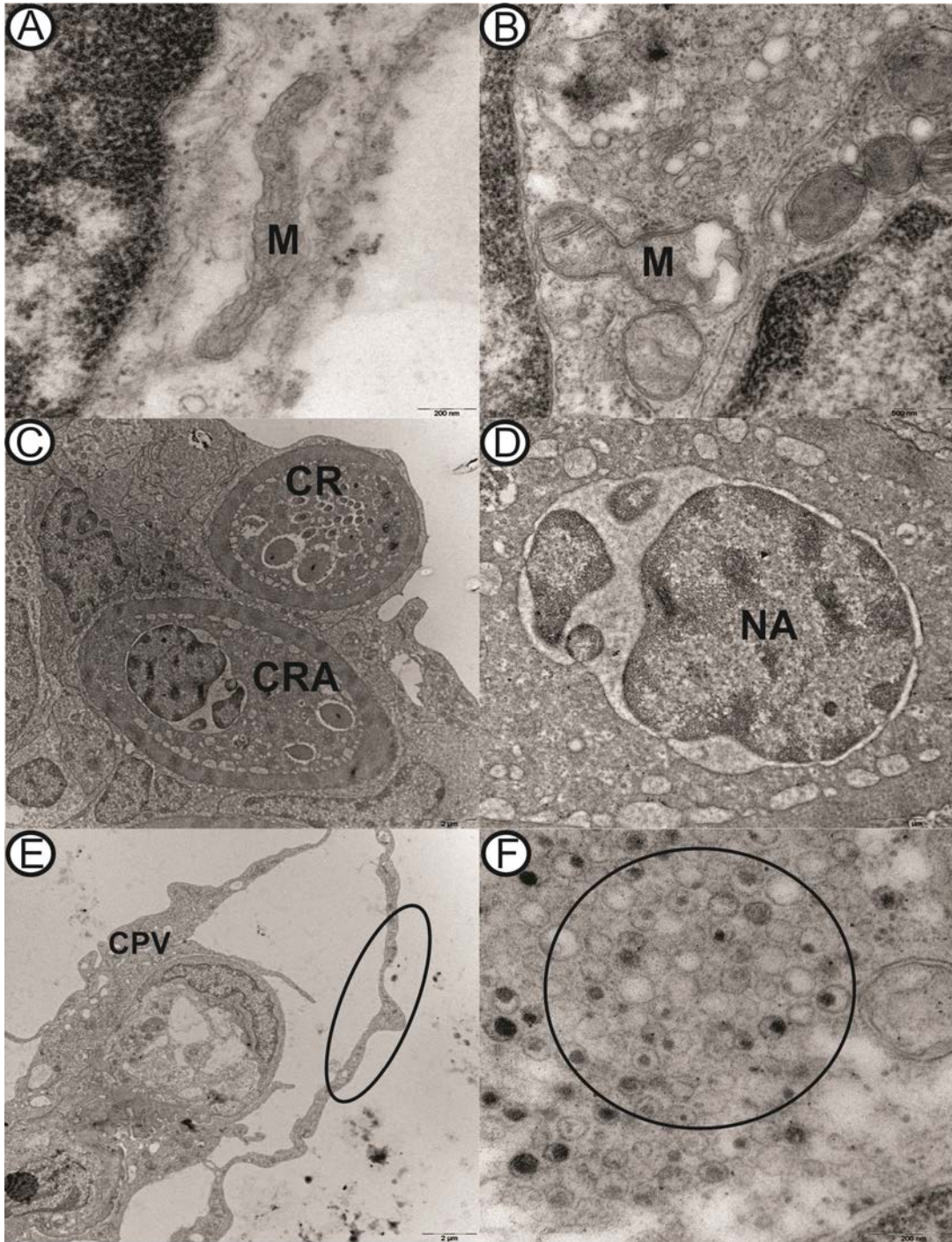


Figura 3: A: Mitocôndrias fundidas (M) em uma célula pavimentosa exposta ao lago urbano. B: Mitocôndria degenerada após a exposição à diluição de detergente. C: Células rodlet (CR) e uma em processo de apoptose (CRA), observe a formação de corpos apoptóticos. D: Núcleo de uma célula pavimentosa em processo de apoptose (NA) observe a fragmentação do material genético. E: Célula pavimentosa (CPV) na lamela secundária, após a exposição à água do lago urbano, observe a redução de volume citoplasmático e descolamento do mesmo (área destacada). F: Concentração de peroxissomos em uma célula pavimentosa após a exposição à água do lago urbano.

