

GABRIELA PUSTIGLIONE MARINSEK

ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS NO INTESTINO DE
Sphoeroides testudineus DECORRENTES DE DIFERENTES NÍVEIS
DE CONTAMINAÇÃO EM TRÊS ESTUÁRIOS DO LITORAL DO
ESTADO DE SÃO PAULO

SÃO VICENTE – SP
2018

ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS NO INTESTINO DE
Sphoeroides testudineus DECORRENTES DE DIFERENTES NÍVEIS
DE CONTAMINAÇÃO EM TRÊS ESTUÁRIOS DO LITORAL DO
ESTADO DE SÃO PAULO

PÓS-GRADUANDA: GABRIELA PUSTIGLIONE MARINSEK

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. RENATA DE BRITTO MARI

COORIENTADOR: PROF^o. DR^o. DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

574.5222 Marinsek, Gabriela Pustiglione
M339 Alterações morfofuncionais no intestino de *Sphoeroides testudineus* decorrentes de diferentes níveis de contaminação em três estuários do Litoral do Estado de São Paulo / Gabriela Pustiglione Marinsek. - São Vicente, 2018.
84 p.: il, figs., gráfs.,

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências.
Orientadora: Renata de Britto Mari
Co-orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

1. Estuários - Contaminação. 2. Ecotoxicologia aquática. 3. Biomarcadores. 4. Baiacu (Peixe). 5. Litoral - São Paulo (Estado). I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS NO INTESTINO DE *Sphoeroides testudineus* DECORRENTES DE DIFERENTES NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO EM TRÊS ESTUÁRIOS DO LITORAL DO ESTADO DE

AUTORA: GABRIELA PUSTIGLIONE MARINSEK

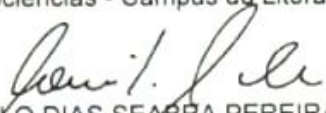
ORIENTADORA: RENATA DE BRITTO MARI

COORDENADOR: DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, área: Biodiversidade pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. RENATA DE BRITTO MARI
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP



Prof. Dr. CAMILO DIAS SEABRA PEREIRA
Departamento de Ciências do Mar / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Campus Baixada Santista - Santos/SP



Profa. Dra. KARINA MARTINEZ GAGLIARDO
Centro Universitário Monte Serrat (UNIMONTE)

São Vicente, 28 de setembro de 2018

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do sistema nervoso entérico como bioindicador de impacto ambiental em peixes", Protocolo **04/2017 - CEUA**, sobre a responsabilidade da **Profa. Dra. Renata de Britto Mari e Gabriela Pustiglione Marinsek**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA, do Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista, em reunião de 08/05/2017.

Vigência do Projeto:	01/08/2016 a 01/08/2018
Espécie/linhagem:	Balacó pintado (<i>Sphaeroides testudineus</i>)
Número de animais:	60 exemplares
Peso/Idade:	Não definido/Adulto
Sexo:	30 machos / 30 fêmeas
Origem:	Estação Ecológica da Jureia-Itatins, Sistema Estuarino de Santos-São Vicente e Bertinga

São Vicente, 08 de maio de 2017.



Prof. Dr. Rafael Mendonça Duarte

*Dedico este trabalho à minha família, que sempre foi exemplo
de retidão e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha querida orientadora, Prof. Dra. Renata de Britto Mari, por todo apoio durante todos estes anos de convivência e por sempre ter acreditado em meu trabalho. Me espelho no exemplo de profissional que você sempre foi para mim, obrigada!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa, por ter aberto as portas de seu laboratório e por aceitar firmar essa parceria.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo projeto de auxílio financeiro (processo: 2014/07793-9).

Aos queridos Paloma e Rodrigo, por toda ajuda e apoio durante o desenvolvimento deste e de demais trabalhos.

Ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros (PPG-BAC) e a UNESP pela oportunidade de formação acadêmica e profissional.

Ao Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMar – UNESP) que, além de me fornecer os equipamentos necessários para o desenvolvimento desta pesquisa, me ofereceu grandes amigos.

Aos colegas do Laboratório de Morfofisiologia Animal (LABMA-UNESP) pelo convívio prazeroso e pela ajuda durante as madrugadas de coletas. Principalmente aos queridos Lory, Alexandre e Nathália que se envolveram diretamente com meu mestrado, me ajudando a tornar este projeto possível.

Aos colegas do Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA), por terem me recebido tão bem e pela oportunidade de crescimento profissional

Aos meus pais, Silvia e Francisco, e aos meus irmãos, Bruno e Luiza e a minha companheira de jornada Lory por, simplesmente, tudo. Vocês são a minha base e a minha razão para continuar.

Aos grandes amigos que a graduação e a pós-graduação me ofereceram, que sempre estiveram de prontidão para as horas boas e ruins, muito obrigada!

Ao universo, que de alguma forma contribuiu para a conclusão deste trabalho. Gratidão!

“Tenho esperança de que um maior conhecimento do mar, que há milênios dá sabedoria ao homem, inspire mais uma vez os pensamentos e as ações daqueles que preservarão o equilíbrio da natureza e permitirão a conservação da própria vida”.

- Jacques Cousteau

RESUMO

As zonas costeiras são ambientes altamente sensíveis aos impactos causados pelas atividades antropogênicas, e o uso desenfreado destas áreas vem gerando grande preocupação, uma vez que tais impactos estão reduzindo drasticamente a biodiversidade destes ecossistemas. O monitoramento destas áreas é de grande valia para detectar os principais impactos e, assim, criar medidas de prevenção e mitigação, sendo realizado através da utilização de biomarcadores, uma vez que estas ferramentas proporcionam a análise das respostas biológicas dos organismos a exposição a contaminação ambiental. Desta forma, este trabalho objetivou avaliar a qualidade ambiental de dois estuários da costa do estado de São Paulo que diferem quanto a densidade demográfica e políticas de preservação ambiental. Para tanto, exemplares de *Sphoeroides testudineus* foram coletados em três regiões, sendo estas: AR – Estuário do Rio Una (Área Referência - Mosaico Juréia Itatins), A1 – Estuário de Cananéia (Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia Iguape) e A2 – Estuário de Santos (Complexo Estuarino de Santos – São Vicente). Os animais foram analisados quanto a biomarcadores de diferentes órgãos (fígado, brânquias, sangue, músculo e intestino) e níveis de organização biológica a fim de proporcionar uma resposta integrada quanto a saúde do organismo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade ambiental dos estuários através da utilização de biomarcadores amplamente utilizados em estudos ecotoxicológicos (fígado, brânquias, músculo e sangue), bem como, avaliar a resposta do intestino e dos neurônios mioentéricos neste cenário. Em A1, as principais alterações nos biomarcadores ocorreram principalmente no fígado (alterações bioquímicas e histopatológicas); em A2, as alterações foram mais expressivas nas brânquias, intestino, músculo e sangue, indicando alterações sistêmicas nos organismos coletados nesta região. Conclui-se, portanto, que a reduzida qualidade ambiental de A2 tem acarretado em alterações severas principalmente nas brânquias e intestino dos animais coletados.

Palavras chave: contaminação, estuário, baiacu, biomarcadores

ABSTRACT

Coastal zones are highly sensitive to the impacts caused by anthropogenic activities, and the unrestrained use of these areas is of great concern since such impacts are drastically reducing the biodiversity of such ecosystems. The monitoring of these areas is of great value to detect the main impacts and, thus, to create prevention and mitigation measures. The use of biomarkers is widely used in studies that evaluate environmental quality since this tool provides the analysis of organisms' biological responses to exposure to environmental contamination. In this way, this work aimed to evaluate the environmental quality of two estuaries located at the coast of the state of São Paulo that differ in terms of population density and environmental preservation policies. In order to do so, specimens of *Sphoeroides testudineus* were collected in three regions: AR- Rio Una Estuary (Reference Area - Juréia Itatins Mosaic), A1 - Cananéia Estuary (Lagunar Estuary Complex of Cananéia Iguape) and A2 - Santos Estuary (Estuarine Complex of Santos - São Vicente). The animals were analyzed for biomarkers of different organs (liver, gills, blood, muscle, and intestine) and levels of biological organization in order to provide an integrated response to the health of the organism. Thus, the objective of this study was to evaluate the environmental quality of the estuaries using biomarkers widely used in ecotoxicological studies (liver, gills, muscle, and blood), as well as to evaluate the response of intestine and myenteric neurons in this scenario. In A1, the main changes in biomarkers occurred mainly in the liver (biochemical and histopathological changes); in A2, the alterations were more expressive in the gills, intestine, muscle, and blood, indicating systemic alterations in the organisms collected in this region. It is concluded, therefore, that the worse environmental quality of A2 has caused severe alterations mainly in the gills and intestine of the animals collected.

Key-words: contamination, estuary, puffer fish, biomarkers

Lista de Siglas

AR – Área referência – Estuário do Rio Una, Mosaico Juréia – Itatins

A1 – Área 1 – Estuário de Cananéia, Área de Proteção Ambiental de Cananéia – Iguape – Peruíbe

A2 – Área 2 – Estuário de Santos, Complexo estuarino de Santos – São Vicente

SNE – Sistema Nervoso Entérico

AChE – Acetilcolinesterase

MN – Micronúcleo

NA – Anomalias nucleares

AMP – Área Marinha Protegida

GPx – Glutathione Peroxidase

GST – Glutathione S-transferase

GSH – Tiois não proteicos reduzidos

LPO – Peroxidação lipídica

FC – Fator de Condição

IHS – Índice hepatossomático

CLS – Comprimento da lamela secundária

LLS – Largura da lamela secundária

DIL – Distância inter-lamelar

EEB – Espessura do epitélio basal

HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

PCBs – Bisfenilas policloradas

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVAS.....	11
Contaminação de ambientes costeiros	14
Conservação da Zona Costeira – Estado de São Paulo	15
OBJETIVOS GERAIS	17
Capítulo I - Avaliação da qualidade ambiental de três estuários da costa de São Paulo através da utilização de biomarcadores morfofisiológicos em peixes.	18
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1.INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1. Regiões de Estudo	22
2.2. Coleta e Preparação de Amostras.....	23
2.3. Biomarcadores Somático.....	24
2.3.1. Determinação do fator de condição (FC) e índice hepatossomático (IHS).....	24
2.4. Biomarcadores Genotóxicos	24
2.4.1. Teste do micronúcleo e anomalias nucleares em sangue periférico.....	24
2.5. Biomarcadores Bioquímicos.....	25
2.5.1. Determinações bioquímicas.....	25
2.6. Biomarcadores Morfológicos	26
2.6.1. Análise histopatológica e morfométrica	26
2.7. Tratamento de dados	27
3. RESULTADOS.....	28
3.1. Fator de Condição e Índice Hepatossomático	29
3.2. Micronúcleo e Alterações Nucleares	29
3.3. Biomarcadores bioquímicos.....	30
3.4. Análise Histopatológica e Morfométrica	32
3.5. Análise Multivariada.....	39
4. DISCUSSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	47
Capítulo II - Análise integrada do intestino de <i>Spherooides testudineus</i> em estuários com diferentes níveis de contaminação ambiental: um novo modelo de biomarcadores.....	53

RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1. Bioindicador.....	57
2.2. Regiões de Estudo	57
2.3. Coleta dos Parâmetros Físico – Químicos da Água.....	59
2.4. Coleta do Material.....	59
2.5. Análise Histológica e Morfométrica do Intestino	60
2.6. Evidenciação dos neurônios mioentéricos	61
2.6.1.Detecção da população geral de neurônios mioentéricos – Técnica de Giemsa (Barbosa, 1978)	61
2.6.2.Detecção dos neurônios mioentéricos NADH – diaforase positivos (Gabella, 1987) e NADPH-diaforase positivos (Santer, 1994)	61
2.7. Densidade e Morfometria neuronal.....	62
2.8. Análises Bioquímicas	62
2.9. Tratamento de dados	63
3. RESULTADOS.....	63
3.1. Biomarcadores de Morfofisiologia Intestinal.....	64
3.1.1. Análise Histopatológica e Morfométrica do Intestino.....	64
3.2. Densidade e Morfometria dos Neurônios Mioentéricos	66
3.3. Biomarcadores Bioquímicos	68
3.4. Análise Multivariada e n-MDS.....	69
4. DISCUSSÃO.....	70
REFERENCIAS.....	76
CONCLUSÕES GERAIS.....	82
REFERENCIAS	83

INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVAS

Contaminação de ambientes costeiros

É sabido que as atividades humanas são responsáveis pelo declínio considerável da diversidade biológica mundial (Lovejoy, 1997). Principalmente no ambiente marinho a sobre-exploração de recursos pesqueiros, o descarte de lixo, a contaminação, a introdução de espécies exóticas e as mudanças climáticas vem causando alterações ecossistêmicas e consequente redução nas populações (Vikas e Dwarakish, 2015).

A presença de contaminantes, o descarte de resíduos inadequados e a perda de habitat podem ser considerados problemas pequenos e pontuais quando analisados separadamente, contudo, o estudo da poluição pode servir para analisar os eventos futuros causados pela contaminação, antecipando os efeitos da poluição sobre a biota e, consequentemente, sobre toda a diversidade biológica (Cross et al., 1985).

Aproximadamente cerca de três bilhões de pessoas vivem próximas às regiões costeiras, criando laços totalmente dependentes de seus recursos, principalmente através da alimentação e matéria prima fornecidas por estes ecossistemas (Moore et al., 2004). Contudo, a elevada densidade demográfica e o uso descomedido dos recursos ambientais geram consequências desastrosas a estes ecossistemas, principalmente devido ao despejo de efluentes industriais e domésticos (Moore et al., 2004).

Ambientes estuarinos levam atenção especial por se tratarem de ambientes transicionais parcialmente fechados, onde a água do mar é altamente diluída pelas águas continentais (Trujillo e Thurman, 1999). Por possuírem características biológicas importantes do ponto de vista ecológico e econômico, estes ambientes frequentemente abrigam áreas de elevada atividade antropogênica, o que os torna altamente susceptíveis aos impactos ambientais (Trujillo e Thurman, 1999).

Diversos estressores podem ser encontrados nos ambientes estuarinos ao longo de todo o mundo, sendo que, dentre os destaques encontram-se principalmente:

Fertilizantes, pesticidas e agroquímicos: estima-se que as atividades agrícolas contribuam em 50% com a poluição aquática mundial através da geração de resíduos (Duursma e Marchand, 1974). É reportado que estes resíduos estão entre os agentes mais devastadores dos ecossistemas aquáticos, prejudicando toda a cadeia trófica através de fenômenos como bioconcentração e biomagnificação.

Esgoto e efluentes domésticos e industriais: O esgoto dispensado nos corpos aquáticos contém uma gama de compostos domésticos e industriais, restos de animais, resíduos de produtos

de higiene, medicamentos, matéria orgânica, entre outros. A presença de bactérias nestes efluentes reduz a concentração de oxigênio dissolvido na água, levando a hipóxia do ambiente.

Metais: Metais pesados e metais traços são produtos de atividades industriais, e são considerados perigosos para os organismos aquáticos quando estão na forma de cátions, uma vez que conseguem se ligar as cadeias curtas de carbono, podendo, então bioacumular nos organismos e se concentrar ao longo dos anos. Dentre os metais que mais apresentam toxicidade para os organismos estão: mercúrio, cádmio, prata, níquel, selênio, chumbo, cobre, cromo, arsênio e zinco (Rainbow, 1995).

Compostos orgânicos: diversos compostos orgânicos sintéticos como organoclorados, organofosforados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e organometais vem causando grande preocupação devido a sua elevada toxicidade e persistência no ambiente. Além disso, por serem lipofílicos, tais compostos tem a capacidade de biocentralização/bioacumulação (Ali e Sreekrishnan, 2001).

Plástico: Os plásticos são compostos orgânicos sintéticos derivados do petróleo, sendo os maiores poluentes macroscópicos dos oceanos, devido a sua versatilidade e amplo uso ao longo de todo o mundo. Além disso, quando seus polímeros são submetidos a radiação UV, são fragmentados em porções cada vez menores e persistentes no ambiente, aumentando sua disponibilidade aos diversos níveis tróficos (Derraik et al., 2002).

Conservação da Zona Costeira – Estado de São Paulo

A Zona Costeira do Estado de São Paulo é dividida em quatro setores agrupados a fim de melhorar a gestão costeira, sendo estes: Litoral Norte, Baixada Santista, Complexo Estuarino Lagunar de Iguape-Cananéia e Vale do Ribeira. Toda esta extensão mantém áreas preservadas (SMA, 2005).

De maneira geral, os setores se diferenciam pelas diferentes atividades, sendo que o setor da Baixada Santista se destaca principalmente pela elevada densidade demográfica (cerca de 1,7 milhões de habitantes), além de abrigar o maior porto da América Latina e o complexo industrial de Cubatão; o litoral Norte se caracteriza pelo turismo de veraneio e consequente especulação imobiliária, também possuindo atividades portuário-industriais em cidades como São Sebastião e Caraguatatuba; finalmente, a região do Vale do Ribeira e do Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia Iguape possuem contínuos de mata atlântica altamente preservados, associados a pequenas cidades onde se predominam atividades pesqueiras, rurais e de turismo (Sousa e Serafini, 2018).

Embora todos os setores apresentem algum tipo de unidade de conservação, a eficiência destas depende intimamente da implementação dos instrumentos de gestão, do conselho gestor e do plano de manejo (Sousa e Serafini, 2018).

Devido a intensa ação antropogênica, é necessário que haja programas de monitoramento nos ambientes costeiros que avaliem a relação da biota com os impactos causados; para tanto, existem programas de biomonitoramento, os quais se utilizam de parâmetros biológicos para medir a qualidade do ecossistema através das respostas dos organismos em relação ao meio em que vivem (Matthews et al., 1982), auxiliando assim na elaboração de planos de manejo destas regiões.

Durante muitos anos a avaliação da qualidade ambiental enfocava-se na detecção dos contaminantes presentes nas porções abióticas do ecossistema (Van der Oost et al., 1996; Silva et al., 2001). Os estudos de biomonitoramento direcionados a avaliação da ação dos contaminantes nos organismos vivos são mais recentes, sendo amplamente utilizados em ambientes estuarinos (Sardi et al., 2016; Oliva et al., 2017; Kammann et al., 2017).

A grande maioria dos estudos de monitoramento ambiental avaliam ambientes que são altamente antropizados, deixando de lado áreas marinhas protegidas (AMPs). As AMPs são áreas de proteção estabelecidas para assegurar o bem-estar dos ambientes marinhos, preservando tais patrimônios para usufruto das populações futuras (Scherl et al., 2006). De forma geral, a intenção de uma AMP é garantir o equilíbrio dos processos ecossistêmicos para que as diversas populações de organismos que ali habitam possam crescer e se reproduzir adequadamente (Houde, 2001).

Contudo, estas áreas são planejadas e gerenciadas seguindo os critérios adotados para unidades de conservação terrestres, embora as diferenças entre elas sejam substanciais (Houde, 2001). Dentre os fatores que as diferenciam pode-se ressaltar que os ecossistemas marinhos são conectados em escalas mais amplas, uma vez que a maioria dos organismos aquáticos pode se locomover por longas distancias (CNUDM, 1982).

Além disso, a água não respeita as fronteiras estabelecidas entre uma região protegida e uma região não protegida, carregando os contaminantes e os introduzindo nas AMPs a partir das áreas adjacentes (Pozo et al., 2009). Estas áreas merecem atenção especial por se tratarem de ambientes altamente ricos em biodiversidade, sendo muitas vezes vulneráveis a pesca e poluição (Jameson et al., 2002).

Estudos que avaliam o efeito dos contaminantes sobre a biota destes ecossistemas são escassos, e os disponíveis verificaram alterações nos sistemas biológicos causados pela presença de contaminantes (Gusso-Choueri et al., 2015; 2016; 2018).

Desta forma, é necessário que haja o fortalecimento do monitoramento ambiental em todos os ecossistemas susceptíveis aos impactos antropogênicos a fim de viabilizar e promover políticas e planos de manejo adequados para as áreas protegidas, além de fornecer informações de áreas não protegidas que viabilizem planos de remediação.

OBJETIVOS GERAIS

Considerando a importância da avaliação da qualidade ambiental de ambientes estuarinos, este estudo objetivou avaliar se a poluição vem alterando as respostas biológicas de *Sphoeroides testudineus* coletados em três regiões estuarinas com diferentes impactos antropogênicos e políticas de proteção ambiental.

Assim, este trabalho se divide em dois capítulos apresentados na forma de artigo científico:

Capítulo I: A partir da utilização de biomarcadores amplamente utilizados e aceitos em estudos que avaliam a qualidade ambiental, este artigo objetivou avaliar as respostas do fígado e das brânquias a nível bioquímico e morfológico, além das respostas genotóxicas no sangue e atividade colinesterásica do músculo de *Sphoeroides testudineus* coletados em três estuários do litoral do Estado de São Paulo.

Capítulo II: A partir das respostas dos biomarcadores avaliados previamente e este trabalho objetivou analisar as respostas do intestino do *Sphoeroides testudineus* através de biomarcadores morfológicos, bioquímicos e neuronais (sistema nervoso entérico) e propor um novo modelo de biomarcador a ser utilizado nas análises de qualidade ambiental.

Capítulo I - Avaliação da qualidade ambiental de três estuários da costa de São Paulo através da utilização de biomarcadores morfofisiológicos em baiacu *Sphoeroides testudineus*.

Gabriela Pustiglione Marinsek^{1,3}, Denis Moledo de Souza Abessa², Renata de Britto Mari^{1,3}

¹Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista - Laboratório de Morfofisiologia Animal (LABMA); ²Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociência, Campus do Litoral Paulista - Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA); ³Universidade Estadual Paulista, Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMar)

RESUMO

A crescente atividade antropogênica nos ambientes costeiros vem despertando grande preocupação, principalmente quanto a conservação da biodiversidade. Desta forma, este estudo objetivou avaliar a qualidade ambiental de três estuários localizados na costa do estado de São Paulo, que diferem entre si quanto aos impactos antropogênicos e políticas de conservação. Para tanto, exemplares de *Sphoeroides testudineus* foram coletados no Mosaico da Juréia Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (A2) e destinados à avaliação de múltiplos biomarcadores (de diferentes níveis de organização) a fim de se promover uma avaliação integrada das alterações biológicas decorrentes dos contaminantes disponíveis em cada ecossistema. Assim, os animais foram avaliados quanto aos biomarcadores somáticos (fator de condição - FC e índice hepatossomático - IHS), amostras de fígado e brânquias foram destinadas a análises bioquímicas (GPx, GST, GSH, LPO e Dano de DNA) e histopatológicas, amostras de músculo foram destinadas a análise da AChE e amostras de sangue periférico foram avaliadas quanto a presença de micronúcleos (MN) e anomalias nucleares (AN). Em A1, as respostas dos biomarcadores demonstraram alterações nos índices somáticos (FC e IHS), nas defesas antioxidantes (aumento da expressão da GST no fígado e brânquias) e no *score* histopatológico do fígado. Em A2, as respostas dos biomarcadores foram mais expressivas indicando alterações no FC, aumento da ocorrência de MN e AN, alterações no sistema de defesa antioxidante, aumento da AChE e LPO; o maior índice hepatossomático das brânquias também ocorreu nesta região. Tais dados nos levam a sugerir que os animais coletados em A1 sofrem principalmente com alterações hepatológicas no fígado, que pode ser decorrente da presença de metais na água e no sedimento desta região. Em A2, as respostas foram mais expressivas e sistêmicas, indicando alterações no organismo de maneira geral, sendo vinculadas principalmente a complexa mistura de contaminantes orgânicos e inorgânicos presente em A2. Conclui-se que a utilização de múltiplos biomarcadores é mais eficiente em análises de diagnóstico ambiental, e que os animais de A2 demonstram maiores alterações biológicas, sugerindo que a pior qualidade ambiental deste estuário vem causando alterações sistêmicas em *S. testudineus*.