**Considerações finais:**

- A espécie *P. lineatus* mostrou-se ser um bioindicador mais sensível, notado pela taxa de sobrevivência durante a exposição aos contaminantes, ao contrário da espécie *A. altiparanae* que se mostrou muito resistente.
- O LAS deve realmente atuar muito mais como um facilitador para a bioacumulação de outros contaminantes do que como agente estressante, uma vez que os danos descritos na literatura, com o composto isolado são menores do que os observados nesse trabalho; e mesmo em concentrações não tóxicas, outros poluentes alteram os tecidos em sua presença.
- As metodologias quantitativas devem ser mais exploradas em trabalhos morfológicos em peixes, pois existe a real necessidade de se transformar dados qualitativos tanto de histologia quanto de histoquímica em quantitativos.
- A lipofuscina realmente acumula-se após a exposição a ambientes perturbados e promove a degradação rápida dos componentes celulares, que só deveria acontecer durante o processo gradual de envelhecimento celular. Entretanto a renovação celular causada por este processo pode dificultar estudos nessa linha de pesquisa.

**Referência geraiss:**

AGUIAR, L.H. et al. Metabolical effects of folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environ. Res.**, San Diego, v. 95, p. 224-230, 2004.

ALLINGER, N. L.; et al. **Química orgânica**, 2ª Edição. Tradução de Alencastro, R. B.; Peixoto, J. S.; Pinho, L. R. N. Rio de Janeiro: LTC, 1978..

ARKING, R. **Biologia do Envelhecimento**. 2ª Edição. Riberão Preto – SP. Editora FUNPEC, 2008.

BOLS, N. C.; et al. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Dev. Comp. Immunol.** 853-873. 2001.

BOLS, N.C., et al. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. In: Mohn, T.W., Mommsen, T.P. **Bio - chemistry and Molecular Biology of Fishes**, vol. 6. Elsevier Science, Amsterdam - Netherlands. 2005.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. Brasília: CODEVASF, 1988.

EVANS, D.H.. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. **The American Journal of Physiology**, 295, 704-713, 2008.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil. Subordem Characidae**. Ed. Franciscana. São Paulo, v. 4, p. 847, 1975.

GOMIEIRO, L.M.; BRAGA, F.M.S.. O lambari *Astyanax altiparanae* (Characidae) pode ser um dispersor de sementes? **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá, v. 25, no. 2, p. 353-360, 2003

GURGEL, H. G.B.. Estrutura populacional de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, V.21, 2004.

JIRAUNGKOORSKUL, W. et al. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Sci. Asia.**, New Delhi, v. 28, n. 2, p. 121-127, 2002.

JÚNIOR, O. O. M.; et al. Estudo macular na doença de Stargardt. **Arq Bras Oftalmol.** V.71, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. . **Histologia Básica.** 10 ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

KISHI, S.; et al. The Identification of Zebrafish Mutants Showing Alterations in Senescence-Associated Biomarkers. **PLOS Genetics.** V. 4, Issue 8, 2008.

MACHADO, M. R. . Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **Unopar Científica**, Londrina, v. 1, nº 1, p. 63-76, 1999.

MADUENHO, L.P.; MARTINEZ, C.B.R.. Acute Effects of Diflubenzuron on the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, submetido ao final de 2007.

MAURO, C. A. de. Rio Claro – O lançamento “in natura” de esgotos em corpos d’água. **In: Curso de extensão universitária: vamos conhecer Rio Claro.** Laboratório de Planejamento Municipal – LPM, DEPLAN – IGCE/UNESP, Rio Claro, p. 67-86, 1993.

MELENDI, L. I. H.; et al. **Pigmentos de lipofuscina en el niño. Tecnicas especiales para su demostracion.** 7º Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica, 1 a 31 de outubro de 2005.