Palavra-chave: Poluição aquática, histopatologia, baiacú

ABSTRACT

The increasing anthropogenic activity in the coastal environments has aroused great concern, mainly regarding the conservation of biodiversity. In this way, this study aimed to evaluate the environmental quality of three estuaries located on the coast of the state of São Paulo, which differ from one another in terms of anthropogenic impacts and conservation policies. For this purpose, specimens of *Sphoeroides testudineus* were collected from the Juréia Itatins Mosaic (AR), the Lagunar Estuary Complex of Cananéia Iguape (A1) and the Santos-São Vicente Estuarine Complex (A2) for evaluation of multiple biomarkers levels) in order to promote an integrated assessment of biological changes due to contamination. Thus, the animals were evaluated for somatic biomarkers (condition factor - CF and hepatosomatic index - IHS), liver samples and gills were used for biochemical analyzes (GPx, GST, GSH, LPO, and DNA damage) and histopathological samples of muscle were analyzed for AChE and peripheral blood samples were evaluated for the presence of micronuclei (MN) and nuclear abnormalities (NA). In A1, biomarkers responses showed changes in somatic indices (CF and IHS), antioxidant defenses (increased GST expression in the liver and gills) and histopathological liver score. In A2, the biomarkers responses were more expressive, indicating changes in CF, increased MN and AN occurrences, alterations in the antioxidant defense system, increased AChE and LPO; the highest hepatosomatic index of the gills also occurred in this region. These data lead us to suggest that the animals collected in A1 suffer mainly from hepatological changes in the liver, which may be due to the presence of metals in the water and sediment of this region. In A2, the responses were more expressive and systemic, indicating changes in the body in general, being mainly the oldest interactions of organic and inorganic compounds present in A2. It concludes that the use of multiple biomarkers is more efficient in environmental diagnostic analyzes, and suggesting that the worse environmental quality of this estuary has been causing systemic alterations in *S. testudineus*.

Key-words: Aquatic pollution, histopathology, pufferfish

1. INTRODUÇÃO

Ambientes de transição, como ambientes estuarinos, são altamente valiosos devido aos seus recursos ecológicos e econômicos (Costanza et al., 1997). Contudo, são vulneráveis, na mesma proporção, aos efeitos da contaminação principalmente por serem a rota final para o descarte de uma vasta gama de substâncias produzidas por atividades antropogênicas, que, concomitantemente com o desenvolvimento urbano desenfreado, contribuem para a degradação ambiental destes ecossistemas (Kennish, 2017).

A redução da qualidade das águas e sedimento em virtude da presença de compostos orgânicos e inorgânicos pode afetar a biodiversidade, além de reduzir os recursos naturais disponíveis. Por esta razão, existe a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento de métodos para identificar, estimar e comparar os riscos causados pela presença destes contaminantes, a fim de se promover o manejo adequado e a preservação destes ecossistemas (Cajaraville et al., 2000; Kruger, 2001).

A avaliação da qualidade ambiental dos estuários é particularmente desafiadora devido as intensas variações dos fatores abióticos, uma vez que tais oscilações podem alterar a disponibilidade e a toxicidade dos contaminantes (Amado et al., 2006). Além disso, em ambientes naturais os contaminantes se transformam em misturas complexas, o que requer maiores cuidados na escolha dos métodos avaliativos, a fim de que estes forneçam um diagnóstico realista acerca da saúde do organismo e, por conseguinte da degradação ambiental (Cazanave et al., 2009).

Neste contexto, os biomarcadores podem ser considerados ferramentas valiosas para avaliação da qualidade ambiental de ambientes estuarinos e costeiros (Gusso-Choueri et al., 2015, 2016), uma vez que podem detectar os primeiros sinais de injúrias nos organismos. Estes, por sua vez, podem ser definidos como respostas de efeito ou exposição, que avaliam a ação dos contaminantes em fluidos corporais, células e tecidos (Livingstone, 1993; Peakall, 1994).

Atualmente são utilizadas uma variedade considerável de marcadores biológicos, moleculares, bioquímicos, fisiológicos e histo-citopatológicos (Au, 2004). Torna-se relevante destacar que a utilização destes biomarcadores tem sido bem empregada em estudos de campo que objetivam caracterizar áreas impactadas onde ocorrem complexas misturas de poluentes (Bainy et al., 1996; Geracitano et al., 2004; Amado et al., 2006), no entanto poucos estudos integram as alterações em diferentes órgãos e níveis de organização biológica.

Estudos que integrem respostas em diferentes níveis de organização biológica podem fornecer informações mais completas e específicas acerca da saúde dos indivíduos e do

ecossistema, além de quantificar os impactos sofridos pelos organismos em níveis bioquímicos, celulares, teciduais e somáticos (Linde-Arias et al., 2008; Cazenave et al., 2009).

Avaliação de lesões histopatológicas e alterações enzimáticas são amplamente utilizadas em estudos de monitoramento ambiental, principalmente em órgãos como fígado e brânquias (Akaishi et al., 2004; Mouchet et al., 2006). Embora as alterações histopatológicas não apresentem relação específica com o contaminante, estudos vêm reportando a ocorrência de danos celulares e teciduais em peixes expostos a xenobióticos como PCBs, HPAs, metais pesados, pesticidas, esgoto doméstico, efluentes portuários e industriais e misturas complexas de contaminantes (Standfor et al., 2003; Fonseca et al., 2011; Dyk et al., 2012; Kumar et al., 2017; Ballesteros et al., 2017).

Alterações histopatológicas nas brânquias geralmente estão associadas a efeitos agudos da contaminação (Zodrow et al., 2004). Patologias como fusão das lamelas secundárias foram relatadas em estudos que analisaram efluentes de indústrias de papel clorado, esgoto e presença de cobre na água (Pacheco e Santos, 2002; Arellano et al., 1999; Valdez Domingos, 2001). Além disso, descolamento epitelial, proliferação de células de muco e hipertrofia celular e tecidual foram observadas em situações de exposição a HPAs, pesticidas clorados e PCBs (Ali e Sreekrishnan, 2001; Shailaja e Silva, 2003). Estas alterações podem causar prejuízos nas trocas gasosas e osmorregulação, uma vez que mudanças na morfologia branquial aumentam a distância entre as células epiteliais e os capilares sanguíneos.

Por sua vez, o fígado é responsável pelos processos de metabolização e absorção e, portanto, relaciona-se a exposição crônica a xenobióticos. A incidência de patologias como áreas necróticas, centros melanomacrofágicos, esteatose e distúrbios circulatórios, estão associadas, principalmente, a contaminantes como HPAs, pesticidas, metais pesados e mistura de contaminantes (Stentiford et al., 2003; Oliveira Ribeiro et al. 2005; Schmalz et al., 2002; Louiz et al., 2018).

Tais alterações e sua relação com os poluentes vêm gerando grande preocupação por parte de pesquisadores, uma vez que os impactos ambientais na zona costeira representam efeitos na saúde dos organismos e consequente impacto nos alimentos de origens estuarinas.

Desta forma, este estudo objetivou avaliar três estuários da costa do Estado de São Paulo, distintos quanto às políticas de proteção ambiental, usos permitidos e impactos antropogênicos a fim de fornecer, de forma integrada, dados acerca da saúde dos animais e da qualidade ambiental dos estuários avaliados. Para tanto, foram quantificadas respostas em diferentes níveis de organização biológica (biomarcadores bioquímicos, genotóxicos, morfológicos e somáticos) em uma espécie de peixe demersal (*Sphoeroides testudineus*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Regiões de Estudo

As regiões utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho estão localizadas ao longo do Litoral do Estado de São Paulo e se diferenciam, principalmente, pela densidade demográfica, desenvolvimento urbano e impactos antropogênicos. Além disso, foram classificadas de acordo com a forma de proteção e usos permitidos, conforme disposto pelo Sistema Nacional de Unidades de Conservação – SNUC (Brasil, 2000). Os ambientes avaliados foram o estuário da Barra do Una, o estuário de Cananéia e o estuário de São Vicente:

O Estuário da Barra do Una encontra-se localizado no litoral sul do Estado de São Paulo e está inserido dentro do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins ($24^{\circ}28'3.16''\text{S}$ $47^{\circ}6'45.77''\text{O}$). Trata-se de um mosaico de unidades de conservação com aproximadamente 80.000 hectares que confere manutenção aos ecossistemas da região (Oliveira, 1993), e, portanto, denominada neste trabalho com área referência (AR).

O Estuário de Cananéia está inserido no sistema Estuarino Lagunar de Cananéia Iguape (APA-CIP) ($24^{\circ}40'\text{S}$ $25^{\circ}05'\text{S}$), uma Área de Proteção Ambiental, e, portanto, de uso sustentável, reconhecida como parte da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica e como patrimônio mundial desde de 2000 pela UNESCO. Contribuindo para a formação do complexo estuarino lagunar, o Rio Ribeira despeja, através de um canal artificial conhecido como Valo Grande, aproximadamente 70% das águas fluviais que compõe o complexo APA-CIP. Embora situado em uma província metalogênica com depósitos naturais de Pb e Zn, esta região foi palco de atividades mineradoras ao longo de todo o século XX o que promoveu depósitos de metais pesados como Pb, Zn, Cu, Cr e As nas águas e sedimentos dos rios. No estuário a presença destes metais foi considerada moderada (Mahiques et al., 2009) mas capaz de causar danos biológicos nos organismos vivos (Gusso-Choueri et al., 2015, 2016, 2018). Além da presença de metais pesados, esta região engloba três municípios que não possuem infraestrutura sanitária adequada e, portanto, despejam seus efluentes nas águas do estuário (Moraes e Abessa, 2014). Esta localidade foi denominada área 1 (A1).

Localizado na região metropolitana da Baixada Santista, o Estuário de Santos (Sistema Estuarino de Santos-São Vicente) ($23^{\circ}58'52.03''\text{S}$ $46^{\circ}23'52.72''\text{O}$) é conhecidamente impactado por ações antropogênicas como: atividades decorrentes do Porto de Santos, considerado o maior porto da América Latina, contaminação por efluentes doméstico e industriais, resíduos gerados por embarcações, além de abrigar um dos maiores polos industriais do país, o polo industrial de

Cubatão (Lamparelli et al., 2001). Os principais contaminantes encontrados neste sistema estuarino são hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), bifenilas policloradas (PCBs) além de metais e metaloides como Pb, Zn, Hg, Ni, Cr, Cu e As (Perina et al., 2018). Além disso, também vem sendo relatado a presença de drogas ilícitas e medicamentos (Pereira et al., 2016) (Figura.1).

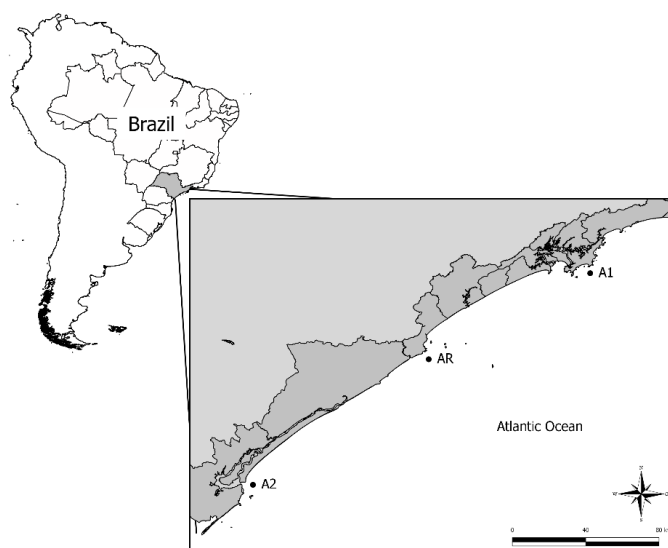


Figura 1. Mapa do litoral do Estado de São Paulo evidenciando as três regiões de estudo: AR – Estuário do Rio Una, A1 – Complexo Estuarino lagunar de Cananéia Iguape e A2 – Sistema Estuarino de Santos – São Vicente.

Amostras de água destas três localidades foram analisadas quanto temperatura e oxigênio dissolvido (OD) através de um medidor multiparâmetro com sonda de oxigênio dissolvido, quanto ao pH através da utilização de papel indicador de pH e quanto à salinidade por meio de um refratômetro/salinômetro manual.

2.2. Coleta e Preparação de Amostras

O baiacu *Sphoeroides testudineus* é um peixe com hábito territorialista e pouca capacidade natatória que se alimenta principalmente de animais filtradores como moluscos bivalves além de gastrópodes e crustáceos (Targett, 1978), características que o tornam um modelo biológico em potencial.

Em cada uma das regiões de estudo foram coletados 10 espécimes de *S. testudineus* utilizando redes de arrasto, os quais foram transportados para o laboratório e mantidos em

aquários para aclimação por um período de 24 horas. Após os animais foram eutanasiados com solução de benzocaina a 50 ppm (diluída em 1ml de acetona) em solução aquosa, pesados (g) e medidos quanto ao comprimento total (cm). Em seguida, foram coletadas amostras de fígado, brânquias, músculo e sangue periférico para as análises de biomarcadores bioquímicos, genotóxicos e morfológicos,

Todos os procedimentos envolvendo a experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Anexo I - 04/2017– CEUA) do IB-CLP.

2.3. Biomarcadores Somáticos

2.3.1. Determinação do fator de condição (FC) e índice hepatossomático (IHS)

Para a determinação do fator de condição (FC), foram obtidos o peso total e o comprimento total dos organismos capturados, que foram aplicados na equação adotada por Vazzoler (1996). O FC é utilizado a fim de se investigar o grau de rigidez que o organismo se encontra em determinado ambiente, que reflete no bem-estar do animal (Le Cren, 1951).

$$FC = W_t / L_t^b$$

Onde,

W_t = peso total

L_t = comprimento total

b = coeficiente da relação peso-comprimento

O índice hepatossomático indica o peso do fígado em relação ao peso corporal total, (Al-Ghais, 2013) e é calculado pela equação:

$$IHS = P_f / P_t \times 100$$

Onde,

P_f = peso do fígado

P_t = peso total

2.4. Biomarcadores Genotóxicos

2.4.1. Teste do micronúcleo e anomalias nucleares em sangue periférico

Após anestesia amostras de sangue periférico foram coletadas a partir da nadadeira caudal e imediatamente dispostas em lâminas de microscopia. Após realizar o esfregaço, as lâminas foram fixadas em etanol PA durante 30 minutos e coradas com laranja de acridina. A visualização de micronúcleos (MN) e anomalias nucleares (AN) foi realizada a partir da análise de 2000 eritrócitos/animal sob um microscópio de epifluorescência Leica® com 1000x de ampliação. Os testes de MN foram realizados de acordo com Heddle (1973) e Schmid (1975), enquanto que ANs (*blebbed, lobed, vacuolated e notched*) foram caracterizadas de acordo com Carrasco et al. (1990).

2.5. Biomarcadores Bioquímicos

2.5.1. Determinações bioquímicas

Amostras de fígado, brânquias e músculo foram extraídas e mantidas a -80°C até o início das análises. O fígado e as brânquias foram homogeneizados a 4% w/v em tampão Tris-HCl (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, sacarose 50 mM, KCl 150 mM, PMSF 1 mM, pH 7,6). Após, alíquotas dos homogenatos foram separadas para quantificação de dano em DNA e lipoperoxidação (LPO). O restante da amostra foi centrifugado a 12.000 g durante 20 min a 4 °C, e alíquotas deste sobrenadante foram separadas para as análises de atividade das enzimas glutational-S-transferase (GST) e glutational peroxidase (GPx), bem como para quantificação da glutational total (GSH).

Amostras de tecido muscular também foram homogeneizados a 2.5% w/v em tampão fosfato (0.1 M, pH 7.5). Após centrifugação a 12 000 × g durante 20 minutos a 4° C, alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para análises da atividade de acetilcolinesterase (AChE)

A cinética da GST (Keen et al., 1976), GR (McFarland et al., 1999) e GPx (Sies et al., 1979) foi determinada por espectrofotometria a 340 nm e a quantificação da GSH foi analisada a 415 nm. A análise de atividade da AChE no músculo foi realizada a 415 nm usando o método colorimétrico proposto por Ellman et al. (1961).

Os níveis de hidroperóxidos de lipídio foram quantificados pelo método de FOX (Jiang et al., 1992) baseado na oxidação de Fe^{2+} mediada por peróxidos em condições ácidas para a formação de Fe^{3+} (leitura realizada a 550-570 nm) e a quantificação de danos de DNA foi avaliada através do ensaio de precipitação alcalina (Olive, 1988), quantificando vestígios de DNA através fluorescência (Gagné e Blaise, 1993). O método consiste na separação de vestígios livres de DNA do DNA genômico que após coloração com Hoechst é quantificado através de fluorescência (λ_{ex}

360 nm e λ em 450 nm). Para calibração, foi utilizada uma curva padrão de DNA genômico de esperma de salmão.

Finalmente, todos os resultados foram normalizados pelas concentrações de proteína, as quais foram determinadas por espectrofotometria a 595nm (Bradford, 1976) utilizando BSA (proteína albumina do soro bovino) como padrão. As leituras de absorbância e fluorescência foram realizadas em leitor de microplacas (Biotek-Synergy™ HT).

2.6. Biomarcadores Morfológicos

2.6.1. Análise histopatológica e morfométrica

Segmentos de fígado e brânquias foram fixados em formaldeído diluído em solução aquosa a 10% e submetidos aos procedimentos histológicos padrões. Em seguida, foram obtidos de cada animal 3 cortes semi-seriados de 5 μ m de espessura cada, que foram corados com Hematoxilina-Eosina para análise morfológica e histopatológica proposta por Bernet et al. (1999).

As lesões foram identificadas de acordo com o fator de importância (w) pré-estabelecido conforme a gravidade da lesão, sendo (1) para lesões com importância patológica mínima, ou seja, lesões facilmente reversíveis, (2) para lesões intermediárias e (3) para lesões com elevada importância patológica que são, geralmente, irreversíveis e acarretam em perda parcial ou total da função do órgão.

As anomalias encontradas nos órgãos avaliados foram classificadas de acordo com um *score* (a) que varia de 0 a 6 dependendo do grau e extensão da lesão, sendo que 0 representa nenhuma ocorrência e 6, ocorrência muito frequente. Em seguida, o fator de importância foi multiplicado pelo *score* e, assim, obtido índice da alteração. Para calcular o índice total de alteração histopatológica do órgão foi realizada a somatória do fator de importância x *score* (alteração total = $\sum (w * a)$).

O fígado dos animais foi submetido à análise macroscópica e, em seguida a confecção das lâminas histológicas foi realizada para quantificação de hepatócitos por campo microscópico (aumento 400x). Foi avaliado um total de 10 campos/área (AR, A1 e A2), sendo contabilizado um campo/lâmina/animal.

A análise morfométrica das brânquias foi realizada a partir de uma adaptação de Nero et al. (2005). Foram capturadas aleatoriamente duas fotomicrografias (aumento 100x) de cada um dos cortes disponíveis em cada lâmina, totalizando 6 fotomicrografias/animal. A partir da imagem capturada as mensurações foram realizadas em cada uma das lamelas secundárias que apareciam

completamente na imagem, sendo que as medidas obtidas foram: comprimento das lamelas secundárias (CLS), largura da lamela secundária (LLS), distância inter-lamelar (DIL) e espessura do epitélio basal (EEB). Para as medidas de LLS e DIL foram realizadas três medidas representando as porções basal, medial e apical da lamela, obtendo-se uma média dos resultados.

A espessura do epitélio basal foi mensurada 6 vezes por imagem capturada, sendo duas medidas realizadas no início, meio e fim do epitélio amostrado, respectivamente. A partir destas medidas foi realizada uma média da EEB por corte. O esquema das mensurações está representado na figura 2.

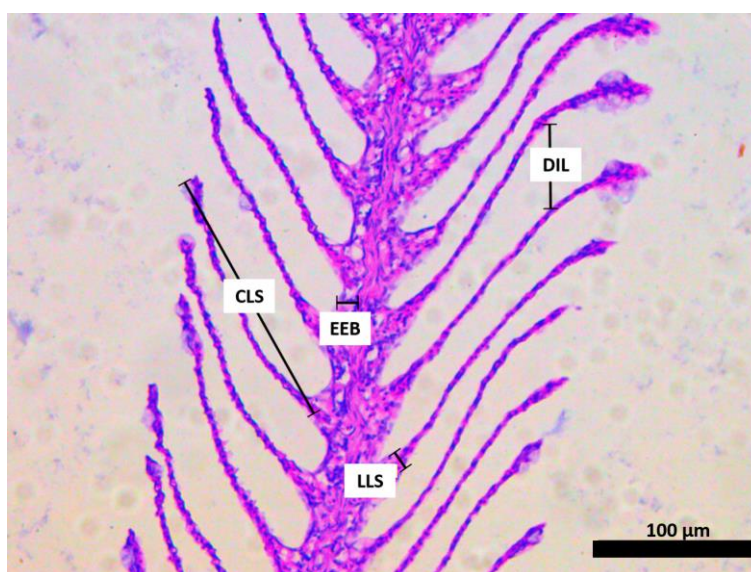


Figura 2. Representação da metodologia utilizada para mensuração das brânquias de *Sphoeroides testudineus*: (CLS) – comprimento da lamela secundária, (LLS) – largura da lamela secundária, (DIL) – distância inter-lamelar e (EEB) – espessura do epitélio basal.

Para análise da densidade de células mucosecretoras do epitélio branquial 3 cortes semi-seriados de 5 µm de espessura foram corados com ácido periódico de Schiff e contra-corados com Azul de Alcian (pH 2,5) para evidenciação das células secretoras de muco neutro (PAS+) e ácido (AB+). Foram realizadas duas fotomicrografias no aumento de 400x das lamelas secundária, totalizando 6 fotos por animal. Após, foram contadas todas as células secretoras de muco PAS+ e AB+.

2.7. Tratamento de dados

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para a verificação da normalidade e teste de Levene para avaliar a homocedasticidade. Foram testadas diferenças

estatísticas para os valores médios de cada variável (n=10) pelo teste de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey, quando seguidas as premissas para o uso de testes paramétricos. Quando violadas essas premissas, o teste de Kruskal-Wallis foi empregado seguido pelo pós-teste de Dunn's. O nível de significância foi de 5%.

Para avaliar a significância das diferenças entre os conjuntos de dados das regiões estudadas (AR, A1 e A2) uma análise unifatorial multivariada foi aplicada. Um total de 30 animais foi avaliado (10 exemplares de cada área) e 19 variáveis incluindo biomarcadores morfológicos, bioquímicos e genotóxicos. As matrizes foram analisadas pela análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) (Andreson, 2001) para testar o fator “estuário” (AR vs. A1 vs. A2). Foi utilizado $\alpha = 0,05$. Após a estrutura da matriz expressa pela análise multivariada foi visualizada através da Ordenação Multidimensional Não-Métrica de Escalonamento (n-MDS).

3. RESULTADOS

Os parâmetros físico-químicos obtidos durante a coleta nas três áreas de estudo dos estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Dados físico-químicos da água das regiões de coleta (AR – Mosaico Juréia Itatins, A1 - Complexo Estuarino Lagunar Cananéia Iguape Peruíbe e A2 - Complexo Estuarino de Santos – São Vicente).

Locais de Coleta	Salinidade	Oxigênio Dissolvido (mg/l)	Temperatura (°C)	pH
AR	20	6,4	23,4	7
A1	25	7,3	21,6	6
A2	25	6,0	24,4	7

No que diz respeito aos parâmetros corporais, foi observado que em relação aos animais de AR, houve uma redução expressiva de 63% no peso corporal dos animais de A2, e um pequeno aumento, ainda que não significativo, nos animais de A1 (tabela 2).

Tabela 2. Comprimento e peso médio $\pm$ desvio padrão dos exemplares de *Spherooides testudineus* coletados no Mosaico Juréia Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar Cananéia Iguape Peruíbe (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2).

Locais de Coleta	Peso (g)	Comprimento (cm)
AR	140,9 $\pm$ 56,4 ^a	19,5 $\pm$ 2,3 ^a
A1	167,05 $\pm$ 7,3 ^a	19,3 $\pm$ 2,62 ^a
A2	52,11 $\pm$ 21,8 ^b	17,7 $\pm$ 3,3 ^a

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas pelo teste ANOVA

3.1. Fator de Condição e Índice Hepatosomático

O fator de condição (FC) e o índice hepatossomático (IHS) diferiram estatisticamente ($p < 0,05$, ANOVA) entre as regiões AR, A1 e A2. Os maiores valores foram observados em A1, onde o FC foi cerca de 60% maior que A2 e o IHS foi aproximadamente 50% mais elevado, em relação à AR (Figuras 3).

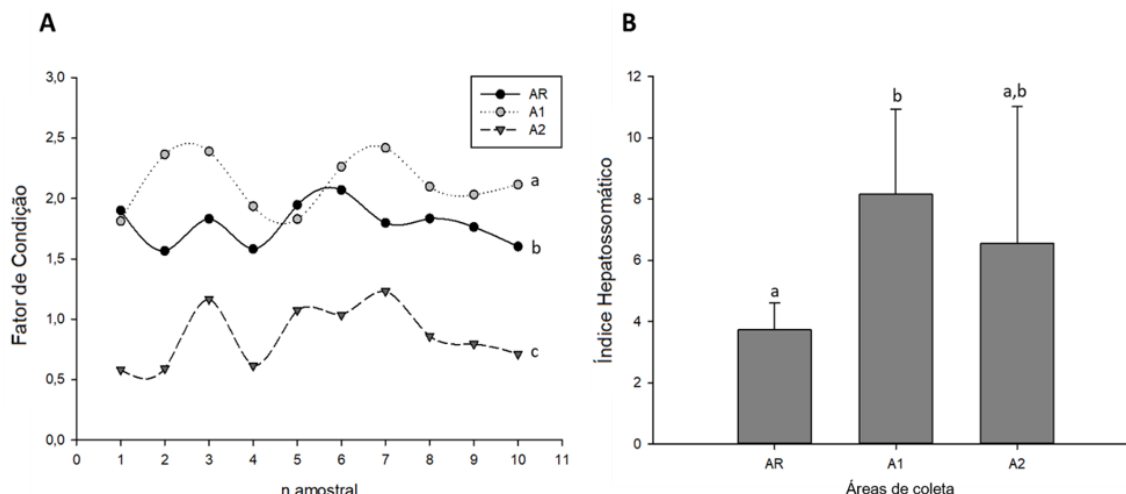


Figura 3. (A) Fator de condição e (B) índice hepatossomático de *Spherooides testudineus* coletados no Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2). * Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

3.2. Micronúcleo e Alterações Nucleares

Os resultados da ocorrência de micronúcleos e alterações nucleares totais encontrados no sangue periférico do baiacu *S. testudineus* estão representados graficamente na figura 4. A maior

ocorrência de micronúcleos e alterações nucleares ($p < 0,001$, ANOVA) foi verificado em A2, seguido por A1 e AR.

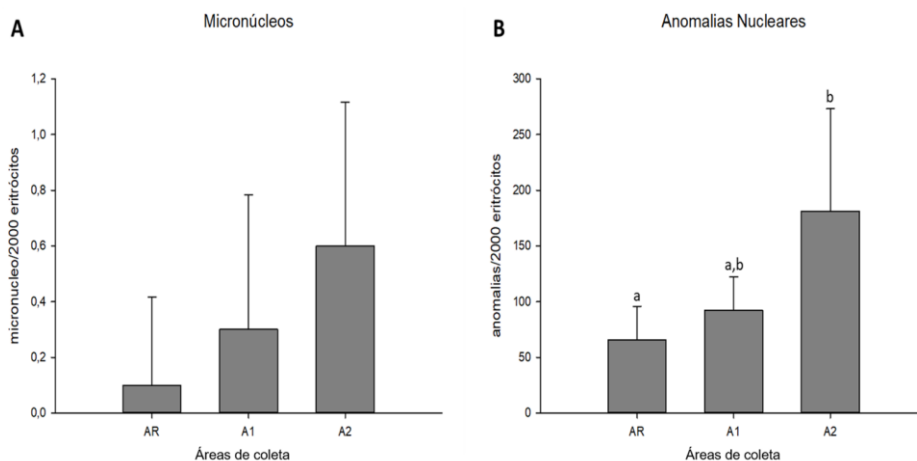


Figura 4. Densidade de micronúcleos (A) e anomalias nucleares (B) encontradas nos eritrócitos de *Spheeroides testudineus* coletados no Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2). * Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

3.3. Biomarcadores bioquímicos

Foram observadas alterações nos biomarcadores bioquímicos dos diferentes órgãos analisados (fígado e brânquias) em A1 e A2 quando comparados com a área referência (AR).

Nas brânquias a atividade da GPx e GST diferiram estatisticamente ($p < 0,001$, ANOVA) em A2 quando comparado com as demais regiões de estudo (AR e A1), sendo que a atividade da GPx aumentou cerca de 30% e a atividade da GST foi reduzida em aproximadamente 50%. As defesas antioxidantes não enzimáticas (GSH) não diferiram entre as regiões. No fígado a atividade enzimática da GPx e GST diferiram estatisticamente ($p < 0,05$, ANOVA) havendo redução na atividade de ambas as enzimas em A2. Embora tenha sido reduzida também nesta região não houve mudanças significativas entre as áreas para GSH (Figura 5).

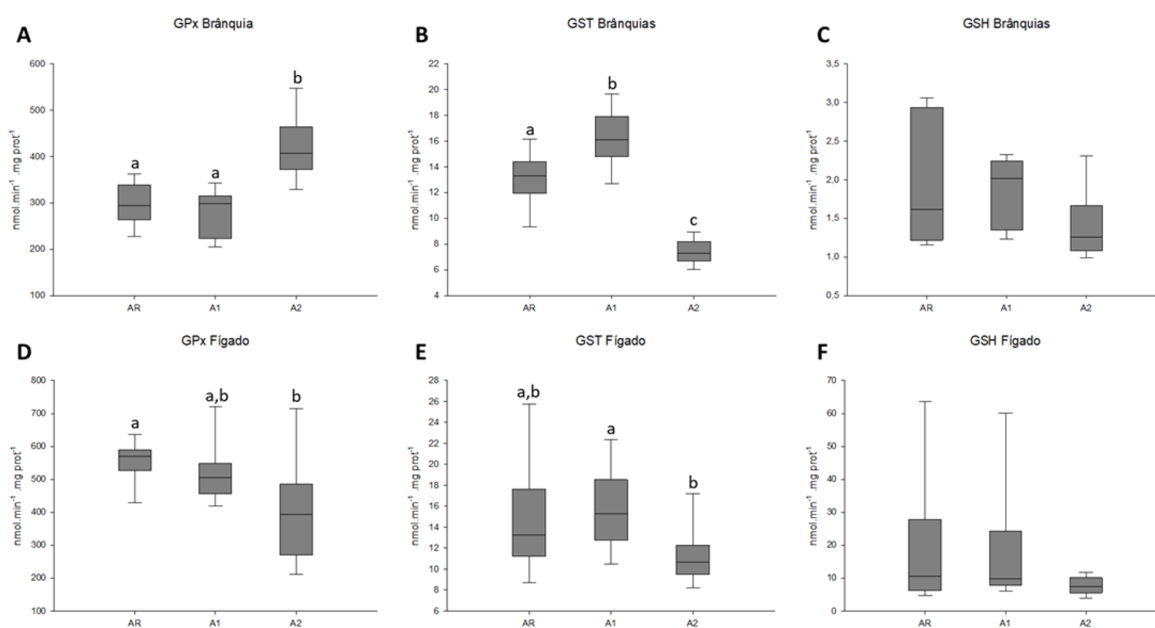


Figura 5. Resposta dos biomarcadores de exposição de *Sphoeroides testudineus* no Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2). Atividade da glutathione peroxidase (GPx) nas brânquias e fígado (A) e (D), atividade da glutathione s-transferase (GST) nas brânquias e fígado (B) e (E) e glutathione total (GSH) das brânquias e fígado (C) e (F). * Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Os biomarcadores de efeito (LPO, Dano de DNA e AChE) também apresentaram variações entre os órgãos e regiões avaliadas. A atividade da acetilcolinesterase muscular (AChE) foi significativamente maior em A2 ($p < 0,001$, ANOVA) em relação a AR e A1 (Figura 6).

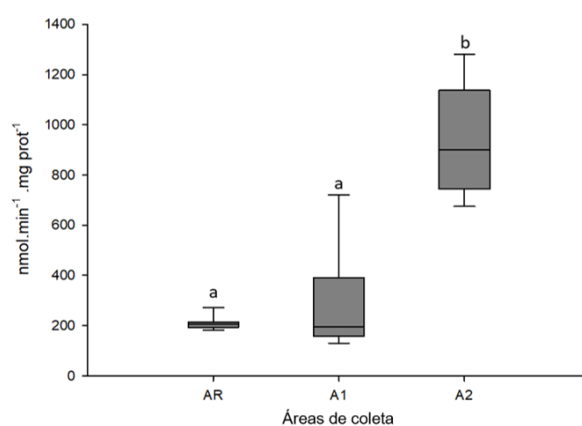


Figura 6. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) muscular de *Sphoeroides testudineus* coletados no Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2). * Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

A presença de lipoperóxidos no fígado e nas brânquias foi substancialmente menor em A1 ($p < 0,05$, ANOVA) quando comparado com AR e A2. Antagonicamente, a avaliação de danos de DNA evidenciou valores reduzidos em A2 ($p < 0,05$, ANOVA) (Figura 7).

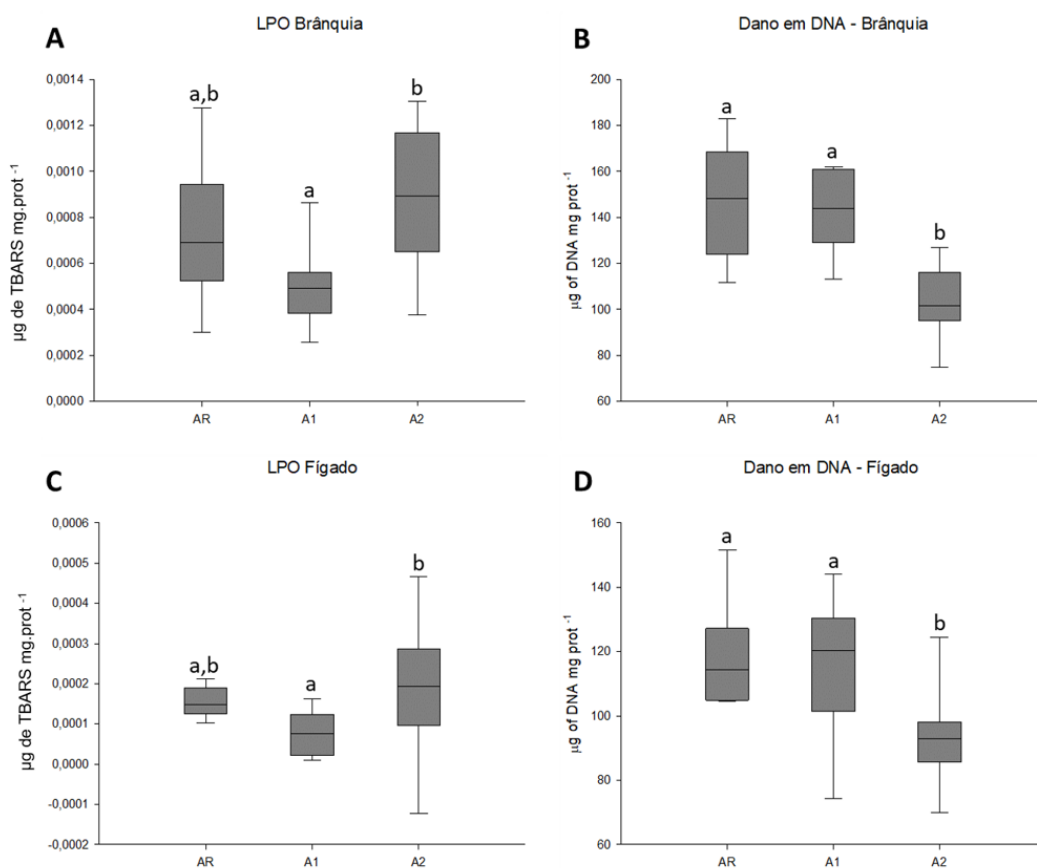


Figura 7. Respostas dos biomarcadores de efeito de *Spherooides testudineus* coletados no Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2). Peroxidação lipídica (LPO) nas brânquias (A) e fígado (C) e danos de DNA nas brânquias (B) e fígado (D). *Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

3.4. Análise Histopatológica e Morfométrica

O fígado dos animais coletados em AR apresentou características macroscópicas normais em comparação com as demais regiões. Em A1 o fígado apresentou-se amarelado, indicando presença de gordura, além de ser ligeiramente maior que AR. Em A2 o fígado dos animais foi significativamente menor e apresentou coloração mais escura em relação as demais regiões (Figura 8).

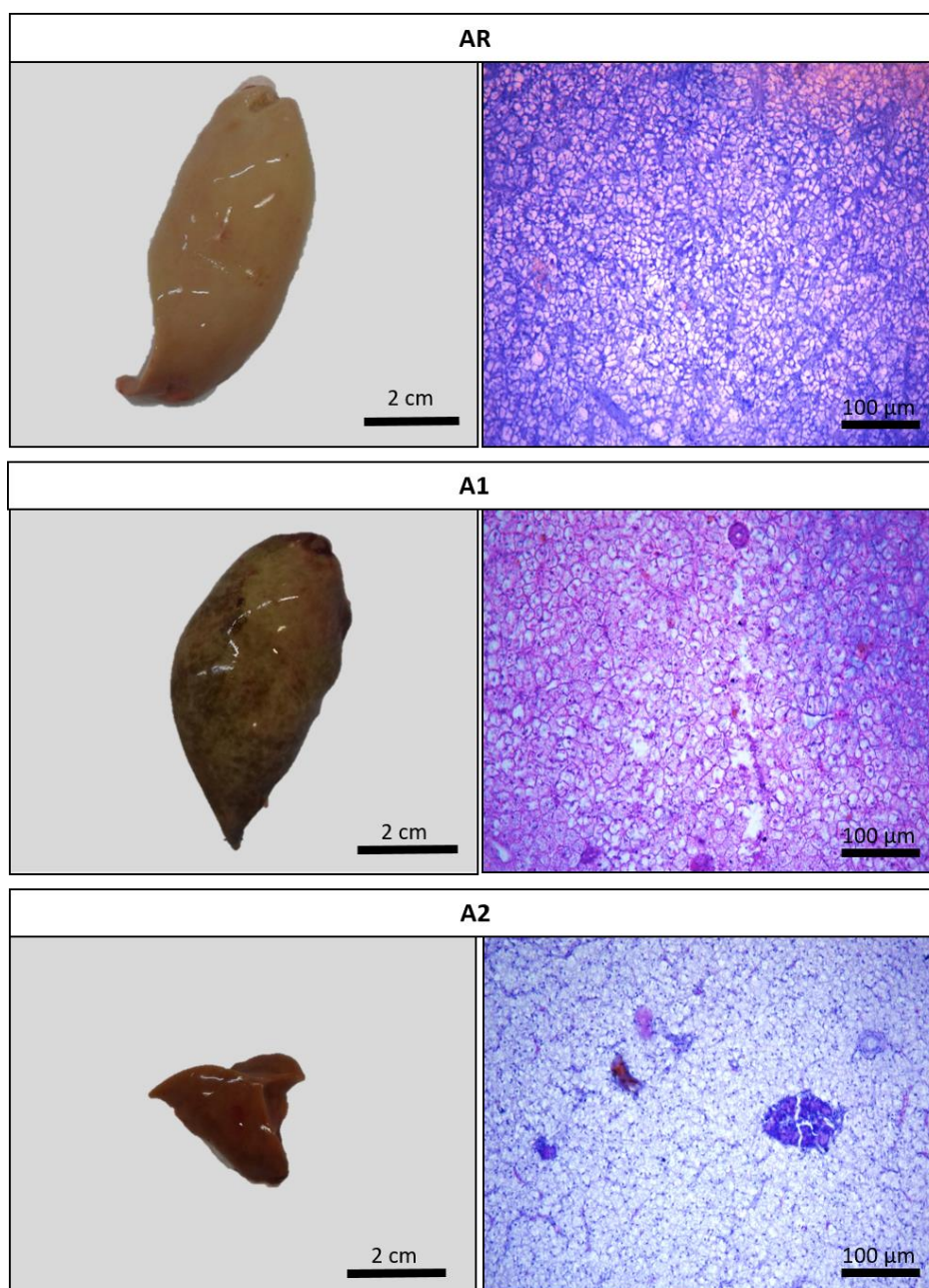


Figura 8 - Análise macroscópica e microscópica do fígado de *Sphoeroides testudineus* coletados no Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2) indicando a diferença na morfologia e no tamanho do órgão de cada uma das regiões.

A análise da densidade de hepatócitos demonstrou diferenças significativas entre as áreas ($p < 0,05$, ANOVA), onde a maior densidade ocorreu em A2, seguido por AR e A1 (Figura 9).

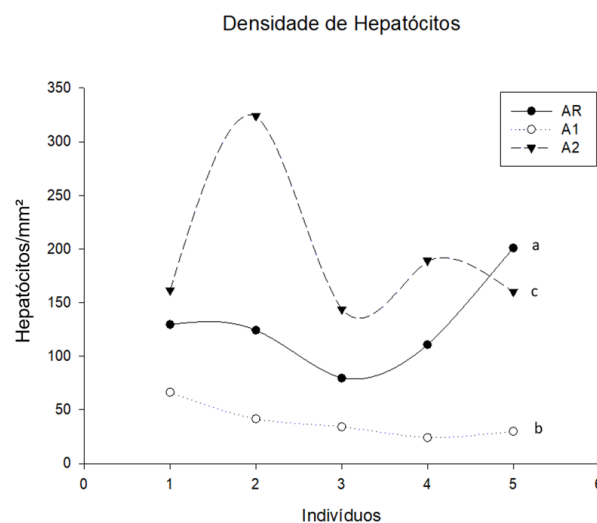


Figura 9. Densidade de hepatócitos por indivíduo de *Spherooides testudineus* coletados no Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2). *Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey

O índice histopatológico total do fígado e das brânquias diferiu significativamente ($p < 0,001$, ANOVA) entre as regiões estudadas (AR, A1 e A2), sendo os maiores valores obtidos em A1 e A2 (Figura 10).

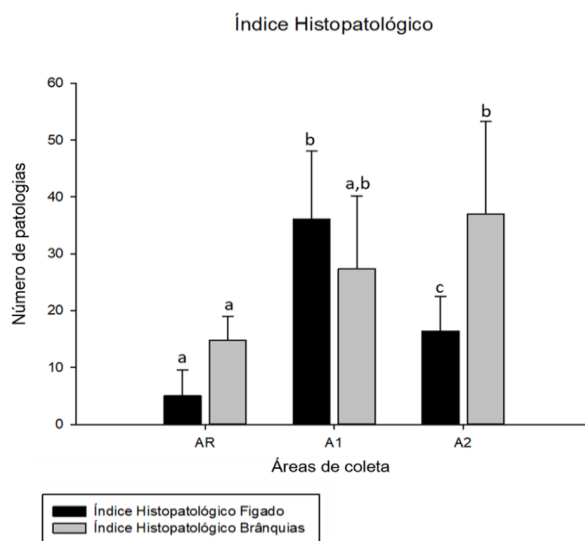


Figura 10. Índice histopatológico do fígado e das brânquias de *Spherooides testudineus* coletados no Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2). * Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

O fígado dos animais coletados na área referência (AR) demonstrou padrões histológicos normais e baixo índice histopatológico com tênue ocorrência de processos inflamatórios e

degenerativos. Contudo, os animais coletados em A1 e A2 apresentaram índices histopatológicos elevados, sendo que o maior índice foi observado em A1 com ocorrência de lesões como infiltração leucocitária, inclusões fibrilares, necrose e hipertrofia celular. Em A2 as patologias que se destacaram foram colestase, esteatose, centros melanomacrofágicos (CMM) e necrose (Figura 11 e 12).

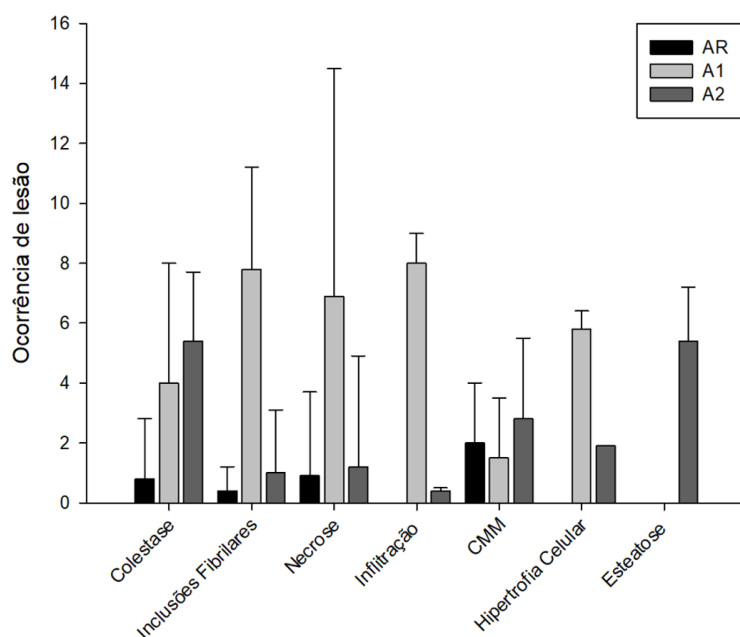


Figura 11. Lesões histopatológicas de maior ocorrência encontradas no fígado de *Spherooides testudineus* coletados no Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2)

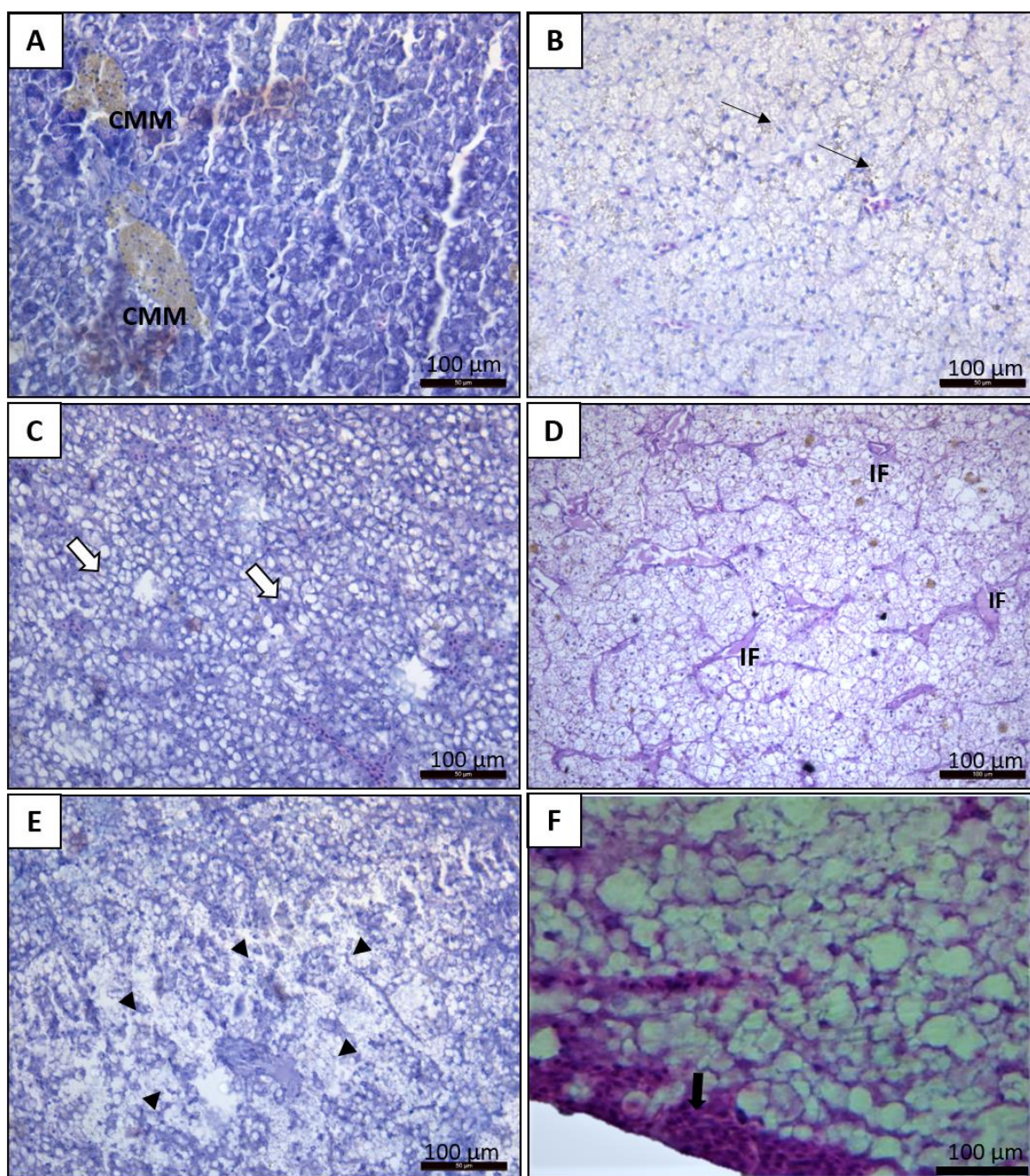


Figura 12. Fotomicrografias das lesões histopatológicas mais relevantes encontradas no fígado de *Sphoeroides testudineus* coletados Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2). A: Centros melanomacrofágicos (CMM), B: colestase (setas finas), C: esteatose hepática (setas não preenchidas), D: inclusões fibrilares (IF), E: ponto de necrose (cabeça de seta) e F: infiltração linfocitária (*). Hematoxilina-Eosina (HE).