NILSSON, G. E.; **Gill remodeling in fish – a new fashion or an ancient secret? The Journal of Experimental Biology.** Publicado online em junho 2007.

NOMURA, H. Fecundidade, maturação sexual e índice gônado-somático de lambaris do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae), relacionados com fatores ambientais. **Rev. Brasil. Biol.**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 4, p. 775-798, 1975.

PAULETE, J.; BEÇAK, W. **Técnicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, 1976. 2 Vols.

PEREIRA, B.F. ; Caetano, F.H. . Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish. **Micron**, v. 40, p. 783-786, 2009.

PERRY, S. F. The Chloride Cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. **Annual Review of Physiology**, vol. 59, p.325-47, outubro 1997.

PERRY, S.F.; WALSH, P.J.. Metabolism of isolated fish gill cells: Contribution of epithelial chloride cells. **The Journal of Experimental Biology**. n.144, 507-520, 1989 .

POUGH, H; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 3.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2003.

RADU, R.A.; et al. Reductions in Serum Vitamin A Arrest Accumulation of Toxic Retinal Fluorophores: A Potential Therapy for Treatment of Lipofuscin-Based Retinal Diseases. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 46:4393-4401, 2005.

RAMSDORF, W.. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B e A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangiiri – UFPR)**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de genética da Universidade Federal do Paraná. 127p, Curitiba, 2007.

RAND, G.M. Effects, environmental fate and risk assessment. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Second Edition. Washington, DC. 1995.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high Ph electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of cell Biology**, v. p.208-212. 1963.



ROMÃO, S.; et al. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, vol. 49 n° 3. May 2006.

ROY, D., Statistical analysis of anionic detergent-induced changes in the goblet mucous cells of opercular epidermis and gill epithelium of *Rita rita* (Ham.) (Bagridae: Pisces), **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 15 , pp. 260–271, 1988.

SILVA, R. G. da. **Análise da estrutura genética populacional do curimatá (*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae) na região da bacia do Rio Grande, SP.** 112f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade do Estado de São Paulo, São Paulo, 2006.

SILVA, M.M.; SILVA, V.H..Envelhecimento: importante fator de risco para o câncer. **Arq. Med. ABC**, v. 30, n° 1, 2005.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 69, Janeiro 2008, p.112-120.

TERMAN, A.; BRUNK, U.. Lipofuscin: Mechanisms of formation and increase with age. **APMS**, 1998.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E.. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e aplicações**. São Carlos, SP. Editora RiMa. 2006.

## Anexos

## Anexo 1



Campus Universitário "Duse Rüeegger Ometto"

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E MÉRITO CIÊNCIAFICO - UNIARARAS  
Fone: 1935431400  
Parecer N° 646/2009

## IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

**Título:** Análise dos efeitos da exposição a ambientes poluídos na morfologia e no envelhecimento precoce, de brânquias e fígado em peixes

**Pesquisador Responsável:** Dr. Flávio Henrique Caetano

**Parecer:** O Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico - Uniararas, após acatar os pareceres dos membros / relatores previamente designados para o presente caso e atendendo os dispositivos das resoluções 196/96, resolve aprovar, sem pendências o protocolo supracitado.

Decisão Homologada na reunião do dia 13/10/2009.

*Ivan José Lautenschleguer*  
Professor Doutor Ivan José Lautenschleguer  
COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E  
MÉRITO CIÊNCIAFICO - UNIARARAS

## Anexo 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"



INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
Laboratório de Hidrogeologia e Hidrogeoquímica – H<sub>2</sub>L

## RELATÓRIO DE ANÁLISES QUÍMICAS

Interessado: Flávio Caetano

Material Entregue Declarado: Água

Natureza do Trabalho: Diversas Determinações

Referência: 3 amostras abaixo identificadas

**RESULTADOS:**

H <sub>2</sub> L No.	Amostra Identif.	Temp. °C	Cond. µS/cm	pH	Alcalinidade		Li mg/L	Na mg/L	NH <sub>4</sub> mg/L	K mg/L
					HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/L	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> mg/L				
4184	Controle 08/06/11	15,6	282	5,39	1,2	ND	< 0,01	17,5	10,7	6,39
4185	Detergente 08/06/11	15,4	237	6,04	4,9	ND	< 0,01	20,1	2,15	6,68
4186	Lago Azul 08/06/11	15,5	179	7,17	59,3	ND	< 0,01	16,9	0,76	3,94

H <sub>2</sub> L No.	Amostra Identif.	ClO <sub>2</sub> <sup>-</sup> mg/L	F <sup>-</sup> mg/L	Cl <sup>-</sup> mg/L	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> mg/L	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/L	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> mg/L	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> mg/L	Acetato mg/L	C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> mg/L
4185	Detergente 08/06/11	<0,01	0,23	5,56	1,15	106	9,33	10,4	<0,10	<0,03
4186	Lago Azul 08/06/11	<0,01	0,40	16,7	0,86	8,78	<0,14	15,1	<0,10	<0,03

H <sub>2</sub> L No.	Amostra Identif.	Al mg/L	Ba mg/L	Ca mg/L	Cd mg/L	Co mg/L	Cr mg/L	Cu mg/L	Fe mg/L
4185	Detergente 08/06/11	0,079	0,092	17,8	< 0,010	< 0,010	< 0,010	0,010	0,029
4186	Lago Azul 08/06/11	0,15	0,027	18,7	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	0,16

H2L	Amostra	Mg	Mn	Ni	P	Pb	Si	Sr	Zn
No.	Identif.	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
4184	Controle 08/06/11	3,69	0,27	< 0,010	6,79	< 0,020	5,72	0,12	0,84
4185	Detergente 08/06/11	4,55	0,21	0,066	3,46	< 0,020	6,30	0,12	0,50
4186	Lago Azul 08/06/11	3,33	0,089	< 0,010	< 0,10	< 0,020	4,27	0,10	0,050

As análises estão baseadas no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21ª edição, 2005.

Os metais foram analisados por Espectrometria de Emissão Atômica com Fonte de Plasma de Argônio Indutivo (ICP-AES).

**Quím. Responsável: MSc. Mirtis I. Ariza Malagutti - CRQ: Pr. 23.478/81**

Rio Claro, 27 de julho de 2011.

---

MSc. Mirtis Irene Ariza Malagutti

Parâmetro	LQ H <sub>2</sub> L (mg L <sup>-1</sup> )	VMP		Parâmetro	LQ H <sub>2</sub> L (mg L <sup>-1</sup> )	VMP	
		RDC 274 (mg L <sup>-1</sup> )	Portaria 518 (mg L <sup>-1</sup> )			RDC 274 (mg L <sup>-1</sup> )	Portaria 518 (mg L <sup>-1</sup> )
Cátions				Ânions			
Alumínio	0,010	---	0,2	Acetato	0,12	---	---
Bário	0,005	0,7	0,7	Bicarbonato	2,00	---	---
Cádmio	0,010	0,003	0,005	Bromato	0,01	---	0,025
Cálcio	0,050	---	---	Brometo	0,19	---	---
Chumbo	0,020	0,010	0,01	Carbonato	2,00	---	---
Cobalto	0,010	---	---	Cloreto	0,01	---	250
Cobre	0,010	1	2	Clorito	0,01	---	0,2
Cromo	0,010	0,05	0,05	Fluoreto	0,01	---	1,5
Estrôncio	0,003	---	---	Fosfato	0,14	---	---
Ferro	0,010	---	0,3	Nitrato	0,06	50	10*
Lítio	0,01	---	---	Nitrito	0,04	0,02	1*
Magnésio	0,025	---	---	Oxalato	0,02	---	---
Manganês	0,010	0,5	0,1	Sulfato	0,02	---	250
Níquel	0,010	0,02	---				
Potássio	0,04	---	---				
Silício	0,20	---	---				
Sódio	0,01	---	200				
Vanádio	0,010	---	---				
Zinco	0,010	---	5				

Observações:

\* Calculado como N

VMP – valor máximo permitido

LQ – limite de quantificação