As brânquias analisadas dos animais coletados em AR também se apresentaram morfológicamente normais com ocorrências pontuais de patologias circulatórias e inflamatórias. O índice histopatológico mais elevado ocorreu em A2 seguido por A1, onde pode-se observar lesões inflamatórias, progressivas e regressivas como a presença de infiltração leucocitária, hiperplasia, degeneração e fusão lamelar (Figura 13 e 14).

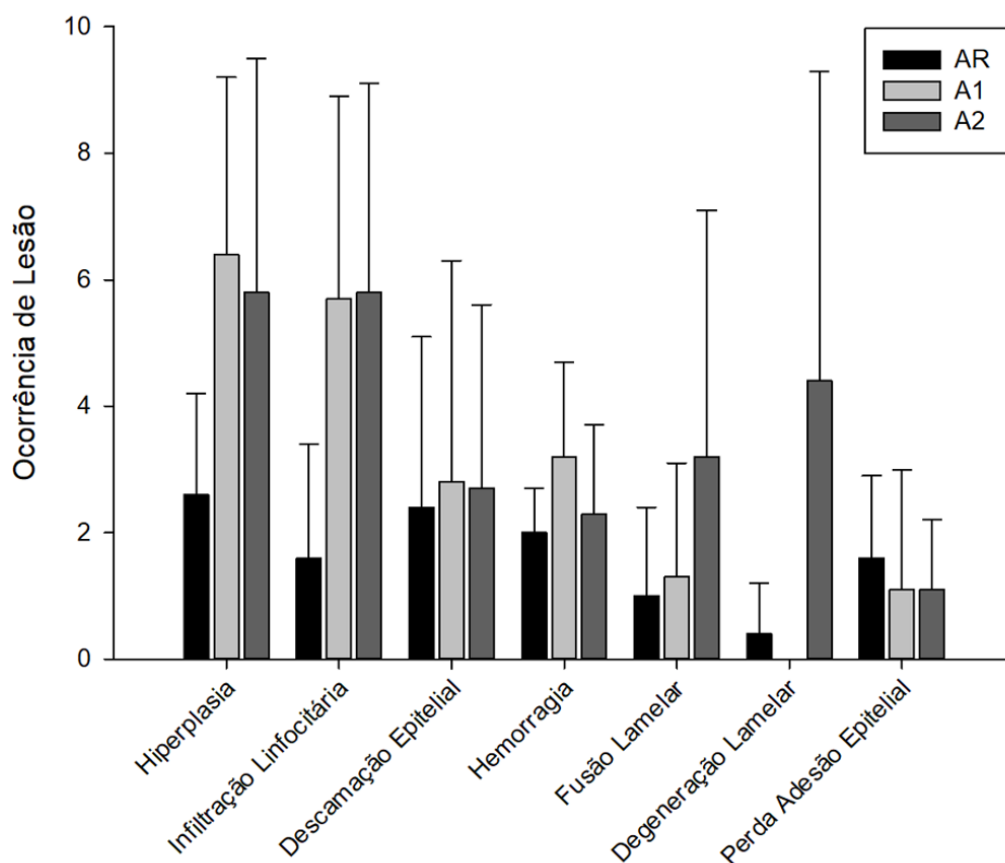


Figura 13. Lesões histopatológicas de maior ocorrência encontradas nas brânquias de *Sphoeroides testudineus* coletados no Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2).

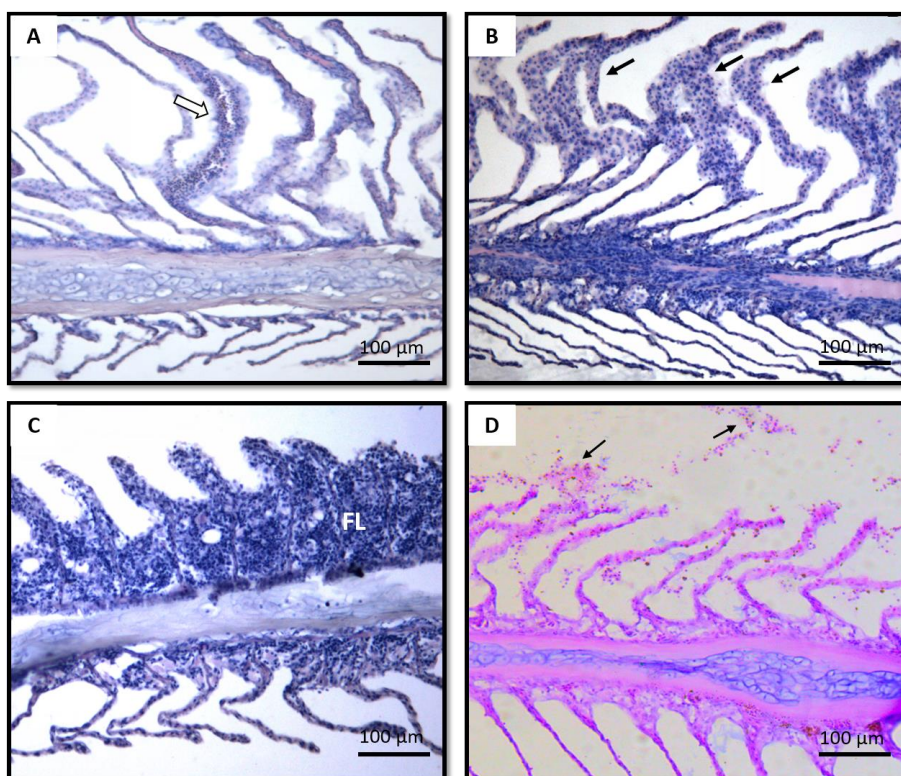


Figura 14. Fotomicrografias das lesões histopatológicas mais relevantes encontradas nas brânquias de *Sphoeroides testudineus* coletados no Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2). A: Infiltração linfocitária (seta branca), B: hiperplasia lamelar (setas finas), C: fusão lamelares (FL) e D: descolamento epitelial (setas). Hematoxilina-Eosina (HE).

Os dados morfométricos das brânquias indicaram aumento no comprimento das lamelas secundárias (CLS) em A1, bem como aumento da largura das lamelas secundárias (LLS) e espessura do epitélio basal (EEB). Não houve alterações significativas na distância inter-lamelar (DIL) entre os grupos (Figura 15).

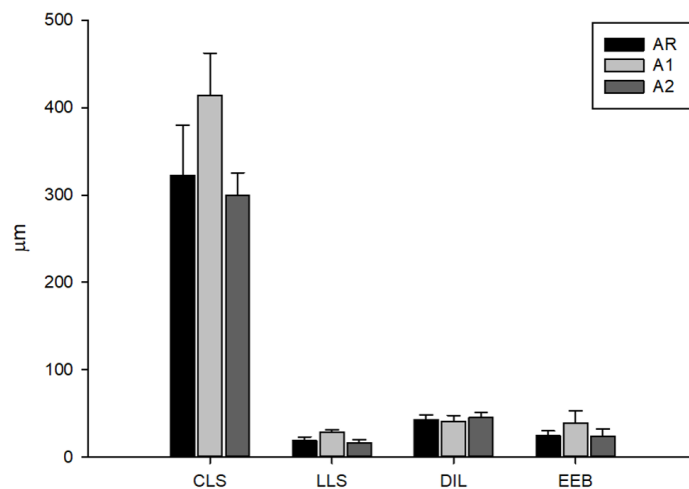


Figura 15. Morfometria das brânquias de *Sphoeroides testudineus* coletados no Mosaico Juréia – Itatins (AR), no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape (A1) e no Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2). CLS – comprimento da lamela secundária. LLS – largura da lamela secundária, DIL – distância inter-lamelar e EEB – espessura do epitélio basal

Diferenças consideráveis também foram observadas na contagem de células muco-secretoras PAS+ e AB+, onde ocorreu aumento expressivo ($p < 0,05$, ANOVA) na densidade de células PAS+ e AB+ apenas em A1.

3.5. Análise Multivariada

Através da análise multivariada foi possível constatar que o fator “estuário” diferiu significativamente entre as regiões estudadas ($p < 0,001$, PERMANOVA). O gráfico plotado a partir da matriz analisada demonstrou separação considerável entre os estuários, sendo que no eixo x foi possível visualizar claramente a separação do Sistema Estuarino de Santos – São Vicente – A2 dos demais estuários analisados (AR e A1). Contudo, a separação de AR e A1 no eixo y também indica que estes estuários apresentam diferenças na matriz de biomarcadores, indicando uma separação mais tênue (Figura 16).

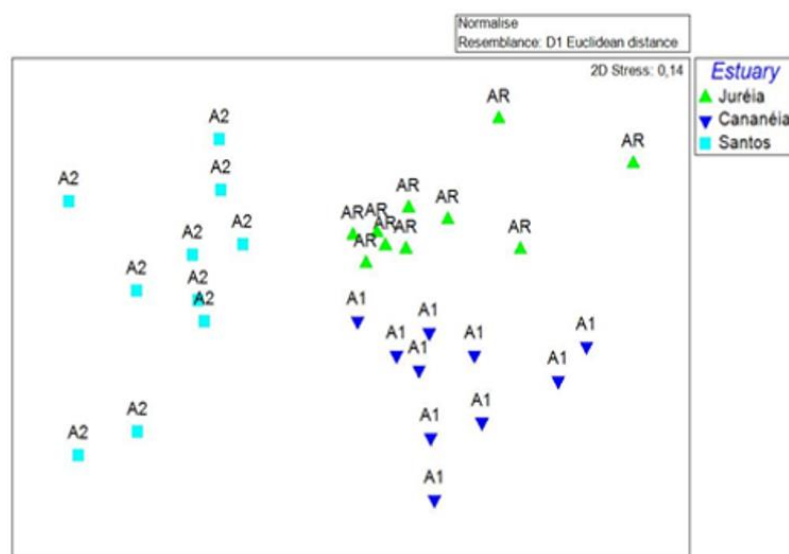


Figura 16. Análise de n-MDS indicando a separação das regiões avaliadas através de análises multivariadas (PERMANOVA). AR - no Mosaico Juréia – Itatins, A1 - Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia – Iguape e A2 - Complexo Estuarino de Santos – São Vicente.

4. DISCUSSÃO

Os índices somáticos indicam o estado de saúde geral dos peixes, bem como possíveis alterações na alimentação, alocação de energia no fígado e produção de gametas (Sutton et al., 2000; Kleinkauf et al., 2004). Desta forma, são amplamente utilizados em estudos que avaliam a qualidade ambiental, sendo que os principais são o fator de condição (FC), que relaciona peso e comprimento corporal, determinando o estado geral do organismo em seu habitat, e o índice hepatossomático (IHS) que possibilita a quantificação do estoque energético do animal, sendo que as alterações neste último índice são comumente relacionadas à exposição a contaminantes (Braga, 1986; Rosety-Rodrigues et al., 2002).

Os biomarcadores somáticos que apresentaram maiores valores de FC e IHS foram relatados nos animais coletados em A1 (Estuário de Cananéia). Alguns estudos reportam que peixes coletados em áreas contaminadas apresentam redução no FC e aumento no IHS (Adams e Ryon, 1994; Van der Oost et al., 1996), sugerindo que os animais de A1 apresentam as melhores condições de desenvolvimento e alimentação (maior FC), bem como maiores alterações hepáticas decorrentes de alterações metabólicas (Teles et al., 2006).

Em virtude do hábito alimentar carnívoro de *Sphoeroides testudineus*, o valor elevado do IHS pode estar associado a fenômenos como bioacumulação de poluentes, principalmente de metais, altamente encontrados nesta região (Cruz et al., 2014; Gusso-Choueri et al., 2015). A

disponibilidade de metais pesados pode estar favorecendo também o aumento FC em A1, uma vez que o peso do fígado reflete no peso total do organismo (Gusso-Choueri et al., 2015, 2016, 2018). Além disso, estudos demonstram a relação entre o aumento do FC e a presença de contaminantes (Alberto et al., 2005; Tajeda-Vera et al., 2007), sendo que este aumento se justifica pela elevada disponibilidade de alimento nestes locais, mesmo na presença de contaminantes, sugerindo que a população optou por investir em crescimento e reprodução (Oost et al., 2003).

Com relação às defesas antioxidantes dos animais coletados em A1, apenas ocorreu variação na atividade da GST das brânquias e fígado. Esta enzima está especialmente relacionada a defesa antioxidante e eliminação de compostos xenobióticos, e sua conjugação com a GSH, protege as células contra danos promovidos pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (Rodriguez-Ariza et al., 1991). Desta forma, a elevada atividade da GST no fígado dos animais de A1 pode ser entendida como aumento da biotransformação na fase II de metabolização de xenobióticos, indicando a capacidade do fígado em detoxificar tais compostos (Oliveira et al., 2009; Narra et al., 2017).

Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) nas brânquias dos animais de A1 foram menores do que o encontrado na área referência (AR), o que pode indicar que as demais defesas antioxidantes não quantificadas estão promovendo um combate eficiente contra as ROS. Alguns autores que também constataram a redução de LPO em animais que habitavam ambientes contaminados e sugeriram que, embora a redução dos níveis de peroxidação lipídica não apontem à contaminação ambiental, deve-se levar em consideração o fato de que animais estão constantemente expostos aos poluentes, e, portanto, podem ter atingido um ponto de saturação (Pandey et al., 2003).

Um dos produtos da lipoperoxidação é o malonaldeído, um composto altamente reativo responsável por induzir danos nas moléculas de DNA (Wang e Liehr, 1995). A ausência de LPO nos órgãos avaliados na região A1 pode estar associada a ausência de danos de DNA, uma vez que os peixes apresentam a capacidade de se adaptar as condições oxidativas através da mobilização das defesas antioxidantes (Lackner, 1998).

Ainda se tratando do estuário de Cananéia, (A1), as principais lesões histopatológicas relatadas foram observadas no fígado. Este órgão é responsável pela detoxificação e biotransformação de compostos xenobióticos (Van der Oost et al., 2003), tornando-se alvo constante de contaminantes ingeridos (Rodrigues e Fanta, 1998). Nos animais coletados em A1 as alterações patológicas que mais ocorreram foram infiltração leucocitária, inclusões fibrilares, necrose e hipertrofia das células e do órgão. Tais patologias indicam degradação ambiental crônica

e tentativa de defesa pelos mecanismos inflamatórios do organismo (Poleksic et al., 2010). Majoritariamente, inclusões fibrilares significam a substituição de um tecido altamente especializado (hepatócitos) por tecido conjuntivo, que por sua vez é menos vulnerável aos efeitos dos contaminantes (Poleksic et al., 2010). Tal substituição pode estar associada ao elevado índice hepatossomático (IHS) e, conseqüentemente, ao aumento do fator de condição (FC) observados nos animais coletados em nesta região.

A ocorrência de necrose hepática vem sendo observada em estudos que avaliam contaminantes ambientais de diferentes naturezas (Simpson et al., 2000; Pacheco e Santos, 2002; Schmalz et al., 2002; Marty et al., 2003; Stehr et al., 2003; Stentiford et al., 2003; Oliveira Ribeiro et al., 2005) e a presença de pontos necróticos pode causar problemas funcionais e estruturais no fígado (Stentiford et al., 2003), podendo levar até mesmo falência do órgão (Rabitto et al., 2005).

Possivelmente as características histopatológicas do fígado dos animais de A1 podem estar relacionadas a presença de metais na referida área, uma vez que estudos pretéritos já encontraram níveis elevados destes contaminantes tanto na biota (Gusso-Choueri et al., 2015, 2016, 2018), como no sedimento da APA CIP (Cruz et al., 2014). Estes contaminantes podem estar causando lesões mais severas especificamente no fígado dos indivíduos, uma vez que este órgão é responsável por metabolizar tais compostos.

Nas brânquias, as alterações relatadas foram menos expressivas, contudo houve aumento significativo no número de células mucossecretoras PAS⁺ e AB⁺, resultados que indicam a tentativa de defesa do organismo contra os contaminantes disponíveis na água, o que pode explicar o *score* histopatológico reduzido nas brânquias desta região (Mallatt, 1985). Além disso, o aumento da secreção de muco pelas brânquias já foi relatado por estudos anteriores que avaliaram a exposição de peixes a metais pesados, amplamente encontrados no complexo APA-CIP (Mallat et al., 1985).

A capacidade protetora das células de muco advém da presença de mucinas e glicoproteínas que formam uma barreira contra xenobióticos, impedindo que sejam absorvidos pelo epitélio branquial (Perry e Laurent, 1993). Contudo, é importante ressaltar que o aumento excessivo da produção de muco nas brânquias, bem como o espessamento do epitélio basal (EBB) podem prejudicar as trocas gasosas ao longo das lamelas secundárias (Nero et al., 2006), resultados observados nos animais coletados em A1.

Além disso, o aumento no comprimento e largura das lamelas secundárias (CLS e LLS), ainda que não significativos, indicam alterações morfológicas adaptativas a poluição, a fim de aumentar a superfície de contato para compensar as trocas gasosas e o excesso da produção de

muco. Alguns estudos relataram a redução na morfometria das brânquias durante a exposição de peixes a substâncias como areias betuminosas e metais pesados dissolvidos em água (Nero et al., 2006; Montaser et al., 2010). Possivelmente a saúde das brânquias de *S. testudineus* coletados em APA-CIP (A1) encontra-se com *score* histopatológico menor (em relação a A2) devido ao fato de que, embora este local sofra com a presença de metais pesados e matéria orgânica nas águas estuarinas, ainda assim destaca-se por ser uma área de proteção ambiental de uso sustentável (APA), o que sugere que esta região tenha uma melhor qualidade ambiental.

O Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2) caracterizando-se como um ecossistema que sofre com o despejo constante de efluentes domésticos e industriais, o que prejudica o desenvolvimento dos organismos vivos nesta região (Lamparelli et al., 2001), características que classificam este estuário como poluído, justificando a redução do fator de condição (FC) dos animais coletados nesta área. Além da redução significativa do fator de condição, a diversidade de contaminantes encontrados neste estuário também refletiu em alterações genotóxicas (constatadas através da presença de micronúcleos e anomalias nucleares) no aumento da expressão da acetilcolinesterase muscular (AChE).

A presença de micronúcleos é decorrente de alterações cromossômicas em células que sofreram danos ao material genético e não foram reparadas, podendo ativar as vias apoptóticas ou necróticas da célula lesionada (Omar et al., 2000), ocasionando danos irreversíveis ao organismo. A presença de micronúcleos e anomalias nucleares vem sendo relatada em peixes que tiveram contato com metais, herbicidas e HPAs (Brinkmann et al., 2014; Leveroni et al., 2017; Gusso-Choueri et al., 2018), contaminantes amplamente encontrados no complexo estuarino de Santos – São Vicente (Bícego et al., 2006; Perina et al., 2018;)

A atividade da acetilcolinesterase dosada na musculatura do *S. testudineus* foi significativamente maior no Sistema Estuarino de Santos – São Vicente (A2) em relação às demais áreas de estudo. Além de desempenhar a função amplamente conhecida de hidrolisar a acetilcolina, as três isoformas descritas da acetilcolinesterase também estão envolvidas em diversas outras funções biológicas como, por exemplo, crescimento e diferenciação celular (Sperling et al., 2008), adesão celular (Paraoanu e Layer, 2008) e apoptose (Zhang et al., 2002). A expressão da AChE pode ser induzida durante o processo de apoptose em diversos tipos celulares, principalmente para auxiliar na formação de apoptossomos (Parker et al., 2004). Desta maneira, sugere-se que o aumento da expressão de AChE em A2 pode estar relacionado, principalmente à processos apoptóticos induzidos pela pressão antrópica neste ecossistema.

Com relação às defesas antioxidantes, maiores variações foram relatadas nesta área (A2), tais como a indução da atividade da GPx nas brânquias e inibição no fígado e inibição da GST tanto nas brânquias como no fígado. A glutathione peroxidase (GPx) é amplamente conhecida por fornecer proteção às células reduzindo peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) em água, evitando a formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) (Oliveira et al., 2009). O aumento da atividade da GPx nas brânquias em A2 pode estar relacionado principalmente a disponibilidade de contaminantes que induzam a formação de H_2O_2 nesta área em especial. Como demonstrado em estudos pretéritos, misturas complexas de contaminantes são capazes de induzir o aumento da atividade da GPx (Ahmad et al., 2006; Fonseca et al., 2011).

Embora a atividade da GPx tenha aumentado nas brânquias em A2, as demais defesas antioxidantes do *S. testudineus* coletados no SESS foram inibidas. Tal inibição vem sendo relatada em ambientes estuarinos que contém diversos contaminantes como metais, efluente de esgoto doméstico e descarte de resíduos agrícolas (Demerdash e Elagamy, 1999; Gul et al., 2004; Maria et al., 2009; Modesto e Martinez, 2010), e pode ser explicada devido à elevada concentração de poluentes no ambiente, uma vez que quando tal concentração excede a capacidade enzimática em metabolizar tais compostos, ocorre a inibição da enzima (Fonseca et al., 2011). Estudos anteriores descreveram a relação positiva entre o aumento da atividade da GST e o aumento da concentração de contaminante, até determinada concentração. Quando tal concentração é excedida, a atividade enzimática começa a decair progressivamente (Elia et al., 2003; Vieira et al., 2009).

Em relação à histopatologia, o maior *score* observado em A2 ocorreu nas brânquias. As brânquias participam de inúmeras funções importantes nos peixes como respiração, osmorregulação e excreção, estando constantemente em contato com os contaminantes dissolvidos na água (Mazon et al., 2002; Fernandes e Mazon, 2003). Lesões histopatológicas nestes órgãos podem ser interpretadas em decorrência, principalmente, de contaminação aguda (Zodrow et al., 2004). Assim, o maior índice histopatológico nas brânquias dos animais coletados em São Vicente pode ser explicado devido a uma gama de estressores disponíveis na coluna d'água como altas concentração de nutrientes (Braga et al., 2000; Hortellani et al., 2008), bifenilas policloradas (PCBs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) (Bícego et al., 2006; Martins et al., 2011) além de surfactantes (Martins et al., 2010), medicamentos e drogas ilícitas (Pereira et al., 2016) que são despejados no estuário diariamente.

Estudos anteriores que avaliaram contaminantes como pesticidas, hidrocarbonetos do petróleo, PAH, PCBs e metais pesados também relataram patologias branquiais em peixes, como descolamento do epitélio lamelar, aneurismas, hiperplasia e consequente fusão lamelar e aumento

das células secretoras de muco (Alazemi et al., 1996; Arellano et al., 1999; Erkmen et al., 2000; Mondon et al., 2001; Cengiz e Ünlu, 2002; Pacheco e Santos, 2002; Moore et al., 2003), corroborando com o observado neste estudo.

As alterações mais encontradas nas brânquias de *S. testudineus* foram infiltração leucocitária, hiperplasia, degeneração e fusão lamelar, danos que podem resultar em problemas respiratórios e osmorregulatórios nos organismos, além de reduzir as trocas gasosas prejudicando o organismo como um todo (Skidmore e Tovell, 1972; Yasser e Naser, 2011).

De acordo com os dados apresentados anteriormente, os animais coletados em ambas as regiões estuarinas avaliadas (A1 e A2) apresentam indícios de injúrias decorrentes da poluição ambiental. De maneira geral, os animais coletados no Sistema Estuarino de Santos São Vicente (A2) apresentaram pior estado de saúde, demonstrando mais respostas nos biomarcadores como redução no FC, maior ocorrência de micronúcleos e anomalias nucleares, alterações nas defesas enzimáticas antioxidantes e patologias severas nas brânquias nos levando a sugerir que a contaminação nesta região age de maneira sistêmica no organismo. Em contrapartida, os resultados observados nos animais coletados no Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape (A1) se concentraram no fígado, principalmente como alterações histopatológicas severas.

Tais resultados também foram sustentados pela análise multivariada, que demonstrou diferenças significativas entre as regiões, especialmente no gráfico de n-MDS onde é possível ver, claramente, a separação das regiões entre Unidades de Conservação, onde AR e A1 se agruparam no eixo x, e áreas não preservadas (A2). Destaca-se que a separação de AR e A1 no eixo y pode ser consequência das modalidades de UCs implantadas em cada uma destas regiões, visto que AR está situada em um mosaico de UCs, o que confere manutenção a biodiversidade.

Os resultados deste estudo também demonstraram que os usos de ferramentas que avaliem respostas em diferentes níveis de organização biológica são fundamentais para um diagnóstico ambiental mais realista, visto que ainda que não sejam observadas respostas em níveis bioquímicos, danos mais severos podem estar ocorrendo em níveis teciduais. Concluímos e reforçamos a importância da utilização de biomarcadores integrados para utilização em programas de biomonitoramento, além de sugerirmos o uso de análises histopatológicas uma vez que estas são alterações observadas em casos onde a lesão se torna bastante acentuada e, portanto, não podem ser mascaradas por meio de alterações abióticas (como pode ser observado nos biomarcadores bioquímicos). Além do mais, os resultados dos biomarcadores aqui apresentados são considerados respostas de curto e médio prazo aos contaminantes disponíveis no meio aquático. Assim, os ambientes avaliados devem ser monitorados e medidas mitigatórias devem ser

exploradas a fim de evitar que tais danos sejam irreversíveis a biota, afetando a biodiversidade local.

REFERÊNCIAS

- Adams, S. M., Ryon, M. G. 1994. A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress on fish populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 3(1), 15-25.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M. A. 2006. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere*, 65(6), 952-962.
- Akaishi, F. M., De Assis, H. S., Jakobi, S. C. G., Eiras-Stofella, D. R., St-Jean, S. D., Courtenay, S. C., Ribeiro, C. O. 2004. 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*, 46(2), 244-253.
- Alberto, A., Camargo, A. F., Verani, J. R., Costa, O. F., Fernandes, M. N. 2005. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(2), 247-255.
- Al-Ghais, S. M. 2013. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Marine pollution bulletin*, 74(1), 183-186.
- Amado, L. L., Robaldo, R. B., Geracitano, L., Monserrat, J. M., Bianchini, A. 2006. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, 52(2), 207-213.
- Arellano, J. M., Storch, V., Sarasquete, C. 1999. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the *Senegales sole*, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44(1), 62-72.
- Au, D. W. T. 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine pollution bulletin*, 48(9-10), 817-834.
- Bainy, A. C., Saito, E., Carvalho, P. S., Junqueira, V. B. 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology*, 34(2), 151-162.
- Ballesteros, M. L., Rivetti, N. G., Morillo, D. O., Bertrand, L., Amé, M. V., Bistoni, M. A. 2017. Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. *Science of the Total Environment*, 595, 711-722.
- Bícego, M.C., Taniguchi, S., Yogui, G.T., Montone, R.C., Silva, D.A.M., Lourenço, R.A., Martins, C.C., Sasaki, S.T., Pellizari, V.H., Weber, R.R. 2006. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil, *Marine Pollution Bulletin* 52, 1784 - 1832.
- Bradford, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 1976. *Analytical biochemistry*, 72(2), 248-254.
- Braga, E.S., Bonetti, C.V.D.H., Burone, L., Bonetti-Filho, J. 2000. Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista Estuarine System e Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 40, 165 - 73.
- Brasil, Decreto n. 9,985, de 18 de Julho de 2000. Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza, Brasília, DF, julho 2000.

- Brinkmann, M., Blenkle, H., Salowsky, H., Bluhm, K., Schiwy, S., Tiehm, A., Hollert, H. 2014. Genotoxicity of heterocyclic PAHs in the micronucleus assay with the fish liver cell line RTL-W1. *PloS one*, 9(1), 85692.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, 247(2-3), 295-311.
- Camargo, M. M., Martinez, C. B. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3), 327-336.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M. J., Scarabotti, P. A., Wunderlin, D. A. 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution*, 157(11), 3025-3033.
- Cengiz, E. I., Ünlü, E. 2002. Histopathological changes in the gills of mosquitofish, *Gambusia affinis* exposed to endosulfan. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 68(2), 290-296.
- Costanza, R., de Groot, R., Sutton, P., Van der Ploeg, S., Anderson, S. J., Kubiszewski, I., Turner, R. K. 2014. Changes in the global value of ecosystem services. *Global environmental change*, 26, 152-158.
- Dang, M., Nørregaard, R., Bach, L., Sonne, C., Søndergaard, J., Gustavson, K., Nowak, B. 2017. Metal residues, histopathology and presence of parasites in the liver and gills of fourhorn sculpin (*Myoxocephalus quadricornis*) and shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) near a former lead-zinc mine in East Greenland. *Environmental research*, 153, 171-180.
- Oliveira Ribeiro, C. A., Belger, L., Pelletier, E., Rouleau, C. 2002. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Research*, 90(3), 217-225.
- El-Demerdash, F. M., Elagamy, E. I. 1999. Biological effects in *Tilapia nilotica* fish as indicators of pollution by cadmium and mercury. *International Journal of Environmental Health Research*, 9(3), 173-186.
- Elia, A. C., Galarini, R., Taticchi, M. I., Dörr, A. J. M., Mantilacci, L. 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(2), 162-167.
- Fonseca, V. F., França, S., Serafim, A., Lopes, B., Bebianno, M. J., Cabral, H. N. 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquatic toxicology*, 102(3-4), 216-227.
- Fulton, M. H., Key, P. B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(1), 37-45.
- Geracitano, L. A., Luquet, C., Monserrat, J. M., Bianchini, A. 2004. Histological and morphological alterations induced by copper exposure in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Marine environmental research*, 58(2-5), 263-267.
- Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., da Fonseca, M. B., de Araújo Pedron, F., Duarte, M. F., Vieira, V. L. P. 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(2), 237-241.
- Gül, Ş., Belge-Kurutaş, E., Yıldız, E., Şahan, A., Doran, F. 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environment International*, 30(5), 605-609.
- Gusso-Choueri, P. K., Choueri, R. B., de Araújo, G. S., Cruz, A. C. F., Stremel, T., Campos, S., Ribeiro, C. A. O. 2016. Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-

- biomarker and multi-organ approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), 18047-18065.
- Gusso-Choueri, P. K., Choueri, R. B., Santos, G. S., de Araújo, G. S., Cruz, A. C. F., Stremel, T., Abessa, D. M. S. 2016. Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. *Marine pollution bulletin*, 104(1-2), 229-239.
- Gusso-Choueri, P. K., de Araújo, G. S., Cruz, A. C. F., de Oliveira Stremel, T. R., de Campos, S. X., de Souza Abessa, D. M., Choueri, R. B. 2018. Metals and arsenic in fish from a Ramsar site under past and present human pressures: Consumption risk factors to the local population. *Science of The Total Environment*, 628, 621-630.
- Hamed, S. B., Guardiola, F., Cuesta, A., Martínez, S., Martínez-Sánchez, M. J., Pérez-Sirvent, C., Esteban, M. A. 2017. Head kidney, liver and skin histopathology and gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) exposed to highly polluted marine sediments from Portman Bay (Spain). *Chemosphere*, 174, 563-571.
- Hortellani, M.A., Sarkis, J.E.S., Abessa, D.M.S., Sousa, E.C.P.M., 2008. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do Estuário Santos e São Vicente. *Química Nova*, 31, 10 - 19.
- Jiang, Z., Hunt, J., Wolff, S.P., James V.; Wolff, S. P. 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical biochemistry*, 202(2), 384-389.
- Kassie, F., Parzefall, W., Knasmuller, S., 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 463 (1), 13–31.
- Kennish, M. J. 2017. Practical handbook of estuarine and marine pollution. *CRC press*.
- Kleinkauf, A., Connor, L., Swarbreck, D., Levene, C., Walker, P., Johnson, P. J., Leah, R. T. 2004. General condition biomarkers in relation to contaminant burden in European flounder (*Platichthys flesus*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 58(3), 335-355.
- Krüger, E. L. 2001. Uma abordagem sistêmica da atual crise ambiental. *Desenvolvimento e Meio ambiente*, 4.
- Kumar, N., Krishnani, K. K., Meena, K. K., Gupta, S. K., Singh, N. P. 2017. Oxidative and cellular metabolic stress of *Oreochromis mossambicus* as biomarkers indicators of trace element contaminants. *Chemosphere*, 171, 265-274.
- Lamparelli, M. C., Costa, M. P. D., Prósperi, V. A., Bevilacqua, J. E., Araújo, R. P. D. A., Eysink, G. G. J., Pompéia, S. 2001. Sistema Estuarino de Santos e São Vicente. In *Sistema estuarino de Santos e São Vicente*, 142-142.
- Le Cren, E. D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *The Journal of Animal Ecology*, 201-219.
- Leveroni, F. A., Caffetti, J. D., Pastori, M. C. 2017. Genotoxic response of blood, gill and liver cells of *Piaractus mesopotamicus* after an acute exposure to a glyphosate-based herbicide. *Caryologia*, 70(1), 21-28.
- Linde-Arias, A.R., Inácio, A.F., Novo, L.A., de Albuquerque, C., Moreira, J.C., 2008. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environ. Pollut.* 156, 974–979
- Louiz, I., Palluel, O., Ben-Attia, M., Aït-Aïssa, S., Hassine, O. K. B. 2018. Liver histopathology and biochemical biomarkers in *Gobius niger* and *Zosterisessor ophiocephalus* from polluted and non-polluted Tunisian lagoons (Southern Mediterranean Sea). *Marine pollution bulletin*, 128, 248-258.
- Mazon, A. F., Monteiro, E. A. S., Pinheiro, G. H. D., Fernadez, M. N. 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4A), 621-631.

- Modesto, K. A., Martinez, C. B. 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78(3), 294-299.
- Montaser, M., Mahfouz, M. E., El-Shazly, S. A., Abdel-Rahman, G. H., Bakry, S. 2010. Toxicity of heavy metals on fish at Jeddah coast KSA: Metallothionein expression as a biomarker and histopathological study on liver and gills. *World J. Fish Mar. Sci*, 2(3), 174-185.
- Mouchet, F., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Cuenot, Y., Bourdineaud, J. P., Boudou, A., & Gauthier, L. 2006. Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquatic toxicology*, 78(2), 157-166.
- Narra, M. R., Rajender, K., Reddy, R. R., Murty, U. S., Begum, G. 2017. Insecticides induced stress response and recuperation in fish: Biomarkers in blood and tissues related to oxidative damage. *Chemosphere*, 168, 350-357.
- Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van Der Kraak, G., Lee, L. E. J., Van Meer, T., Dixon, D. G. 2006. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(3), 365-377.
- Oliveira, M., Maria, V. L., Ahmad, I., Serafim, A., Bebianno, M. J., Pacheco, M., Santos, M. A. 2009. Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata*—an integrated biomarker approach. *Environmental Pollution*, 157(3), 959-967.
- Omar, W.A., Zaghloul, K.H., Abdel-Khalek, A.A., Abo-Hegab, S., 2012. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutat. Res.* 746, 7–14.
- Pacheco, M., Santos, M. A. 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(3), 331-347.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.). *Science of the Total environment*, 309(1-3), 105-115.
- Paraoanu, L. E., Layer, P. G. 2008. Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation. *The FEBS journal*, 275(4), 618-624.
- Peakall, D. B. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology*, 3(3), 157-160.
- Pereira, C. D. S., Maranhão, L. A., Cortez, F. S., Pusceddu, F. H., Santos, A. R., Ribeiro, D. A., Guimarães, L. L. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Science of the Total Environment*. 2016, 548, 148-154.
- Perry, S. F., Laurent, P. 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. In *Fish ecophysiology*, Springer, Dordrecht, 231-264.
- Poleksic, V., Lenhardt, M., Jaric, I., Djordjevic, D., Gacic, Z., Cvijanovic, G., Raskovic, B. 2010. Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(3), 515-521.
- Porto, J. I., Araujo, C. S., Feldberg, E. 2005. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, 97(3), 287-292.
- Rabitto, I. S., Costa, J. A., De Assis, H. S., Pelletier, E., Akaishi, F. M., Anjos, A., Ribeiro, C. O. 2005. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(2), 147-156.

- Ribeiro, C. O., Vollaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H. É. L. È. N. E. 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, 74(1), 53-69.
- Rodrigues, E. D. L., Fanta, E. 1998. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. *Revista Brasileira de Zoologia*, 15(2), 441-450.
- Rodriguez-Ariza, A., Peinado, J., Pueyo, C., Lopez-Barea, J. 1993. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(12), 2568-2573.
- Schmalz Jr, W. F., Hernandez, A. D., Weis, P. 2002. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Marine environmental research*, 54(3-5), 539-542.
- Schmalz Jr, W. F., Hernandez, A. D., Weis, P. 2002. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Marine environmental research*, 54(3-5), 539-542.
- Simpson, M. G., Parry, M., Kleinkauf, A., Swarbreck, D., Walker, P., Leah, R. T. 2000. Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals. *Marine environmental research*, 50(1-5), 283-287.
- Skidmore, J. F., Tovell, P. W. A. 1972. Toxic effects of zinc sulphate on the gills of rainbow trout. *Water Research*, 6(3), 217-IN4.
- Stentiford, G. D., Longshaw, M., Lyons, B. P., Jones, G., Green, M., Feist, S. W. 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*, 55(2), 137-159.
- Sutton, S. G., Bult, T. P., Haedrich, R. L. 2000. Relationships among fat weight, body weight, water weight, and condition factors in wild Atlantic salmon parr. *Transactions of the American Fisheries Society*, 129(2), 527-538.
- Targett, T. E. Food resource partitioning by the pufferfishes *Sphoeroides spengleri* and *S. testudineus* from Biscayne Bay, Florida. *Marine Biology*, v. 49, n. 1, p. 83-91, 1978.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Van Der Oost, R., Opperhuizen, A., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N. P. E. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. 1996. *Aquatic Toxicology*, 35(1), 21-46.
- Van Dyk, J. C., Cochrane, M. J., Wagenaar, G. M. 2012. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere*, 87(4), 301-311.
- Vieira, L. R., Gravato, C., Soares, A. M. V. M., Morgado, F., Guilhermino, L. 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere*, 76(10), 1416-1427.
- Wang, M. Y., Liehr, J. G. 1995. Induction by estrogens of lipid peroxidation and lipid peroxidation-derived malonaldehyde-DNA adducts in male Syrian hamsters: role of lipid peroxidation in estrogen-induced kidney carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 16(8), 1941-1945.
- Yasser, A. G., Naser, M. D. 2011. Impact of pollutants on fish collected from different parts of Shatt Al-Arab River: a histopathological study. *Environmental monitoring and assessment*, 181(1-4), 175-182.
- Zhang, W., Yamada, M., Gomeza, J., Basile, A. S., Wess, J. 2002. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1–M5 muscarinic receptor knock-out mice. *Journal of Neuroscience*, 22(15), 6347-6352.

Zodrow, J. M., Stegeman, J. J., Tanguay, R. L. 2004. Histological analysis of acute toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 66(1), 25-38.

Capítulo II - Análise integrada do intestino de *Spherooides testudineus* em estuários com diferentes níveis de contaminação ambiental: um novo modelo de biomarcadores.

Gabriela Pustiglione Marinsek^{1,3}, Denis Moledo de Souza Abessa², Renata de Britto Mari^{1,3}

¹Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista - Laboratório de Morfofisiologia Animal (LABMA); ²Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociência, Campus do Litoral Paulista - Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA); ³Universidade Estadual Paulista, Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMar); ⁴Universidade Federal de São Paulo, Campus Baixada Santista, Instituto do Mar.

RESUMO

A pressão antrópica nos ambientes estuarinos vem crescendo de maneira exponencial nos últimos anos, o que exige maior acompanhamento de tais ecossistemas. A utilização de biomarcadores é crescente nos estudos que avaliam a qualidade ambiental, e a busca por novos modelos é de extrema importância para a contribuição de tais análises. Desta forma, este estudo objetivou avaliar as alterações morfofuncionais no intestino de uma espécie de peixe demersal (*Spherooides testudineus*) em três estuários do litoral do estado de São Paulo que diferem entre si por meio das políticas ambientais e pressões antropogênicas e propor, assim, a utilização deste órgão como um biomarcador para análises de qualidade ambiental. Para tanto, foram coletados 10 exemplares de *S. testudineus* em cada uma das regiões avaliadas (AR – Mosaico Juréia Itatins; A1 – Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia Iguape e A2 – Complexo Estuarino de Santos – São Vicente). Após a coleta, o intestino distal dos exemplares foi submetido às técnicas de análise histológica, marcação neuronal das subpopulações geral, metabolicamente ativa (NADH-dp) e nitrérgica (NADPH-dp), bem como para análises bioquímicas das enzimas GPx, GST, GSH, dano de DNA e LPO. Após a matriz de biomarcadores utilizados foi submetida a análise estatística (PERMANOVA) a fim de verificar se existe distinção entre os estuários avaliados. A presença de contaminantes de origens distintas vem afetando principalmente a morfometria das camadas estratigráficas que compõe o intestino, onde foi relatado aumento da espessura da parede intestinal em A2. Além disso, os contaminantes de A1 e A2 foram responsáveis por alterar o metabolismo neuronal (A1) bem como a expressão de neurotransmissores como óxido nítrico (A2). As alterações bioquímicas foram menos expressivas em todas as regiões avaliadas. A análise estatística demonstrou diferença significativa entre as áreas, sendo que A1 e A2 se agruparam no gráfico gerado, possivelmente devido a presença de contaminantes. Desta forma, conclui-se que o sistema nervoso entérico se apresenta como um biomarcador relevante e deve ser considerado em análises que avaliam a qualidade ambiental.

Palavras-chave: Peixe; sistema nervoso entérico; histologia; bioquímica; poluição.

ABSTRACT

Anthropogenic pressure in estuarine environments has been increasing exponentially in the last years, which requires more monitoring of these ecosystems. The use of biomarkers is increasing in studies that evaluate environmental quality, and the search for new models is extremely important for the contribution of such analyzes. The objective of this study was to evaluate the morphofunctional changes in the gut of a demersal species of fish (*Sphoeroides testudineus*) in three estuaries along the coast of the state of São Paulo, which differ from each other through environmental policies and anthropogenic pressures, and the use of this organ as a biomarker for environmental quality analyzes. For this, 10 specimens of *S. testudineus* were collected in each of the evaluated regions (AR - Juréia Itatins Ecological Station, A1 - Cananéia Iguape Estuary and Botany Estuary - A2). After collection, the distal intestine of the specimens was submitted to histological analysis, neuronal labeling of the general, metabolically active (NADH-dp) and nitrergic (NADPH-dp) subpopulations, as well as for biochemical analyzes of GPx, GST, GSH, DNA damage, and LPO. Afterward, the matrix of biomarkers used was submitted to statistical analysis (PERMANOVA) in order to verify if there is any distinction between the evaluated estuaries. The presence of contaminants of different origins has mainly affected the morphometry of the stratigraphic layers that make up the intestine, where it was reported an increase in the thickness of the intestinal wall in A2. In addition, A1 and A2 contaminants were responsible for altering neuronal metabolism (A1) as well as the expression of neurotransmitters such as nitric oxide (A2). Biochemical changes were less expressive in all the regions evaluated. Statistical analysis showed a significant difference between areas, with A1 and A2 being grouped in the generated graph, possibly due to the presence of contaminants. Thus, it is concluded that the enteric nervous system presents as a relevant biomarker and should be considered in analyzes that evaluate the environmental quality.

Key words: fish, enteric nervous system, histology, biochemical analysis, pollution.

1. INTRODUÇÃO

As regiões costeiras são ambientes de elevada concentração demográfica que têm sofrido, nas últimas décadas, alterações na estrutura e funcionamento de seus ecossistemas em virtude de ações antropogênicas, o que tem impactado diretamente os ambientes marinhos e estuarinos. Devido às características físico-químicas e geomorfológicas os ambientes estuarinos são ainda mais susceptíveis ao acúmulo de matéria orgânica e de contaminantes (Du Laing et al., 2009). Desta forma, existe um crescente esforço no desenvolvimento de estudos e novas metodologias que avaliem a presença de contaminantes nestes ambientes e os relacione com os possíveis danos causados a biota (Cajaraville et al., 2000; Kruger, 2001).

Os poluentes que alcançam estes ecossistemas podem se diluir na água, se depositar no solo ou até mesmo se associar a partículas em suspensão (Riba et al., 2004; Abessa et al., 2005), sendo facilmente incorporados pelos organismos através da absorção dérmica ou nas brânquias e ou pela via alimentar. A exposição pela via alimentar pode ocorrer por meio da ingestão direta dos compostos ou pela ingestão de animais ou materiais contaminados, o que pode gerar a transferência trófica, levando à bioacumulação e biomagnificação (Riba et. al., 2004), e o consequente disparo de efeitos tóxicos sobre a biota exposta à poluição.

Neste contexto, os biomarcadores vêm sendo uma ferramenta largamente utilizada para avaliar a qualidade ambiental de diferentes ecossistemas, dentre os quais se destacam análises relacionadas a alterações enzimáticas (Tyor e Pahwa, 2018; Moraes et al., 2018), genotóxicas (Hussain et al., 2016; Khan et al., 2018), mutagênicas (Araújo et al., 2014), hematológicas (Akbari et al., 2018) e histopatológicas (Ghisi et al., 2016; Jordanova et al., 2017; Ratn et al., 2018).

Os compostos tóxicos presentes na água agem diretamente nos órgãos que estão em contato direto ou indireto com o ambiente externo, como, por exemplo, o trato gastrointestinal (TGI); e sua presença pode mascarar ou inibir sinais químicos relevantes ou até mesmo causar danos aos receptores de membrana (Baatrup, 1990). O contato do TGI com os contaminantes pode ocorrer diretamente via alimentação, ingestão de água ou sedimento, tornando-o alvo de xenobióticos.

O TGI vem ganhando espaço nas discussões científicas ao longo dos últimos anos, em especial por sua elevada complexidade. Este órgão representa uma grande interface entre o organismo e o ambiente, desempenhando duas funções principais: regulação da absorção de água, eletrólitos e nutrientes disponíveis no lúmen e proteção do organismo por meio de mecanismos

imunogênicos e não imunogênicos, contra patógenos e substâncias estranhas como antígenos e fatores pró-inflamatórios (Farhadi et al., 2003).

Dentre os fatores que controlam o TGI e que o tornam ainda mais complexo, destaca-se o sistema nervoso entérico (SNE). Esta porção do sistema nervoso autônomo é responsável por regular os reflexos do TGI, de maneira independente das aferências centrais, por meio da ação de dois plexos principais, o plexo submucoso e o mioentérico através da ação de mais de 40 tipos diferentes de neurotransmissores, como acetilcolina, óxido nítrico, VIP, GABA, ATP e serotonina, entre outros (Furness, 2018; Furness e Stebbing, 2017). Além do controle de todas as funções digestivas e hormonais, o SNE desempenha um importante papel na manutenção da homeostase imunológica gastrointestinal (Furness, 2006).

Embora seja capaz de controlar as funções do TGI de maneira autônoma, o SNE relaciona-se com o sistema nervoso central (SNC) através de uma via bidirecional regulada pelos sistemas nervoso, imune e endócrino (Kelly et al., 2015), a qual harmoniza as funções dos órgãos envolvidos em condições fisiológicas e patológicas (Lerner e Mathias, 2016).

Contudo, atualmente os estudos sobre a comunicação entre o SNC e o SNE vêm demonstrando que esta relação é altamente complexa e envolve, também, a microbiota intestinal, compondo o eixo SNC-SNE-microbiota (De Palma et al., 2014; Carabottti et al., 2015; Mayer et al., 2015; Wang et al., 2016). Alguns fatores extrínsecos ao organismo podem alterar a composição da microbiota intestinal, alterando também os metabólitos secretados no lúmen, o que irá resultar em interações anormais no eixo SNC-SNE-microbiota. Dentre os principais fatores que podem comprometer a sinalização destacam-se fatores geográficos, ciclo de vida, estresse, infecções, alimentação e substâncias químicas (Cresci; Emmy-Dawden, 2015; Lerner; Mathias, 2015; Lerner et al., 2015; Mathias et al., 2016; Lerner; Mathias, 2016).

Estudos recentes desenvolvidos com roedores vêm demonstrando que a interação de substâncias químicas com o TGI pode comprometer a expressão de neurotransmissores, prejudicando a comunicação no eixo SNC-SNE-microbiota. Dentre as substâncias avaliadas destacam-se o bisfenol (BPA), herbicidas como o 2,4D, fluoreto e micotoxinas (Correa et al., 2011; Pereira et al., 2013; Sousa et al., 2014; Souza Melo et al., 2017; Szymanska e Gonkowski, 2018).

Ainda são escassos os estudos que avaliam os efeitos dos contaminantes no TGI de peixes, mas sabe-se que presença de substâncias tóxicas nos ambientes podem gerar inúmeros comprometimentos comportamentais, principalmente natatórios e predatórios (Weis, 2001) devido a alterações fisiológicas de neurônios motores (Scott e Sloman, 2004; Pereira et al., 2016; Chen et

al., 2017). Tais comprometimentos podem, em longo prazo, prejudicar os diversos níveis tróficos dependentes da população afetada, uma vez que podem alterar o fluxo energético da cadeia trófica do ecossistema em questão.

Diante do apresentado e considerando que o TGI de peixes pode entrar em contato com os contaminantes disponíveis no ambiente aquático e que este órgão possui importante papel fisiológico e comportamental nos organismos, este trabalho objetivou avaliar as alterações na morfofisiologia do intestino de um peixe demersal (*Sphoeroides testudineus*) em três estuários do litoral Paulista com diferentes tipos de pressão ambiental decorrente de ações antropogênicas e, assim, avaliar a aplicabilidade de um novo modelo de biomarcadores para diagnósticos de qualidade ambiental.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Bioindicador

O modelo biológico utilizado para o desenvolvimento deste estudo foi o baiacu pintado *Sphoeroides testudineus*, em virtude de ser uma espécie abundante nos ecossistemas estuarinos do litoral do Estado de São Paulo. Pertencentes a família Tetraodontidae, estes animais possuem quatro placas dentárias que possibilitam que os mesmos se alimentem de animais filtradores como moluscos bivalves, gastrópodes e crustáceos (Targett, 1978).

O hábito alimentar de *S. testudineus* faz com que o mesmo seja suscetível aos contaminantes pela ingestão de alimentos e água. No mais, o baiacu possui características que o tornam um bom modelo biológico por um conjunto de aspectos: os animais apresentam estreita relação com o ecossistema bentônico e hábito não migratório, o que lhes permite completar seus ciclos de vida no mesmo local, estando constantemente expostos aos poluentes da mesma região.

2.2. Regiões de Estudo

A coleta dos animais foi realizada em três regiões do Litoral Paulista sendo estas diferenciadas de acordo com a densidade populacional e impactos antropogênicos (Figura 1).

A área referência (AR) foi o Estuário do Rio Una localizado no Mosaico Juréia-Itatins (24°28'3.16"S 47° 6'45.77" O), criada pela Lei Estadual nº 14.982/13 e incluída no Tombamento da Serra do Mar (CONDEPHAAT, 40/85), que integra o Núcleo da Reserva da Biosfera da Mata

Atlântica (UNESCO, 2005), englobando os municípios de Peruíbe, Itariri, Miracatu e Iguape. Tal localidade foi escolhida por ser estar situada dentro do Mosaico de Unidades de Conservação Juréia-Itatins, área que confere manutenção dos ecossistemas e preservação das espécies da região.

A segunda área de estudo foi o Estuário de Cananéia, localizado no Sistema Estuarino Lagunar Cananéia - Iguape (A1) (24°40' S 25°05' S), caracterizado como uma área de proteção ambiental de uso sustentável (APA – CIP) e reconhecido pela UNESCO como uma reserva da biosfera da mata atlântica devido à sua contribuição ecológica (Brasil, 2012). A bacia hidrográfica desta região é uma província metalogênica, apresentando depósitos naturais de chumbo e zinco (De Moraes, 2004). Contudo, as atividades mineradoras desenvolvidas por décadas durante o século XX deixaram resquícios de metais (Pb, Zn, Cu, Cr) e arsênico (As) nas águas e sedimentos dos rios que compõem este sistema (Eysink et al., 1988; Corsi e Landim 2003; De Moraes 2004; Guimarães e Sígolo 2008). A concentração de metais em APA-CIP, que foi descrita como de baixo nível no passado, aumentou substancialmente após a abertura de uma conexão entre os rios e o estuário (Mahiques et al., 2009). Estudos recentes demonstraram a presença de metais em níveis moderados no sedimento do estuário, que foram atribuídas principalmente as atividades mineradoras e a contaminação urbana das cidades do entorno (Azevedo et al., 2011; Cruz et al., 2014; Gusso-Choueri et al., 2015; Tramonte et al., 2016).

A terceira área de estudo (A2), foi o Sistema Estuarino de Santos (23°58'52.03"S 46°23'52.72" O), localizado na região metropolitana da Baixada Santista, litoral centro do Estado de São Paulo, que inclui os estuários de Santos e São Vicente. Este local sofre grande degradação ambiental decorrente dos poluentes advindos do Porto de Santos, o maior porto da América Latina, efluentes de embarcações e dejetos despejados pelas populações residentes no entorno, além da presença de um dos maiores polos industriais do país, o polo industrial de Cubatão (Lamparelli et al., 2001). Os principais contaminantes encontrados neste sistema estuarino são hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), bifenilas policloradas (PCBs) além de metais e metaloides como (Pb, Zn, Hg, Ni, Cr, Cu e As) (Perina et al., 2018). Além disso, também vem sendo relatado a presença de drogas ilícitas e medicamentos (Pereira et al., 2016).

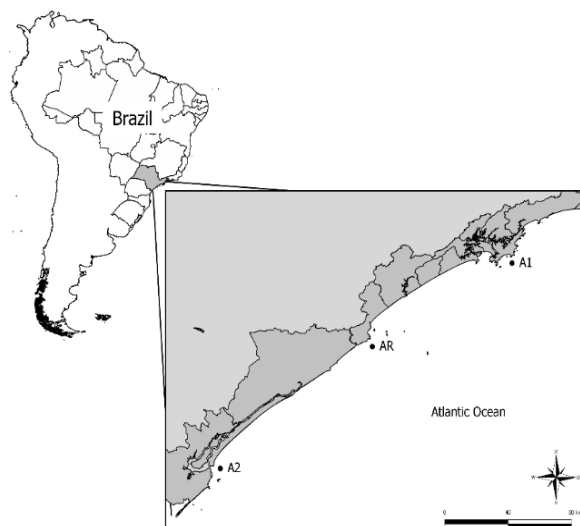


Figura 1. Mapa do litoral do Estado de São Paulo evidenciando as três regiões de estudo: AR – Estuário do Rio Una, A1 – Complexo Estuarino lagunar de Cananéia Iguape e A2 – Sistema Estuarino de Santos – São Vicente

2.3. Coleta dos Parâmetros Físico – Químicos da Água

Amostras de água dos locais de coleta foram analisadas quanto a temperatura e oxigênio dissolvido (OD) através de um medidor multiparâmetro com sonda de OD, quanto ao pH através da utilização de papel indicador de pH e quanto à salinidade por meio de um refratômetro/salinômetro manual.

2.4. Coleta do Material

Foram coletados e identificados 30 espécimes machos de baiacu pintado *S. testudineus* sexualmente maduros em cada região com auxílio de tarrafas. Em seguida, os animais foram transferidos em caixas plásticas contendo água do próprio local da coleta e bombas de aeração para o Laboratório de Morfofisiologia Animal do Campus do Litoral Paulista/UNESP. Todos os procedimentos envolvendo a experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IB-CLP (Anexo I - 04/2017– CEUA).

Após um período de 24 horas de aclimação os animais foram eutanasiados em solução de benzocaína a 50 ppm (diluída em 1 ml de acetona) em solução aquosa. Após, foram obtidos o peso (g) e o comprimento corpóreo total (cm) dos exemplares, seguido de abertura da cavidade celomática por meio de uma incisão mediana que se estendeu da região cloacal até as brânquias

para rebatimento da parede ventral. Em seguida, o intestino distal dos animais foi retirado, mensurado e destinado às técnicas histopatológicas, de evidência neuronal e análises bioquímicas.

2.5. Análise Histológica e Morfométrica do Intestino

Após a fixação em solução aquosa de formol a 10%, os segmentos distais dos intestinos foram lavados em álcool etílico a 70%, desidratados em série crescente de álcool e diafanizados em xilol. Após a inclusão em parafina, os intestinos foram submetidos a cortes transversais semi-seriados com 5µm de espessura e 300 µm de distância entre si, totalizando 3 cortes por lâmina/animal.

As lâminas obtidas foram coradas com a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação morfométrica dos estratos do órgão e Periodic Acid-Schiff (PAS) para análise das células muco-secretoras.

Os cortes histológicos foram divididos em quadrantes, a qual foram amostrados quatro campos (0°, 90°, 180° e 270°) por corte, totalizando 12 fotomicrografias por animal (Figura 2). Para a mensuração das camadas estratigráficas do intestino (µm) utilizou-se o aumento de 100x e para a contagem de linfócitos intra-epiteliais (IELs) e células mucosecretoras (PAS⁺) o aumento utilizado foi de 1000x. Foram contadas todas as células caliciformes, linfócitos intra-epiteliais (IELs) e enterócitos visualizados no campo microscópico e, posteriormente, foi estabelecida a razão entre IELs/ enterócito e células caliciformes/enterócitos.

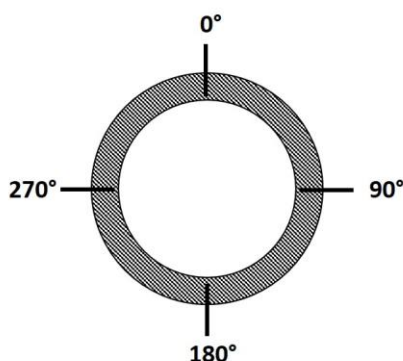


Figura 2. Esquema da divisão em quadrantes para amostragem dos campos microscópicos do intestino de *Spherooides testudineus*

2.6. Evidenciação dos neurônios mioentéricos

Após removidos da cavidade celomática, os segmentos intestinais foram destinados às técnicas de marcação neuronal para evidênciação da população geral, metabolicamente ativa (NADH – diaforase positivos) e nitrérgica (NADPH-diaforase positivos) dos neurônios mioentéricos.

2.6.1. Detecção da população geral de neurônios mioentéricos – Técnica de Giemsa (Barbosa, 1978)

Para evidênciação da população geral dos neurônios mioentéricos amostras do intestino foram previamente fixadas em solução fixadora de giemsa e microdissecadas sob esteromicroscópio, para retirada das túnicas mucosa e submucosa e preservação das túnicas muscular e serosa. Após os preparados foram imersos em corante de Giemsa contendo azul de metileno em tampão fosfato a 0,1 N (pH 6,9) durante 24 horas a temperatura ambiente. Após coradas, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e montadas em lâmina sob lamínula com resina sintética Permout®.

2.6.2. Detecção dos neurônios mioentéricos NADH – diaforase positivos (Gabella, 1987) e NADPH-diaforase positivos (Santer, 1994)

Para a detecção dos neurônios metabolicamente ativos (NADH – dp) e nitrérgicos (NADPH - dp) os segmentos intestinais foram submetidos à ação das enzimas NADH-diaforase e NADPH-diaforase respectivamente através da utilização de um aceptor artificial de elétrons, o NBT (Nitro Blue Tetrazolium). Após evidênciação, os intestinos foram fixados, seccionados ao longo do eixo longitudinal na margem mesentérica e microdissecados sob estereomicroscópio, para retirada das túnicas mucosa e submucosa e preservação das túnicas muscular e serosa. Em seguida, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e montadas em lâmina sob lamínula com resina sintética Permout®.

2.7. Densidade e Morfometria neuronal

A densidade neuronal (mm^2) foi obtida com o auxílio de microscópio óptico acoplado ao sistema de captura de imagens Motic Image® e transferidas para o computador. Para cada preparado de membrana foi adaptado um sistema teste constituído por 60 campos equidistantes, distribuídos em dez colunas e seis linhas cada, amostrando todas as regiões (mesentérica, intermediária e anti-mesentérica) do intestino.

A diferença entre a densidade de neurônios gerais (Giemsa) e neurônios NADPH-dp foi utilizada para estimar a densidade de neurônios colinérgicos (NADPH-dn) (Porto et al., 2012). Os perfis celular e nuclear de 100 neurônios/animal foram mensurados através do programa Image Pro-Plus® e expresso em μm^2 .

2.8. Análises Bioquímicas

Amostras do intestino foram mantidas a -80°C e em seguida foram homogeneizadas a 10% w/v em tampão Tris-HCl (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, sacarose 50 mM, KCl 150 mM, PMSF 1 mM, pH 7,6). Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 g durante 20 min a 4°C e alíquotas das amostras de intestino foram separadas para análise atividade da Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione S-transferase (GST) e quantificação da glutathione (GSH), peroxidação lipídica (LPO) e dano de DNA.

A atividade enzimática da GPx (Sies et al., 1979) e GST (Keen et al., 1976) foi determinada por espectrofotometria a 340 nm e a quantificação da GSH a 415nm.

Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) foram avaliados pelo método de FOX (Jiang et al., 1992), onde a formação do complexo Fe (III) -laranja de xilenol altera a absorbância a 550 nm. A análise de danos no DNA foi realizada através do ensaio de precipitação alcalina (Olive, 1988), que consiste na separação de vestígios livres de DNA do DNA genômico que, após coloração com Hoechst é quantificado através de fluorescência (λ_{ex} 360 nm e λ_{em} 450 nm). Para calibração, foi utilizada uma curva padrão de DNA genômico de esperma de salmão.

Todos os resultados foram normalizados pelas concentrações de proteína total, as quais foram determinadas por espectrofotometria a 595nm (Bradford, 1976) utilizando BSA (proteína albumina do soro bovino) como padrão. As leituras de absorbância e fluorescência foram realizadas em leitor de microplacas (Biotek-Synergy™ HT).

2.9. Tratamento de dados

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para a verificação da normalidade e teste de Levene para avaliar a homocedasticidade. Foram testadas diferenças estatísticas para os valores médios de cada variável (n=10) pelo teste de variância (ANOVA) e pelo *pos-hoc* de Tukey, quando seguidas as premissas para o uso de testes paramétricos. Quando violadas tais premissas, o teste de Kruskal-Wallis foi empregado seguido pelo pós-teste de Dunn's. O nível de significância foi de 5%.

Para avaliar a significâncias das diferenças entre os conjuntos de dados entre as regiões estudadas (AR, A1 e A2) uma análise unifatorial multivariada foi aplicada. Um total de 30 animais foi avaliado (10 exemplares de cada área) e 21 variáveis incluindo biomarcadores bioquímicos e morfofisiológicos. As matrizes foram analisadas pela análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) (Anderson, 2001) para testar o fator “estuário” (AR vs. A1 vs. A2). Foi utilizado $\alpha = 0,05$. Após a estrutura da matriz expressa pela análise multivariada foi visualizada através da Ordenação Multidimensional Não-Métrica de Escalonamento (nMDS).

3. RESULTADOS

Os parâmetros físico-químicos da água obtidos durante a coleta dos espécimes bem como os dados corporais dos exemplares coletados estão estabelecidos nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água das três regiões de coleta de *Sphoeroides testuineus* no Mosaico Juréia Itatins (AR), Complexo Estuarino Lagunar Cananéia Iguape Peruíbe (A1) e Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2).

Locais de Coleta	Salinidade	Oxigênio Dissolvido (mg/l)	Temperatura (°C)	pH
AR	20	6,4	23,4	7
A1	25	7,3	21,6	6
A2	25	6,0	24,4	7

Tabela 2. Comprimento e peso médio $\pm$ desvio padrão dos exemplares de *Sphoeroides testudineus* coletados no Mosaico Juréia Itatins (AR), Complexo Estuarino Lagunar Cananéia Iguape Peruíbe (A1) e Complexo Estuarino de Santos – São Vicente (A2).

Locais de Coleta	Peso (g)	Comprimento (cm)
AR	140,9 $\pm$ 56,4 ^a	19,5 $\pm$ 2,3 ^a
A1	167,05 $\pm$ 7,3 ^a	19,3 $\pm$ 2,62 ^a
A2	52,11 $\pm$ 21,8 ^b	17,7 $\pm$ 3,3 ^a

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas pelo teste ANOVA

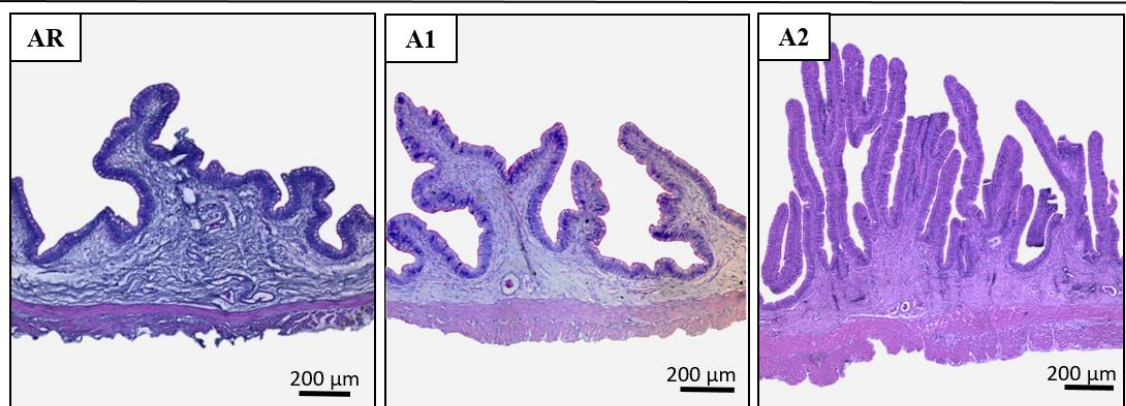
3.1. Biomarcadores de Morfofisiologia Intestinal

3.1.1. Análise Histopatológica e Morfométrica do Intestino

As camadas estratigráficas do intestino de *S. testudineus* nas três regiões de estudo (AR, A1 e A2) seguiram o padrão descrito para órgãos tubulares: mucosa, submucosa, muscular e serosa.

Nos parâmetros morfométricos do intestino observou-se aumento de 20% na altura das vilosidades e de 40% na espessura da submucosa ($p < 0,05$, ANOVA) dos animais de A2, que refletiu significativamente no aumento da parede total do intestino deste grupo em relação a AR e A1 ($p < 0,05$, ANOVA). A espessura da túnica muscular não mostrou diferenças significativas entre as regiões (Figura 3). A relação entre linfócitos intra-epiteliais (IELs) e enterócitos apresentou aumento expressivo de 45% em A1 e 60% em A2 ($p < 0,05$, ANOVA) quando comparados a AR. A densidade de células caliciformes não se apresentou alterada entre as regiões de estudado (Figura 3).

Camadas Estratigráficas do Intestino



Mucosa Intestinal

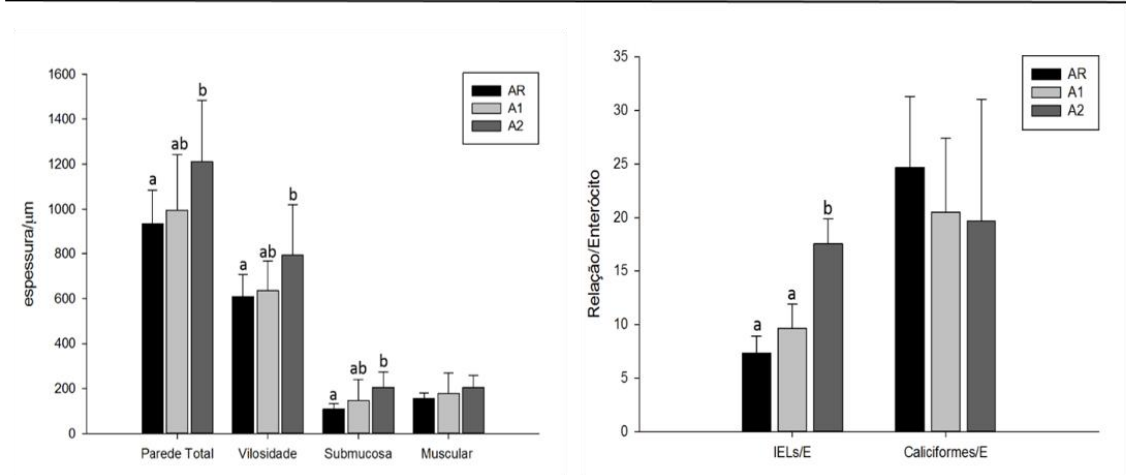
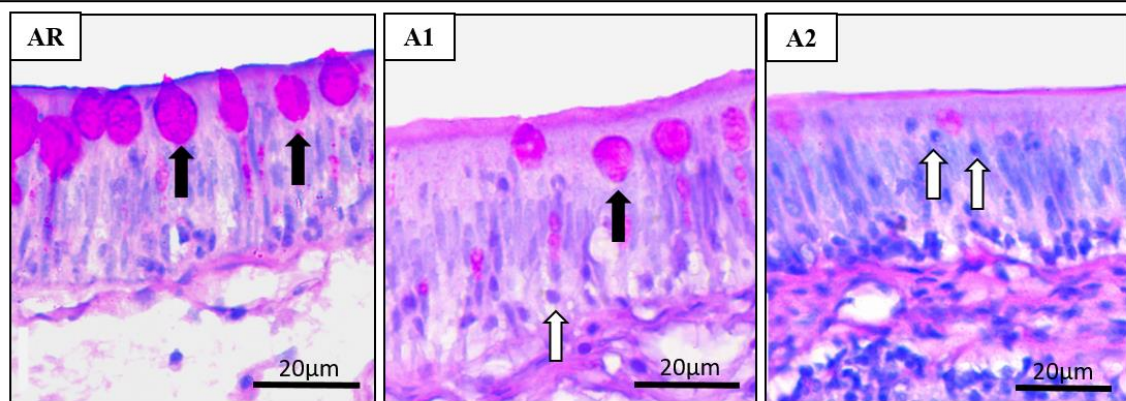


Figura 3. Acima, fotomicrografia das camadas estratigráficas do intestino de *Sphoeroides testudineus* e representação gráfica da média das medidas obtidas em cada região destacando a diferença entre os locais de coleta (AR – Mosaico Juréia Itatins; A1 – Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape e A2 – Complexo Estuarino de Santos-São Vicente). Hematoxilina-Eosina. Barra = 200µm. Abaixo, fotomicrografia da camada mucosa do intestino de *S. testudineus* indicando a presença de células caliciformes (seta branca) e linfócitos intra epiteliais (seta preta). Periótico Reativo de Schiff (PAS) contra-corado com Hematoxilina.

*Letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de ANOVA

3.2. Densidade e Morfometria dos Neurônios Mioentéricos

A análise da densidade neuronal indicou redução significativa ($p < 0,05$, ANOVA) de aproximadamente 20% dos neurônios gerais em A1 e A2 e aumento de 20% dos neurônios metabolicamente ativos (NADH-d+) em A1 quando comparados com AR e A2. Com relação às subpopulações NADPH-d+ e NADPH-d-, houve, em A1, uma manutenção dos neurônios nitrérgicos e redução de aproximadamente 20% nos neurônios colinérgicos. Em A2, os neurônios nitrérgicos aumentaram em densidade cerca de 40% ($P < 0,05$, ANOVA) quando comparados com as demais regiões de estudo, enquanto que os neurônios colinérgicos reduziram sua densidade na mesma proporção em comparação com AR ($p < 0,05$, ANOVA) (Figuras 4 e 5).

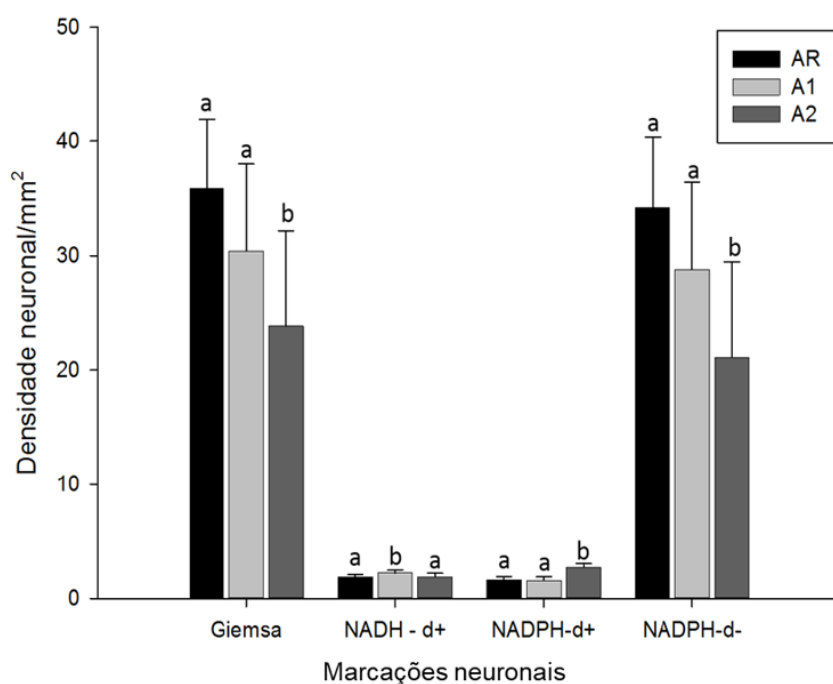


Figura 4. Densidade das populações neuronais geral e metabolicamente ativa (NADH-d+) e das subpopulações NADPH-d+ e NADPHd- do baiacu *Sphoeroides testudineus* coletados nas regiões de estudo (AR - Mosaico Juréia Itatins; A1 – Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape e A2 – Complexo Estuarino de Santos-São Vicente). * Letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de ANOVA

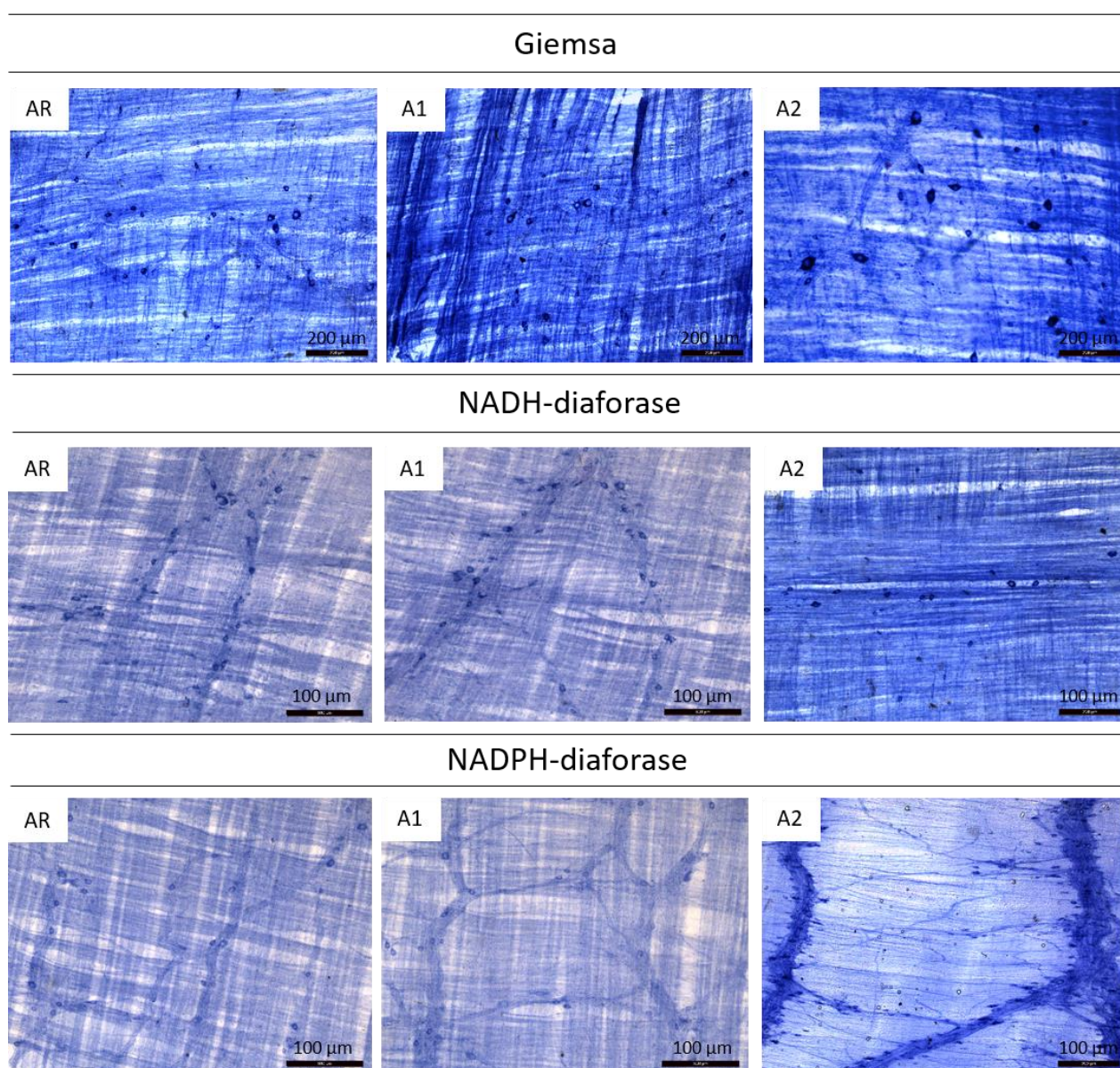


Figura 5. Fotomicrografias dos neurônios do plexo mioentérico de *Spherooides testudineus* demonstrando as diferentes populações marcadas nas três regiões de estudo (AR – Mosaico Juréia Itatins; A1 – Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape e A2 – Complexo Estuarino de Santos-São Vicente).

Quanto à morfometria dos neurônios da população geral, não houve diferença na área do pericário entre os grupos, contudo, observou-se uma redução da área nuclear de 40% nos neurônios de A1 quando comparados com AR e A2 ($p < 0,05$, ANOVA). Os neurônios metabolicamente ativos sofreram hipertrofia no perfil celular e nuclear de cerca de 20% em A1 ($p < 0,05$, ANOVA). Nos neurônios nitrérgicos não foram observadas alterações morfológicas nos neurônios dos animais nas três regiões de estudo (Figura 6).

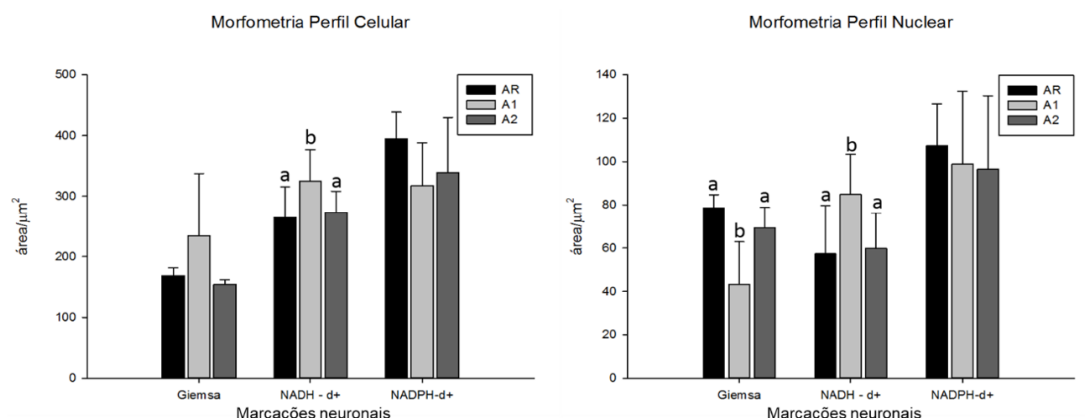


Figura 6 – Morfometria do perfil e núcleo neuronal das populações neuronais geral e metabolicamente ativa (NADH-d+) e das subpopulações NADPH-d+ e NADPH-d- do baiacu *Sphoeroides testudineus* coletados nas regiões de estudo: AR – Mosaico Juréia Itatins; A1 – Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape e A2 – Complexo Estuarino de Santos-São Vicente. * Letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de ANOVA

3.3. Biomarcadores Bioquímicos

Os resultados dos biomarcadores de efeito e exposição encontram-se apresentados nas figuras 7 e 8. Apenas observou-se diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA) na quantificação da glutatona (GSH), onde ocorreu redução de aproximadamente 60% nas regiões A1 e A2 quando comparadas a AR.

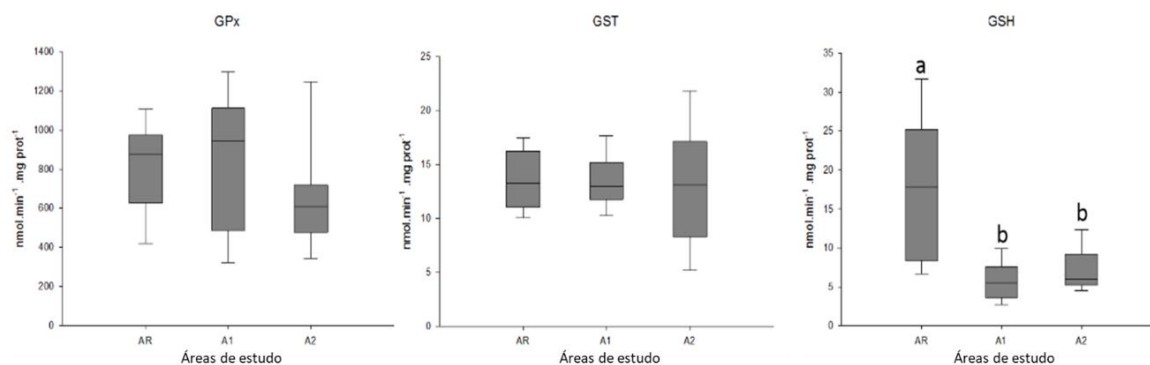


Figura 7. Atividade das enzimas antioxidantes (GPx – Glutathione Peroxidase e GST – Glutathione S-Transferase) e glutathione total (GSH) do intestino de baiacus *Sphoeroides testudineus* coletados nas regiões de estudo: AR – Mosaico Juréia Itatins; A1 – Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape e A2 – Complexo Estuarino de Santos-São Vicente. * Letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de ANOVA

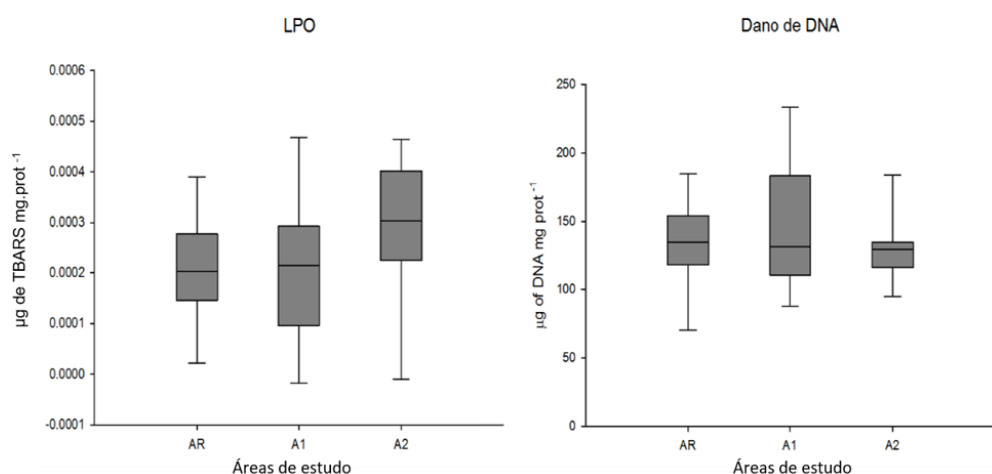


Figura 8. Presença de lipoperóxidos e Dano de DNA no intestino de baiacus *Sphoeroides testudineus* coletados nas regiões de estudo: AR – Mosaico Juréia Itatins; A1 – Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape e A2 – Complexo Estuarino de Santos-São Vicente. *Letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de ANOVA

3.4. Análise Multivariada e n-MDS

As análises multivariadas indicaram diferenças significativas ($P < 0,001$, PERMANOVA) entre as três regiões avaliadas (AR, A1 e A2). O gráfico plotado pelo n-MDS (3D) demonstrou que os três grupos se separam, contudo, o grupo “AR – Mosaico Juréia-Itatins” se mostrou mais distante dos demais (A1 e A2) (Figura 9).

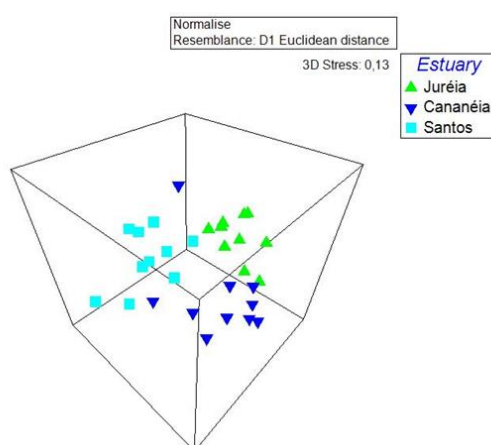


Figura 9. Representação da Ordenação Multidimensional Não-Métrica de Escalonamento (nMDS) para representar a matriz de dados utilizada na análise multivariada (PERMANOVA) para avaliar o fator “estuário”. Nota-se separação espacial das três regiões de estudo (AR – Juréia; A1 – Cananéia (APA-CIP) e A2 – Santos (SESS))

4. DISCUSSÃO

Além de desempenhar a função de absorção de água, nutrientes e eletrólitos, o intestino funciona como uma importante barreira que separa o conteúdo nocivo presente no lúmen do ambiente interno (Baumgart e Dignass, 2002). Desta forma, os resultados deste estudo demonstraram que a poluição ambiental das regiões avaliadas estão promovendo alterações morfofisiológicas e bioquímicas no trato gastrointestinal (TGI) de baiacus *Sphoeroides testudineus*, o que pode vir a comprometer a homeostase, a barreira intestinal e os processos de digestão e absorção de nutrientes essenciais.

Os sistemas imune e nervoso são a principal interface do organismo com o ambiente externo, integrando e respondendo às alterações ambientais. Esta comunicação, que ocorre por meio de moléculas como citocinas, neurotrofinas e neuropeptídeos, que podem alterar a expressão de neurotransmissores e influenciar vias imunes (Veiga-Fernandes e Mucida, 2016).

Neste sentido, estudos vêm demonstrando que a presença de metais no ambiente aquático como cobre, mercúrio, cádmio e arsênico (Brown et al., 1982; Stromberg et al., 1983; Tjalve et al., 1986; De Oliveira Ribeiro et al., 2002; Linbo et al., 2006) afetam a densidade celular através da morte de neurônios por meio da alteração do potencial de membrana da mitocôndria, que leva à liberação de citocromo c para o citoplasma, iniciando a via endógena das caspases. Tais resultados poderiam justificar a redução na densidade de neurônios, bem como o aumento do citoplasma seguido pela redução da área do núcleo dos neurônios gerais em A1, reforçando a possibilidade de morte celular programada, visto que as células apoptóticas mantêm a morfologia das organelas e condensam sua cromatina (Grivicich et al., 2007).

O aumento expressivo da população de neurônios metabolicamente ativos observados em A1, bem como a redução da população nitrérgica e o aumento sutil da população colinérgica, sugerem que os contaminantes disponíveis nesta região, em sua maioria metais, acarretam no aumento do metabolismo celular, em especial dos neurônios que sintetizam a acetilcolina como neurotransmissor.

O metabolismo neuronal depende intimamente das proteínas conhecidas como citocromo oxidase, responsáveis por catalisar a transferência de elétrons na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, gerando ATP por fosforilação oxidativa (Wong-Riley, 1989). Desta maneira, quanto maior a síntese de citocromo c pela célula, maior atividade metabólica. Contudo, esta enzima é responsável por consumir cerca de 90% do oxigênio disponível na mitocôndria, o que nos leva a sugerir que o aumento do metabolismo celular eleva os níveis de espécies reativas de

oxigênio (EROs), levando a elevados níveis de estresse oxidativo a longo prazo (Wong-Riley, 1989).

Neste estudo também foi observado o aumento, não significativo, da densidade de neurônios colinérgicos. A acetilcolinesterase é responsável pela síntese da acetilcolina, e o aumento de sua expressão sugere o aumento do trânsito intestinal, uma vez que a acetilcolina é o neurotransmissor responsável por promover as respostas excitatórias da musculatura lisa local (Furness, 2006). A presença de substâncias tóxicas pode, em um primeiro momento, levar a hipersecreção intestinal via estímulos diretos advindos do SNE ou por meio de respostas inflamatórias, levando ao quadro clínico da diarreia. Esta é uma resposta imediata que visa aumentar o peristaltismo para eliminação da substância nociva e, portanto, proteger o organismo (Jones e Blikslager, 2002).

Recentemente, os neurônios do SNE foram considerados os principais mantenedores da homeostase imune do trato gastrointestinal devido à sua intrínseca relação com a microbiota e o SNC (Lener, 2017). Desta forma, a ingestão de substâncias tóxicas altera a composição da microbiota, bem como a fisiologia do TGI, desencadeando uma cascata de processos inflamatórios (Thomas et al., 2017).

Assim, sugere-se que a ingestão dos contaminantes disponíveis no ambiente aquático de A1 podem ter alterado a microbiota intestinal, promovendo a sinalização de fatores pró-inflamatórios aos neurônios mioentéricos, aumentando sua atividade metabólica e assim, a expressão da acetilcolinesterase, a fim de eliminar as substâncias que estão prejudicando a homeostase do TGI. Contudo, seriam necessários mais estudos a fim de investigar a composição da microbiota dos exemplares coletados nestas regiões.

Torna-se importante ressaltar que o aumento da motilidade intestinal prejudica a capacidade digestiva e absorviva do TGI uma vez que o alimento não permanece em contato com a mucosa pelo tempo necessário à absorção. Assim, a longo prazo tais alterações poderiam causar déficits nutricionais na população e comunidades existentes neste ecossistema, trazendo prejuízos para o fluxo energético da cadeia trófica em questão.

Quando avaliadas as respostas dos biomarcadores bioquímicos, constatou-se redução significativa na GSH. Esta redução pode ser em decorrência da presença de EROs nos animais desta área, causado principalmente pela presença de metais. A redução da GSH traz consequências negativas uma vez que prejudica a capacidade da conjugação com compostos orgânicos via GST ou combate ao estresse oxidativo através da GPx. Os metais podem estimular a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) através das vias da NADPH oxidase e reação de Fenton, alterando, consequentemente as defesas celulares antioxidantes (Gusso-Choueri et al., 2015).

Alterações no ambiente externo ao lúmen refletem diretamente na morfologia e morfometria das camadas estratigráficas do intestino, uma vez que esta representa a interface entre o ambiente interno (organismo) e externo. Neste estudo foi observado que os indivíduos coletados no Sistema Estuarino de Santos – São Vicente (A2) apresentaram aumento na altura das vilosidades e submucosa, resultando no aumento da espessura total da parede intestinal. Assim, sugere-se que o aumento das vilosidades nesta região esteja relacionado à tentativa de aumentar a superfície de contato da mucosa intestinal para otimizar a absorção de nutrientes. A manutenção da altura das vilosidades está associada ao processo de *turnover* das células da mucosa, ou seja, se o intestino responder a algum agente que provoque o desequilíbrio das taxas de síntese, migração ou extrusão, ocorrerá variação na altura das mesmas (Applegate et al., 1999; Uni et al., 2000). Desta forma, o aumento na altura das vilosidades relaciona-se com o aumento da taxa mitótica e redução da taxa de extrusão celular, sugerindo que fatores externos presentes no lúmen estejam interferindo na dinâmica do epitélio intestinal.

A complexa mistura de contaminantes presentes em A2 pode ser responsável pelo recrutamento de células do sistema imune intestinal, as quais podem estar causando aumento da lâmina própria e da submucosa, o que indica que os contaminantes ambientais podem estar desencadeando processos inflamatórios neste tecido (Brierley e Linden, 2014). Além do aumento da espessura das camadas estratigráficas, a presença de linfócitos intra-epiteliais (IELs) na mucosa também pode ser considerada um indicativo de inflamação intestinal nos animais coletados nesta mesma região. Os IELs são células que contribuem com a resposta imune inata do organismo e indicam inflamação na mucosa (Janeway et al., 2001), e o aumento da infiltração linfocitária indica desbalanço entre a mucosa e a microbiota intestinal (Belem et al., 2015), confirmando que a presença de contaminantes pode estar comprometendo a homeostase intestinal através de respostas inflamatórias.

Em relação às alterações observadas no SNE, a densidade de neurônios totais também reduziu significativamente, embora a manutenção da morfometria destas células não indique a presença de processos apoptóticos, podendo estar relacionada a migração neuronal para a submucosa, uma vez que peixes não apresentam plexo submucoso e o plexo mioentérico supre suas funções (Furness, 2006). A migração neuronal foi observada por Sorteni et al. (2014), ao avaliar o plexo mioentérico de peixes sob estresse migratório. A migração destes neurônios pode estar associada aos processos inflamatórios que estão ocorrendo na mucosa e submucosa, confirmados pelas análises morfométricas no intestino (Vasina et al., 2006) devido à ingestão constante de compostos como HPAs, PCBs e metais (CETESB, 2001; Bícigo et al., 2006;

Azevedo et al., 2009). Vale ressaltar, neste caso, que tais alterações se relacionam ao processo de plasticidade neuronal, que ocorre a fim de manter a homeostase intestinal em situações estressantes (Kruger et al., 2002).

Contrariamente aos resultados observados em A1, os neurônios mioentéricos de A2 mantiveram sua taxa metabólica semelhante a AR, aumentando cerca de 40% a densidade dos neurônios nitrérgicos, responsáveis pelo relaxamento da musculatura lisa do trato gastrointestinal, devido à expressão do neurotransmissor óxido nítrico (NO) (Furness, 2006).

O aumento da densidade de neurônios NADPH-d+ sugere que estes são mais resistente aos efeitos causados pela poluição, como morte celular e estresse oxidativo (Santes, 1994), uma vez que além de atuar como um importante neurotransmissor o óxido nítrico (NO) está envolvido nas vias das quinases e do AMP cíclico, conferindo proteção e sobrevivência aos neurônios (Contestabile e Ciani, 2004; Riccio et al., 2006). O aumento da densidade de neurônios nitrérgicos do plexo mioentéricos também foi observada por Pereira et al. (2013) ao analisar os efeitos da intoxicação pelo herbicida 2,4D no intestino de ratos.

O óxido nítrico é uma molécula gasosa sintetizada por hemoproteínas da família citocromo P450 – a óxido nítrico sintase (NOS) - dependentes de O₂ e NADPH. Embora esta molécula seja importante para diversos processos biológicos, a ativação da NOS sob estímulos apropriados é capaz de produzir NO por um longo tempo através do mecanismo de sinergismo de indução, o que pode lesar as células saudáveis ao seu redor, sendo este o principal mecanismo responsável pelos processos inflamatórios e autoimunes (Flora-Filho e Zilberstein, 2000).

Existe uma linha tênue que separa os efeitos benéficos e tóxicos do óxido nítrico no organismo. Esta molécula funciona como um mensageiro nos processos de sinalização celular e como um dos microbicidas precursores na defesa contra organismos patogênicos (Drapier et al., 1988; Feng et al., 1993; Oswald et al., 1994; Gazzinalli et al., 1992). Contudo, o limite da concentração de NO entre a não toxicidade e a toxicidade apresenta variações entre os tecidos do organismo (Flora-Filho e Zilberstein, 2000).

O aumento da densidade de neurônios NADPH-d+ e a redução dos neurônios NADPH-d-, em sua maioria representados pelos neurônios colinérgicos, relaciona-se com o processo de plasticidade de neurotransmissor, que é a alteração da expressão gênica de determinados neurotransmissores (Giaroni et al., 1999), por meio da co-localização de ambos (Furness, 2000; Brehmer et al., 2004).

Alguns estudos vêm relatando que a mistura de contaminantes pode alterar o modo de ação dos mesmos, intensificando seus efeitos letais e subletais (Beyer et al., 2014). A alteração do

código químico neuronal indica que as células nervosas dos animais coletados em A2 estão alterando a expressão gênica dos neurotransmissores, o que nos leva a crer que este processo vem ocorrendo de forma crônica nestes organismos e pode ser decorrente da mistura dos inúmeros compostos dissolvidos nas águas estuarinas de A2.

O controle da motilidade gastrointestinal é mediado principalmente pelos neurotransmissores acetilcolina e óxido nítrico através de respostas excitatórias e inibitórias respectivamente, e depende da interação harmônica entre ambos. O aumento da expressão de óxido nítrico causa alterações na homeostase intestinal promovendo reduções no trânsito e na assimilação de nutrientes através do processo de constipação, o que pode ocasionar problemas a longo prazo.

Além de alterações morfofisiológicas a presença de contaminantes ambientais pode aumentar a presença de radicais livres no organismo causando alterações em seu estado *redox*, aumentando significativamente a presença de espécies reativas de oxigênio e do nitrogênio (Lushchak, 2011).

Em A2 também ocorreu a redução da GSH, o que pode ser atribuído nesta região a presença de poluentes diversos (Bícego et al., 2006; Martins et al., 2011), aumentando a produção de EROs e prejudicando a atividade de enzimas de defesa antioxidante como GST e GPx.

Através das análises multivariadas pode-se concluir que os estuários estudados (AR, A1 e A2) diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste da PERMANOVA. O gráfico plotado através do nMDS demonstrou efetivamente a separação das três regiões de estudo, onde a matriz mais separada das demais foi AR – Mosaico Jureia - Itatins. A distinção desta área em relação aos demais locais avaliados podem estar relacionados a melhor condição ambiental, por se tratar de um mosaico de UCs (UNESCO, 2005). Por outro lado, a separação de A1 e A2 no gráfico pode indicar diferenças quanto ao grau ou complexidade da contaminação local, uma vez que A2 é mais poluído e contém uma gama maior de poluentes (Guimarães e Sígolo 2008; Lamparelli et al., 2001).

Os dados apresentados acima reforçam a importância do melhoramento dos planos de manejo de áreas marinha preservadas, uma vez que os biomarcadores avaliados nos animais coletados em A1 indicaram alterações significativas. Assim, embora seja uma APA, esta região necessita de ações que controlem principalmente as fontes poluidoras como antigas áreas de mineração, esgotos urbanos e fontes de origem náutica. O desenvolvimento de medidas mitigatórias para controlar a dispersão de contaminantes, além de legislações e fiscalizações mais rígidas de áreas com elevada atividade antropogênica seria uma opção para reduzir as alterações

biológicas nos organismos e na cadeia trófica dos ecossistemas, principalmente de unidades de conservação.

Por meio das técnicas utilizadas neste estudo e a partir dos dados obtidos podemos concluir que os contaminantes disponíveis no ambiente aquático de A1 e A2 estão afetando a homeostase intestinal de *Sphoeroides testudineus* de maneira distinta, onde, embora os peixes das duas regiões estejam sofrendo com alterações significativas nos neurônios do sistema nervoso entérico, a natureza dos contaminantes age de maneira diferente sob a morfofisiologia do intestino, neurotransmissores e código químico das células.

Além disso, as alterações morfofuncionais do intestino sugerem que este se apresenta de forma integrada aos biomarcadores bioquímicos, um bom modelo de biomarcador para análises de qualidade ambiental visto que em virtude da exposição constante aos poluentes presentes no ambiente aquático, respondem por meio de alterações morfofisiológicas na presença de contaminantes de natureza distinta.

REFERENCIAS

- Aaron, L., Torsten, M., Patricia, J., Sandra, N. 2015. Industrial Food Additive Microbial Transglutaminase Is Immunogenic In Children With Celiac Disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 53, S337.
- Abessa, D. M., Carr, R. S., Rachid, B. R., Sousa, E. C., Hortelani, M. A., Sarkis, J. E. 2005. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 50(8), 875-885.
- Akbary, P., Yarahmadi, S. S., Jahanbakhshi, A. 2018. Hematological, hepatic enzymes' activity and oxidative stress responses of gray mullet (*Mugil cephalus*) after sub-acute exposure to copper oxide. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(2), 1800-1808.
- Applegate, T. J., Dibner, J. J., Kitchell, M. L., Uni, Z., Lilburn, M. S. 1999. Effect of turkey (*Meleagris gallopavo*) breeder hen age and egg size on poult development. 2. Intestinal villus growth, enterocyte migration and proliferation of the turkey poult. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 124(4), 381-389.
- Azevedo, J. S., Serafim, A., Braga, E. S., Fávaro, D. I., Bebianno, M. J. 2009. Biomarkers of exposure to metal contamination and lipid peroxidation in the benthic fish *Cathorops spixii* from two estuaries in South America, Brazil. *Ecotoxicology*, 18(8), 1001-1010.
- Baattrup, E. 1991. Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100(1-2), 253-257.
- Barbosa, A. J. F. 1978. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. *Rev Bras Pesqui Med Biol*, 11, 95-97.
- Baumgart, Daniel C.; Dignass, Axel U. 2002. Intestinal barrier function. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 5(6), 685 – 694.
- Beyer, J., Petersen, K., Song, Y., Ruus, A., Grung, M., Bakke, T., Tollefsen, K. E. 2014. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: a discussion paper. *Marine environmental research*, 96, 81-91.
- Bícego, M. C., Taniguchi, S., Yogui, G. T., Montone, R. C., Moreira, D. S. D., Lourenço, R. A., Weber, R. R. 2006. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and Sao Vicente Estuary System, Sao Paulo, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 52(12), 1804.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Brasil. 2011. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH). Câmara Técnica do Plano Nacional de Recursos Hídricos. *Plano Nacional de Recursos Hídricos: Prioridades 2012-2015*. Brasília, DF
- Brehmer, A., Croner, R., Dimmler, A., Papadopoulos, T., Schrödl, F., Neuhuber, W. 2004. Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. *Autonomic Neuroscience*, 112(1-2), 49-59.
- Brierley, Stuart M.; Linden, David R. 2014. Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11 (10), 611.
- Brown, S. B. Chemoreception and aquatic pollutants. *Chemoreception in Fishes*, p. 363-393, 1982.
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A., Severi, C. 2015. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of*

- gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, 28(2), 203.
- Chen, X., Dong, Q., Chen, Y., Zhang, Z., Huang, C., Zhu, Y., Zhang, Y. 2017. Effects of Dechlorane Plus exposure on axonal growth, musculature and motor behavior in embryonal larval zebrafish. *Environmental pollution*, 224, 7-15.
- Contestabile, A., Ciani, E. 2004. Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochemistry international*, 45(6), 903-914.
- Correa, O. P., Mari, R. B., Toledo, E. L., Guimarães, J. P., Pereira, J. N. B., Germano, R. M., Stabille, S. R. 2011. Effects of the ingestion of 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid on jejunal myenteric neurons in rats. *Journal of Morphological Science*, 28, 104-112.
- Corsi, A.C., Landim, P. M. B. 2003. Chumbo, Zinco e Cobre em sedimentos de corrente nos Ribeirões Grande, Perau e Canoas, e Córrego Barrinha no município de Adrianópolis (Vale do Ribeira, PR). *Geociências*, 22, 49-61.
- Cresci, G. A.; Bawden, E. 2015. Gut microbiome: what we do and don't know. *Nutrition in Clinical Practice*, 30 (6), 734-746.
- Cunha, D. G. P.; Calijuri, M. C. 2008. Comparação entre os teores de matéria orgânica e as concentrações de nutrientes e metais pesados no sedimento de dois sistemas lóticos do Vale do Ribeira de Iguape, SP. *Revista de Engenharia Ambiental*, 5 (2), 24-40.
- De Moraes, F. D., Venturini, F. P., Rossi, P. A., Avilez, I. M., de Souza, N. E. D. S., Moraes, G. 2018. Assessment of biomarkers in the neotropical fish *Brycon amazonicus* exposed to cypermethrin-based insecticide. *Ecotoxicology*, 27(2), 188-197.
- De Moraes, M.B.R. 2004. APA Cananéia Iguape Peruíbe-SP: área de proteção ambiental APA, como agência de desenvolvimento sustentável. *Annablume*.
- De Oliveira Ribeiro, C. A., Belger, L., Pelletier, E., & Rouleau, C. 2002. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Research*, 90(3), 217-225.
- De Palma, G., Collins, S.M., Stephen M.; Bercik, P. 2014. The microbiota-gut-brain axis in functional gastrointestinal disorders. *Gut Microbes*, 5 (3), 419-429.
- De Souza Melo, C. G., Perles, J. V. C. M., Zanoni, J. N., de Souza, S. R. G., Santos, E. X., de Lima Leite, A., Buzalaf, M. A. R. 2017. Enteric innervation combined with proteomics for the evaluation of the effects of chronic fluoride exposure on the duodenum of rats. *Scientific reports*, 7(1), 1070.
- Diamante, N. A., Ribeiro, A. A., Tibúrcio, V. G., da Silva Roveda, A. F., de Britto Mari, R., Stabille, S. R., de Melo Germano, R. 2015. Investigação dos efeitos do ácido 2, 4 diclorofenoxiacético sobre diferentes populações de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 17(2).
- Drapier, J., Wietzerbin, J., Hibbs, J. B. 1988. Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *European journal of immunology*, 18 (10), 1587-1592.
- Du Laing, G., Rinklebe, J., Vandecasteele, B., Meers, E., Tack, F. M. 2009. Trace metal behaviour in estuarine and riverine floodplain soils and sediments: a review. *Science of the total environment*, 407(13), 3972-3985.
- Eysink, G. G. J., Padua, H. B. D., Piva-Bertoletti, S. A. E. 1988. Metais pesados no Vale do Ribeira e em Iguape-Cananéia. *Ambiente: revista CETESB de tecnologia*, 2(1), 6-13.
- Farhadi, A., Banan, A. L. I., Fields, J., Keshavarzian, A. L. I. 2003. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 18(5), 479-497.
- Feng, H. M., Walker, D. H. 1993. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha exert their antirickettsial effect via induction of synthesis of nitric oxide. *The American journal of pathology*, 143(4), 1016.

- Flora Filho, R., Zilberstein, B. 2000. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 46(3), 265-271.
- Furness, J. B. 2000. Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system*, 81 (1-3), 87-96.
- Furness, J. B., Stebbing, M. J. 2018. The first brain: species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. *Neurogastroenterology & Motility*, 30(2), e13234.
- Furness, J. B. 2006. The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 130(1), 1-5.
- Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., Hieny, S., James, S. L., Sher, A. 1992. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *European journal of immunology*, 22(10), 2501-2506.
- Ghisi, N. C., Oliveira, E. C., Mota, T. F. M., Vanzetto, G. V., Roque, A. A., Godinho, J. P., Prioli, A. J. 2016. Integrated biomarker response in catfish *Hypostomus ancistroides* by multivariate analysis in the Pirapó River, southern Brazil. *Chemosphere*, 161, 69-79.
- Giaroni, C., De Ponti, F., Cosentino, M., Lecchini, S., Frigo, G. 1999. Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology*, 117(6), 1438-1458.
- Goksøyr, A., Förlin, L. 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic toxicology*, 22(4), 287-311.
- Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A. B. D. 2007. Morte celular por apoptose. *Revista brasileira de cancerologia*, 53(3), 335-343.
- Guimarães, V., Sígolo, J. B. 2008. Associação de resíduos da metalurgia com sedimentos em suspensão-Rio Ribeira de Iguape. *Geologia USP. Série Científica*, 8(2), 1-10.
- Gusso-Choueri, P. K., Choueri, R. B., de Araújo, G. S., Cruz, A. C. F., Stremel, T., Campos, S., Ribeiro, C. A. O. 2015. Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-biomarker and multi-organ approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), 18047-18065.
- Hussain, B., Sultana, T., Sultana, S., Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., Nadeem, S. 2016. Variation in genotoxic susceptibility and biomarker responses in *Cirrhinus mrigala* and *Catla catla* from different ecological niches of the Chenab River. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(14), 14589-14599.
- Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., Wolff, S. P. 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical biochemistry*, 202(2), 384-389.
- Jones, S. L., Blikslager, A. T. 2002. Role of the enteric nervous system in the pathophysiology of secretory diarrhea. *Journal of veterinary internal medicine*, 16(3), 222-228.
- Jordanova, M., Rebok, K., Dragun, Z., Ramani, S., Ivanova, L., Kostov, V., Kapetanović, D. 2017. Effects of heavy metal pollution on pigmented macrophages in kidney of V ardar chub (*S qualius vardarensis* K araman). *Microscopy research and technique*, 80(8), 930-935.
- Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W. B. 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183-6188.
- Kelly, J. R., Kennedy, P. J., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Clarke, G., Hyland, N. P. 2015. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 392.
- Khan, M. M., Moniruzzaman, M., Mostakim, G. M., Khan, M. S. R., Rahman, M. K., Islam, M. S. 2018. Aberrations of the peripheral erythrocytes and its recovery patterns in a freshwater teleost, silver barb exposed to profenofos. *Environmental Pollution*, 234, 830-837.

- Kruger, G. M., Mosher, J. T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T., Morrison, S. J. 2002. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*, 35(4), 657-669.
- Lamparelli, M. C., Costa, M. P. D., Prósperi, V. A., Bevilacqua, J. E., Araújo, R. P. D. A., Eysink, G. G. J., Pompéia, S. 2001. Sistema Estuarino de Santos e São Vicente. In *Sistema estuarino de Santos e São Vicente* (pp. 142-142).
- Lerner, A.; Matthias, T. 2016. GUT-the Trojan horse in remote organs' autoimmunity. *J Clin Cell Immunol*, 7 (401), 10-4172.
- Lerner, A., Matthias, T. 2016. The jigsaw of breast feeding and celiac disease. *Int. J. Celiac Dis*, 4, 87-89.
- Lerner, A., Jeremias, P., & Matthias, T. (2015). The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing. *Int J Celiac Dis*, 3(4), 151-155.
- Lerner, A., Matthias, T. 2015. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*, 14(6), 479-489.
- Lerner, A., Neidhöfer, S., Matthias, T. 2017. The gut microbiome feelings of the brain: a perspective for non-microbiologists. *Microorganisms*, 5(4), 66.
- Linbo, T. L., Stehr, C. M., Incardona, J. P., & Scholz, N. L. (2006). Dissolved copper triggers cell death in the peripheral mechanosensory system of larval fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(2), 597-603.
- Lushchak, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30.
- Machala, M., Nezveda, K., Petřivalský, M., Jarošová, A., Piačka, V., Svobodová, Z. 1997. Monooxygenase activities in carp as biochemical markers of pollution by polycyclic and polyhalogenated aromatic hydrocarbons: choice of substrates and effects of temperature, gender and capture stress. *Aquatic toxicology*, 37(2-3), 113-123.
- Machala, M., Petřivalský, M., Nezveda, K., Ulrich, R., Dušek, L., Piačka, V., Svobodová, Z. 1997. Responses of carp hepatopancreatic 7-ethoxyresorufin-O-deethylase and glutathione-depende
- Mayer, E. A., Tillisch, K., Gupta, A. 2015. Gut/brain axis and the microbiota. *The Journal of clinical investigation*, 125(3), 926-938.
- Oswald, I. P., Eltoum, I., Wynn, T. A., Schwartz, B., Caspar, P., Paulin, D., James, S. L. 1994. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*, through the production of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(3), 999-1003.
- Pereira, J., Scoz-Faglioni, J. R., Germano, R. M., Stabille, S. R., Mari, R. B. 2013. Alterations in the duodenum myenteric neurons of Wistar rats after ingesting of 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid. *Journal of Morphological Sciences*, 28-32.
- Pereira, P., Puga, S., Cardoso, V., Pinto-Ribeiro, F., Raimundo, J., Barata, M., Almeida, A. 2016. Inorganic mercury accumulation in brain following waterborne exposure elicits a deficit on the number of brain cells and impairs swimming behavior in fish (white seabream—*Diplodus sargus*). *Aquatic Toxicology*, 170, 400-412.
- Perina, F. C., Torres, R. J., Mozeto, A. A., Nascimento, M. R. L., de Souza Abessa, D. M. 2018. Sediment quality assessment of the tributaries of the Santos-São Vicente Estuarine System—Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 13(2), 25-38.
- Ratn, A., Prasad, R., Awasthi, Y., Kumar, M., Misra, A., Trivedi, S. P. 2018. Zn 2+ induced molecular responses associated with oxidative stress, DNA damage and histopathological lesions in liver and kidney of the fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Ecotoxicology and environmental safety*, 151, 10-20.

- Riba, I., Casado-Martínez, C., Forja, J. M., Valls, Á. D. 2004. Sediment quality in the Atlantic coast of Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(2), 271-282.
- Riccio, A., Alvania, R. S., Lonze, B. E., Ramanan, N., Kim, T., Huang, Y., Ginty, D. D. 2006. A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. *Molecular cell*, 21(2), 283-294.
- Rodriguez-Ariza, A., Peinado, J., Pueyo, C., Lopez-Barea, J. 1993. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(12), 2568-2573.
- Santer, R. M. 1994. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. *Journal of the autonomic nervous system*, 49(2), 115-121.
- Scott, G. R., Sloman, K. A. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic toxicology*, 68(4), 369-392.
- Sies, H., Koch, O. R., Martino, E., Boveris, A. 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *Febs Letters*, 103(2), 287-290.
- Sorteni, C., Clavenzani, P., De Giorgio, R., Portnoy, O., Sirri, R., Mordenti, O., Chiocchetti, R. 2014. Enteric neuroplasticity in seawater-adapted European eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of anatomy*, 224(2), 180-191.
- Sousa, F. C., Schamber, C. R., Amorin, S. S. S., Natali, M. R. M. 2014. Effect of fumonisin-containing diet on the myenteric plexus of the jejunum in rats. *Autonomic Neuroscience*, 185, 93-99.
- Stromberg, P. C., Ferrante, J. G., Carter, S. 1983. Pathology of lethal and sublethal exposure of fathead minnows, *Pimephales promelas*, to cadmium: a model for aquatic toxicity assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 11(2), 247-259.
- Szymanska, K., Gonkowski, S. 2018. Bisphenol A—Induced changes in the enteric nervous system of the porcine duodenum. *Neurotoxicology*, 66, 78-86.
- Szymanska, K., Makowska, K., Gonkowski, S. 2018. The Influence of High and Low Doses of Bisphenol A (BPA) on the Enteric Nervous System of the Porcine Ileum. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 917.
- Targett, T. E. 1978. Food resource partitioning by the pufferfishes *Sphoeroides spengleri* and *S. testudineus* from Biscayne Bay, Florida. *Marine Biology*, 49(1), 83-91.
- Thomas, S., Izard, J., Walsh, E., Batich, K., Chongsathidkiet, P., Clarke, G., Gilligan, J. P. 2017. The host microbiome regulates and maintains human health: A primer and perspective for non-microbiologists. *Cancer research*.
- Tjälve, H., Gottofrey, J., Björklund, I. 1986. Tissue disposition of $^{109}\text{Cd}^{2+}$ in the brown trout (*Salmo trutta*) studied by autoradiography and impulse counting. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 12(1-2), 31-45.
- Tyor, A. K., Pahwa, K. 2018. Testicular Oxidative Stress and Cellular Deformities in *Clarias gariepinus* (Burchell) from River Yamuna in Delhi Region, India. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 100(5), 659-664.
- Uni, Z., Geyra, A., Ben-Hur, H., Sklan, D. 2000. Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. *British poultry science*, 41(5), 544-551.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.

- Vasina, V., Barbara, G., Talamonti, L., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., Tonini, M., De Giorgio, R. 2006. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Autonomic Neuroscience*, 126, 264-272.
- Veiga-Fernandes, H., Mucida, D. 2016. Neuro-immune interactions at barrier surfaces. *Cell*, 165(4), 801-811.
- Wang, H. X., Wang, Y. P. 2016. Gut microbiota-brain axis. *Chinese medical journal*, 1
- Weis, J. S., Smith, G., Zhou, T., Santiago-Bass, C., Weis, P. 2001. Effects of contaminants on behavior: biochemical mechanisms and ecological consequences: killifish from a contaminated site are slow to capture prey and escape predators; altered neurotransmitters and thyroid may be responsible for this behavior, which may produce population changes in the fish and their major prey, the grass shrimp. *AIBS Bulletin*, 51(3), 209-217.
- Wong-Riley, M. T. 1989. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in neurosciences*, 12(3), 94-101.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente estudo demonstraram que o Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia Iguape, área 1, embora seja reconhecido como uma área de proteção ambiental vem sofrendo gravemente com os efeitos dos contaminantes, principalmente metais, disponíveis na água e solo do estuário. Desta forma, seriam necessários estudos que biomonitorem esta região e auxiliem na remediação deste ecossistema.

Os animais coletados em A2, Complexo Estuarino de Santos – São Vicente indicaram um estado de saúde mais deteriorado em relação as duas outras áreas analisadas; tal situação pode ser decorrente da diversidade e concentração de contaminantes disponíveis neste ambiente. Desta forma, sugere-se que esta localidade deva ser monitorada e medidas de mitigação e prevenção devem ser estabelecidas a fim de recuperar a qualidade ambiental deste ecossistema altamente degradado.

Além disso, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a importância da utilização de diversos biomarcadores em diferentes tecidos para que as respostas obtidas sejam fieis as alterações ambientais, uma vez que cada tecido responde de maneira diferente a origem do contaminante e a concentração do mesmo disponível no ecossistema.

Por fim, sugere-se a incorporação da utilização do intestino como um biomarcador de monitoramento ambiental uma vez que este órgão se mostrou extremamente sensível aos contaminantes ambiental, principalmente no que tange o sistema nervoso entérico (SNE).

REFERENCIAS

- Ali, M., Sreekrishnan, T. R. 2001. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Advances in environmental research*, 5(2), 175-196.
- Bícego, M.C., Seyffert, B. H., Martins, C.C., Fillmann, G. 2008. Poluição por Petróleo. In: Neto, J.A., Wallner-Kersanach, M., Patchineelam, S.M. *Poluição Marinha*. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 77 – 94
- Derraik, J. G. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine pollution bulletin*, 44(9), 842-852.
- Duursma, E. K., Marchand, M., Vas, D. 1974. *Chlorinated hydrocarbon residues in biota, sediments and water collected from the Ligurian Sea* (No. IAEA--163).
- Gusso-Choueri, P. K., Choueri, R. B., de Araújo, G. S., Cruz, A. C. F., Stremel, T., Campos, S., Ribeiro, C. A. O. 2015. Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-biomarker and multi-organ approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), 18047-18065.
- Gusso-Choueri, P. K., Choueri, R. B., Santos, G. S., de Araújo, G. S., Cruz, A. C. F., Stremel, T., de Sousa Abessa, D. M. 2016. Assessing genotoxic effects in fish from a marine protected area influenced by former mining activities and other stressors. *Marine pollution bulletin*, 104(1-2), 229-239.
- Gusso-Choueri, P. K., de Araújo, G. S., Cruz, A. C. F., de Oliveira Stremel, T. R., de Campos, S. X., de Souza Abessa, D. M., Choueri, R. B. 2018. Metals and arsenic in fish from a Ramsar site under past and present human pressures: Consumption risk factors to the local population. *Science of The Total Environment*, 628, 621-630.
- Houde, E.D. 2001. Committee on the Evaluation, Design, and Monitoring of Marine Reserves and Protected Areas in the United States. Marine Protected Areas, tools for Sustaining Ocean Ecosystems. *National Academy of Sciences*. Washington, DC.
- Jameson, S. C., Tupper, M. H., Ridley, J. M. 2002. The three screen doors: can marine “protected” areas be effective?. *Marine pollution bulletin*, 44(11), 1177-1183.
- Kammann, U., Akcha, F., Budzinski, H., Burgeot, T., Gubbins, M. J., Lang, T., Hylland, K. 2017. PAH metabolites in fish bile: From the Seine estuary to Iceland. *Marine environmental research*, 124, 41-45.
- Lovejoy, T. E. 1997. Biodiversity: what is it. *Biodiversity II. Understanding and Protecting Our Biological Resources*, 7-14.
- Matthews, R. A., Buikema Jr, A. L., Cairns Jr, J., Rodgers Jr, J. H. 1982. Biological monitoring: Part IIA—receiving system functional methods, relationships and indices. *Water Research*, 16(2), 129-139.
- Moore, J. C., Berlow, E. L., Coleman, D. C., de Ruiter, P. C., Dong, Q., Hastings, A., Nadelhoffer, K. 2004. Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology letters*, 7(7), 584-600.
- National Research Council. Committee on the Evaluation, Design, and Monitoring of Marine Reserves and Protected Areas in the United States, Ocean Studies Board, Commission on Geosciences, Environment, and Resources. 2001. Monitoring, research, and modeling.
- Oliva, M., Gravato, C., Guilhermino, L., Galindo-Riaño, M. D., Perales, J. A. 2014. EROD activity and cytochrome P4501A induction in liver and gills of Senegal sole *Solea senegalensis* from a polluted Huelva Estuary (SW Spain). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 166, 134-144.
- Pozo, K., Lazzerini, D., Perra, G., Volpi, V., Corsolini, S., Focardi, S. 2009. Levels and spatial distribution of polychlorinated biphenyls (PCBs) in superficial sediment from 15 Italian Marine Protected Areas (MPA). *Marine pollution bulletin*, 58(5), 773.

- Rainbow, P. S. 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 31(4-12), 183-192.
- Sardi, A. E., Renaud, P. E., da Cunha Lana, P., Camus, L. 2016. Baseline levels of oxidative stress biomarkers in species from a subtropical estuarine system (Paranaguá Bay, southern Brazil). *Marine pollution bulletin*, 113(1-2), 496-508.
- Scherl, L. M., Wilson, A., Wild, R., Blockhus, J., Franks, P., McNeely, J. A., McShane, T. O. 2006. As áreas protegidas podem contribuir para a redução da pobreza. *Oportunidades e limitações*. Cambridge, Reino Unido: IUCN.
- Silva, C. A. R., Rainbow, P. S., Smith, B. D., Santos, Z. L. 2001. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. *Water Research*, 35(17), 4072-4078.
- Sousa, E. E., Serafini, T. Z. 2018. Panorama das Unidades de Conservação na zona costeira e marinha do estado de São Paulo. *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, 44.
- Sousa, E. E., Serafini, T. Z. 2018. Panorama das Unidades de Conservação na zona costeira e marinha do estado de São Paulo. *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, 44.
- Trujillo, A. P., Thurman, H. V. 2008. *Essentials of oceanography* (No. Sirsi) i9780132401227). Pearson Education.
- Van der Oost, R., Opperhuizen, A., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N. P. 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquatic toxicology*, 35(1), 21-46.
- Vikas, M., Dwarakish, G. S. 2015. Coastal pollution: a review. *Aquatic Procedia*, 4, 381-388.